

# Nichtlineare Dynamik in natürlichen und biomimetischen Enzym-Systemen

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dr. rer. nat. Marcus Hauser

geb. am 15. November 1962 in Santiago de Chile

Magdeburg, den 17. Februar 2004



“Beschreibungen einfacher periodischer Erscheinungen sind in der chemischen Litteratur ziemlich selten, verdienen aber doch einige Beachtung, vielleicht auch vom Standpunkte der Frage aus, wie bei biologischen Vorgängen deren Periodizität aus chemischen und physikalischen Thatsachen abzuleiten wäre.“

G. Bredig, J. Weinmayr,  
“Eine periodische Kontaktkatalyse“,  
*Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg*  
**1904**, 7, 405 – 417.



# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 0.1      | Ausgewählte Publikationen aus dem Schriftenverzeichnis . . . . .     | iii       |
| <b>1</b> | <b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>                               | <b>1</b>  |
| 1.1      | Nichtlineare Dynamik in Biologie und Chemie . . . . .                | 1         |
| 1.2      | Aufgabenstellung . . . . .   | 4         |
| <b>2</b> | <b>Die Peroxidase – Oxidase – Reaktion</b>                           | <b>7</b>  |
| 2.1      | Einführung . . . . .   | 7         |
| 2.2      | Dynamik . . . . .  | 8         |
| 2.3      | Beiträge zum Reaktionsmechanismus . . . . .                          | 11        |
| 2.3.1    | Der phenolische Effektor . . . . .                                   | 12        |
| 2.3.2    | Methylenblau . . . . .   | 15        |
| 2.4      | Oszillationen unter <i>in vivo</i> -Bedingungen? . . . . .           | 16        |
| 2.5      | Mögliche biologische Bedeutung der Oszillationen . . . . .           | 17        |
| <b>3</b> | <b>Die Hemin – Wasserstoffperoxid – Sulfit – Reaktion</b>            | <b>21</b> |
| 3.1      | Einführung . . . . .   | 21        |
| 3.2      | Dynamik . . . . .  | 22        |
| 3.3      | Beiträge zum Reaktionsmechanismus . . . . .                          | 24        |
| 3.3.1    | Erstellung des Reaktionsmechanismus . . . . .                        | 24        |
| 3.3.2    | Numerische Simulationen . . . . .                                    | 25        |
| 3.3.3    | Vereinfachung des Reaktionsmechanismus . . . . .                     | 27        |
| <b>4</b> | <b>Das biomimetische Cytochrom P450-Modellsystem</b>                 | <b>31</b> |
| 4.1      | Einführung . . . . .   | 31        |
| 4.2      | Das natürliche und das biomimetische Cytochrom P450-System . . . . . | 32        |
| 4.3      | Dynamik . . . . .  | 34        |
| 4.4      | Lokalisation der wichtigsten Komponenten . . . . .                   | 35        |
| 4.5      | Kinetische Untersuchungen . . . . .                                  | 38        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>43</b> |

|                      |    |
|----------------------|----|
| Literaturverzeichnis | 45 |
| Danksagung           | 51 |

## 0.1 Ausgewählte Publikationen aus dem Schriftenverzeichnis

- P1** M. J. B. Hauser, L. F. Olsen:  
“Mixed-Mode Oscillations and Homoclinic Chaos in an Enzyme Reaction“  
*Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1996**, *92*, 2857 - 2863.
- P2** M. J. B. Hauser, L. F. Olsen, T. V. Bronnikova, W. M. Schaffer:  
“Routes to Chaos in the Peroxidase-Oxidase Reaction: Period-Doubling and Period-Adding“  
*Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 5075 - 5083.
- P3** T. V. Bronnikova, W. M. Schaffer, M. J. B. Hauser, L. F. Olsen:  
“Routes to Chaos in the Peroxidase-Oxidase Reaction. II: the Fat Torus Scenario“  
*Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 632 - 640.
- P4** U. Kummer, M. J. B. Hauser, K. Wegmann, L. F. Olsen, G. Baier:  
“Oscillations and Complex Dynamics in the Peroxidase-Oxidase Reaction Induced by Naturally Occurring Aromatic Substrates“  
*Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 2084 - 2087.
- P5** A.-C. Møller, M. J. B. Hauser, L. F. Olsen:  
“Oscillations in Peroxidase-Catalyzed Reactions and their Potential Function in vivo“  
*Biophysical Chemistry* **1998**, *72*, 63 - 72.
- P6** M. J. B. Hauser, L. F. Olsen:  
“The Role of Naturally Occurring Phenols in Inducing Oscillations in the Peroxidase-Oxidase Reaction“  
*Biochemistry* **1998**, *37*, 2458 - 2469.
- P7** M. J. B. Hauser, A. Lunding, L. F. Olsen:  
“On the Role of Methylene Blue in the Oscillating Peroxidase-Oxidase Reaction“

*Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2*, 1685 - 1692.

**P8** M. J. B. Hauser, U. Kummer, A. Z. Larsen, L. F. Olsen:  
“Oscillatory Dynamics Protect Enzymes and Possibly Cells against Toxic Substances“  
*Faraday Discussions* **2001**, *120*, 215 - 227.

**P9** L. F. Olsen, M. J. B. Hauser, U. Kummer:  
“Mechanism of Protection of Peroxidase Activity by Oscillatory Dynamics“  
*European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 2796 - 2804.

**P10** M. J. B. Hauser, A. Strich, R. Bakos, Zs. Nagy-Ungvárai, S. C. Müller:  
“pH Oscillations in the Hemin – Hydrogen Peroxide – Sulfite Reaction“  
*Faraday Discussions* **2001**, *120*, 229 - 236.

**P11** M. J. B. Hauser, N. Fricke, U. Storb, S. C. Müller:  
“Periodic and Bursting pH Oscillations in an Enzyme Model System“  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2002**, *216*, 375 - 390.

**P12** R. Straube, S. C. Müller, M. J. B. Hauser:  
“Bursting Oscillations in the Revised Mechanism of the Hemin – Hydrogen Peroxide – Sulfite Oscillator“  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2003**, *217*, 1427 - 1442.

“Ich habe nun noch eine Theolochie für das Jahr 1773 und eine Theorie, die aber nicht mehr zu gebrauchen, denn sie ist vom vorigen Jahr.“

Georg Christoph Lichtenberg, *Briefe von Mägden über Literatur*, Vermischte Schriften, 1844.

# Kapitel 1

## Einleitung und Aufgabenstellung

### 1.1 Nichtlineare Dynamik in biologischen und chemischen Systemen

Oszillierende chemische Reaktionen wurden im 19. Jahrhundert entdeckt [1] und erfuhren um die Wende des 19. zum 20. Jahrhundert eine erste Blütezeit [2, 3, 4], bevor sie ab ca. 1920 in “Ungnade“ gefallen sind. Ab diesem Zeitpunkt verbreitete sich die Ansicht, daß chemische Oszillationen, die spontan eine “geordnete“ Dynamik, also Zustände niedrigerer Entropie hervorbringen, mit dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik unvereinbar wären. Erst nach der Formulierung der Grundlagen der Thermodynamik irreversibler Phänomene [5] wandte sich das wissenschaftliche Augenmerk wieder den sich in Zeit und Raum selbstorganisierenden Phänomenen, wie Oszillationen oder Musterbildung, zu. Seit etwa vier Jahrzehnten werden oszillierende chemische Systeme ausführlich untersucht [6, 7, 8], wobei die Motivation entweder durch das Interesse an der Dynamik dieser Systeme begründet ist, oder daher rührt, daß derartige chemische Reaktionssysteme als “einfache“ Modelle für biologische Rhythmen angesehen werden. Während chemische Oszillatoren und rhythmisch ablaufende biologische Systeme ähnliches nichtlineares dynamisches Verhalten aufweisen können, so besteht doch in der Regel zwischen diesen Systemen ein deutlicher Unterschied in ihrer Komplexität.

Oszillierende chemische Reaktionen sind Systeme, die aus einer relativ kleinen Anzahl chemischer Spezies bestehen, die an einem Satz chemischer Umsetzungen teilnehmen und die zu nichtlinearem Verhalten führen. Demgegenüber sind rhythmisch verlaufende biologische Systeme weitaus komplexer [9]; sie finden häufig auf den hierarchischen Ebenen von metabolischen Netzwerken, Organellen, Zellen und sogar von Geweben und Organen statt. Beispiele sind unter anderem die Glycolyse, die ein metabolisches Netzwerk von ca. 10 enzymatischen Reaktionen umfaßt [9, 10]. Sie ist eine Schlüsselreaktion des Stoffwechsels fast aller Zellen. Ihre Aufgabe ist es, die Zellen mit Energie zu versorgen. Oszillationen der

Atmungsaktivität und des Volumens von Mitochondrien aus Rattenleber [11] erfolgen auf der Ebene von Organellen. Dahingegen sind Oszillationen der Konzentration von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in Oocyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* [12], wie auch die Oszillationen der Konzentrationen von NAD(P)H,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{H}^+$  in weißen Blutkörperchen [13, 14], sowie die Ausschüttung von Insulin aus  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse [15, 16] Phänomene, die in der Zelle ablaufen. Als Beispiele für nichtlineare Dynamik in Geweben und Organen seien die Oszillationen von Crasulazeen-Pflanzen [17, 18] erwähnt.

Die Mechanismen, die in biologischen Systemen Rhythmen erzeugen, beruhen in der Regel auf einer Reihe von hochspezialisierten und -spezifischen Agenten, die einfache Moleküle aber auch komplexere Gebilde wie Rezeptoren, Ionenkanäle oder kompartmentierte Systeme sein können. Der hohe Grad an Komplexität ermöglicht sowohl eine hohe Spezifität als auch eine genaue Feinabstimmung der physiologischen Prozesse. Auf der anderen Seite wirkt diese hohe Komplexität dem Verständnis der systemischen Grundlagen dieser biologischen Prozesse dadurch entgegen, daß die Fülle an Details die grundlegenden Mechanismen und deren Nichtlinearitäten überdecken.

Wir stehen also vor der Situation, daß die Dynamik von hochkomplexen biologischen Systemen durch komplexe, auf einem höheren hierarchischen Niveau befindlichen Agenten (z. B. Zellen, Gewebe oder Organe) hervorgerufen wird, während oszillierende chemische Reaktionen, die hierarchisch auf der relativ "einfachen" Stufe der Moleküle stehen, als "geeignete" Modelle für biologische Rhythmen angesehen werden. Nichtsdestotrotz hält diese Analogie, da physikalisch betrachtet sowohl die chemischen Oszillatoren als auch die rhythmisch ablaufenden biologischen Systeme offene Systeme sind. Offene Systeme stehen mit ihrer Umgebung in Energie- und Massenaustausch, und sie dissipieren die zugeführte Energie, indem sie diese verbrauchen. Die dissipierte Energie wird unter anderem verwendet, um selbstorganisierte, nichtlineare Prozesse auszuführen. Damit erfolgt die spontane Rhythmenbildung unter Bedingungen, die fern vom thermodynamischen Gleichgewicht liegen.

Es ist daher nicht überraschend, daß zwischen der Dynamik von chemischen Oszillatoren und von Systemen, die biologische Rhythmen hervorbringen, eine weitreichende Übereinstimmung besteht. Die Frage bleibt jedoch offen, ob oszillierende oder rhythmische Dynamik in biologischen oder biochemischen Systemen auch auf der hierarchischen Ebene von Molekülen hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wird in der vorliegenden Habilitationsschrift über Untersuchungen von nichtlinearer Dynamik in enzymatischen Reaktionssystemen berichtet. Untersucht wurden möglichst einfache oder gar minimale Enzymsysteme, die aus jeweils einem einzigen Enzym und dessen Substraten bestehen. Bei den Agenten in diesen Reaktionssystemen handelt es sich (fast) ausschließlich um Moleküle, so daß die Lücke zwischen den verschiedenen Organisationshierarchien von biologischen rhythmischen Systemen und chemischen Reaktionen geschlossen wird.

Numerische Studien von Enzymreaktionen unter offenen Bedingungen (z. B. bei Zu-

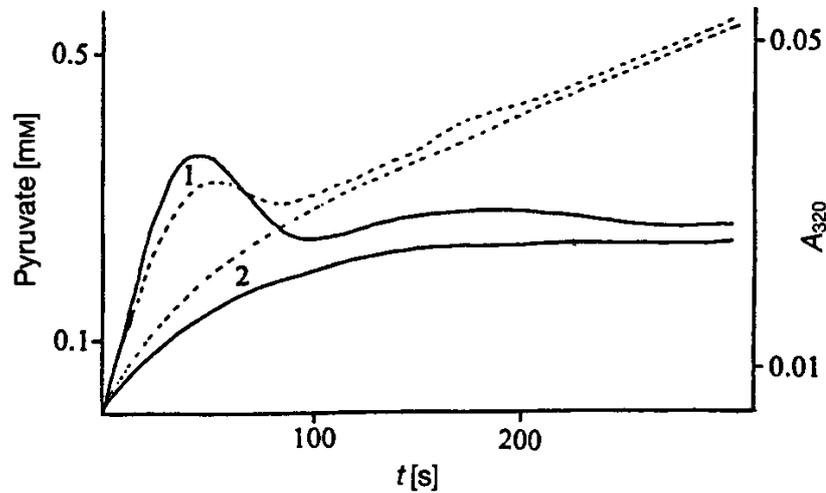


Abb. 1.1: Typischer Datensatz, dessen Dynamik als rhythmisches Verhalten von Enzymen interpretiert wird. Häufig werden nur eine oder zwei Oszillationen gezeigt. Hier am Beispiel des zeitlichen Verlaufs der Pyruvat-Konzentration während der Reaktion mit Pyruvatdecarboxylase (Kurve 1; Kurve 2 zeigt das Verhalten mit irreversibel verändertem Enzym) [21].

und Abfluß von Substraten bzw. Produkten und Reaktionsteilnehmern), bei denen die Enzymkinetik entweder durch den Michaelis-Menten-Formalismus oder durch explizitere kinetische Ansätze wiedergegeben wird, deuten darauf hin, daß oszillierende oder rhythmische Dynamik eine häufig zu erwartende Dynamik von Enzymreaktionen darstellt [19, 20, 21]. Tatsächlich findet man in der Literatur eine Reihe von experimentellen Arbeiten, die über rhythmisches Verhalten in einfachen Enzymsystemen berichten [21, 22, 23, 24, 25]. Leider werden aber in den meisten Veröffentlichungen entweder nur sehr kurze Zeitserien abgebildet, die nur eine oder zwei, häufig gedämpfte, Oszillationen zeigen (Abb. 1.1), oder die präsentierten Daten sind mit einer erheblichen Drift bzw. Rauschen überlagert, so daß es kaum möglich ist zu unterscheiden, ob es sich dabei um generisches dynamisches Verhalten oder um Fluktuationen handelt.

Eine andere Komplikation tritt in Arbeiten auf, in denen der zeitliche Verlauf einer Kenngröße verfolgt wird, deren Bestimmung durch Probenentnahme und anschließende -analyse erfolgt. Eine solche typische Kenngröße ist die Enzymaktivität, die mittels invasiver und zeitintensiver Verfahren bestimmt werden muß. Dadurch hat man es mit Zeitserien zu tun, die aus wenigen Meßpunkten bestehen, die oszillatorische Dynamik zeigen oder darauf hindeuten (Abb. 1.2). Allerdings ist es meist schwierig, die Fehlergrenzen der Analyseverfahren abzuschätzen und somit zu beurteilen, inwieweit die gemessenen Daten tatsächlich oszillatorisches Verhalten zeigen, oder eher die Wunschvorstellung der Autoren widerspie-



ten des natürlichen, biologischen Vorbilds nach. Damit sind sorgfältig geplante und hergestellte biomimetische Systeme ausgezeichnete Analoga zu den biologischen Vorbildern. Dagegen sind *bioinspirierte* Systeme künstliche Modellsysteme, die nur gewisse systemische Eigenschaften eines biologischen Vorbilds wiedergeben, wobei Analogien struktureller Art in der Regel nicht vorhanden sind. Somit sind bioinspirierte Systeme am weitesten vom biologischen System entfernt, denn sie dienen der Untersuchung einer speziell ausgewählten Eigenschaft des biologischen Vorbilds; die anderen Eigenschaften können durchaus stark abweichen.

Fände man neben der Peroxidase-Oxidase-Reaktion weitere eindeutig oszillierende Enzym- bzw. Enzymmodell-Systeme, so wäre der Nachweis erbracht, daß Enzymsysteme generell komplexe Dynamik hervorbringen können. Ist dies der Fall, so gilt es, die Reaktionsmechanismen dieser Enzymsysteme aufzustellen, zu verfeinern, zu reduzieren und vor allem zu untersuchen. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf die Erforschung der Quellen von nichtlinearem Verhalten gelegt. Eine wichtige Frage ist in diesem Zusammenhang, ob alle oszillierenden Reaktionssysteme ihr nichtlineares dynamisches Verhalten auf Grund eines einheitlichen mechanistischen Schemas hervorbringen oder ob es eine Vielzahl von Quellen nichtlinearen Verhaltens in Enzymsystemen gibt.

Enzymatische Reaktionen führen wichtige physiologische Funktionen aus bzw. sie sind an diesen beteiligt. Aus diesem Grund gilt es zu erforschen, inwieweit die *in vitro* beobachteten Oszillationen, auch unter *in vivo* Bedingungen auftreten oder auftreten könnten. Schließlich wird der Frage nachgegangen, ob der komplexen Reaktionsdynamik von einfachen, minimalen Enzymsystemen bereits biologische Funktion zukommt, oder ob diese Dynamik nur als "zufälliges Nebenprodukt" der hochspezifischen Enzyme aufzufassen ist.

Im Folgenden werden drei minimale Enzym- bzw. Enzymmodell-Systeme studiert, die aus möglichst einem einzigen Enzym und dessen Substraten bestehen. Um den Gegenstand der Untersuchungen übersichtlicher zu gestalten, beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf Reaktionssysteme, deren Enzyme oder Enzym-Modellverbindungen eine Metallporphyrin-Gruppe als aktives Zentrum aufweisen. Beim ersten untersuchten System handelt es sich um ein echtes biologisches System, der Peroxidase-Oxidase-Reaktion (Kapitel 2). Die in Kapitel 3 besprochene Hemin –  $\text{H}_2\text{O}_2$  –Sulfit-Reaktion stellt ein bioinspiriertes System dar, während das in Kapitel 4 untersuchte Cytochrom P450-Modellsystem ein typisches biomimetisches System ist. Damit werden in der vorliegenden Habilitationsarbeit sowohl Studien am biologischen Objekt, sowie Untersuchungen an biomimetischen und bioinspirierten Systemen durchgeführt.



# Kapitel 2

## Die Peroxidase – Oxidase – Reaktion

### 2.1 Einführung

Peroxidasen sind ubiquitäre Enzyme, die die Oxidation einer großen Anzahl von Substraten durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) katalysieren. Diese Enzyme können statt  $H_2O_2$  auch molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) als Oxidationsmittel verwenden. In diesem Fall besitzen sie die Wirkung von Oxidasen. Typischerweise werden in diesen Umsetzungen elektronenreiche Substrate, wie Indol-3-essigsäure oder NADH oxidiert. In dieser Arbeit soll unter Peroxidase-Oxidase-(PO)-Reaktion die durch Peroxidase katalysierte Oxidation von NADH durch  $O_2$  verstanden werden, deren Gesamtreaktion nach



erfolgt.

Die Peroxidase-Oxidase-Reaktion wurde während der letzten vier Jahrzehnte ausführlich untersucht. Sie stellt das am besten erforschte Enzymsystem dar, welches nichtlineares Verhalten zeigt. Weitaus am häufigsten wird in den Studien das Enzym aus Meerrettichwurzeln verwendet, obwohl Enzyme aus anderen Organismen (Kuhmilch [27, 30], Sojabohnen [30], dem Pilz *Copriunus cinereus* [30]) ebenfalls reichhaltiges dynamisches Verhalten hervorrufen. Da etwa 80% der Peroxidase in den Zellen der Meerrettichwurzeln cytosolisch, d. h. im Zellplasma gelöst, vorliegt [31], werden die Untersuchungen zur Dynamik der Peroxidase-Oxidase-Reaktion in homogenem, flüssigem Medium durchgeführt.

Thematisch befassen sich die aktuellen Forschungsaktivitäten vor allem mit der Dynamik der Peroxidase-Oxidase-Reaktion und mit der Aufklärung der Details ihres Reaktionsmechanismus.

## 2.2 Dynamik

Nichtlineares dynamisches Verhalten in Form von gedämpften Oszillationen wurde in der Peroxidase-Oxidase-Reaktion erstmals 1965 beobachtet [26]; seitdem wird die Dynamik des PO-Systems ausführlich untersucht. So wurde bald gezeigt, daß diese Enzymreaktion in Durchflußrührreaktoren, in denen offene Bedingungen realisiert werden können, auch autonome, ungedämpfte Oszillationen hervorbringt [27, 29]. Die Oszillationen können entweder einfach periodisch sein, oder aber komplexere Periodizität aufweisen. Dieses Reaktionssystem kann ferner deterministisch chaotische Zeitserien hervorbringen. In der Tat wurde in Untersuchungen der PO-Reaktion erstmalig chaotische Dynamik in einem chemischen bzw. biochemischen Reaktionssystem nachgewiesen [32]. Unter etwas anderen Reaktionsbedingungen wurde quasiperiodisches Verhalten beobachtet [33, 34]. Ferner kennt man Reaktionsbedingungen, bei denen das PO-System bistabil ist [28, 35]. Dieses reichhaltige dynamische Verhalten ist in den Übersichtsartikeln [36] und [37] zusammengefaßt, welche die Arbeiten zur Reaktionsdynamik berücksichtigen, die bis ca. 1991 bzw. 1999 veröffentlicht worden sind.

Die im Rahmen des Habilitationsvorhabens durchgeführten Studien zur Reaktionsdynamik sollten ermitteln, welche Dynamik das PO-System im pH-Bereich von  $5,2 \leq \text{pH} \leq 6,3$  zeigt [P1, P2, P4, P5]. Dazu wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Zuflußrate des Substrats NADH in den Reaktor variiert und der pH-Wert des Mediums mittels eines geeigneten Puffers konstant gehalten wurde. Das sich ergebende dynamische Verhalten wurde beobachtet, wobei die Zuflußrate von NADH als Bifurkationsparameter diente.

Im gesamten untersuchten pH-Bereich zwischen pH 5,2 und 6,3 konnte reichhaltiges dynamisches Verhalten gefunden werden, das sowohl periodische als auch chaotische Zustände umfaßt [P1, P2]. Die Routen ins Chaos, d.h. die Abfolge von dynamischen Zuständen, die bei Änderung des Bifurkationsparameters (hier: die Erhöhung der Zuflußrate an NADH) von stationärem über periodisches zu chaotischem Verhalten führen, wurden bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Für "niedrige" pH-Werte, d.h. für pH-Werte zwischen 5,2 und 5,4 konnte die für diesen Parameterbereich bereits bekannte Dynamik [38] reproduziert werden [P1, P2], nämlich die Perioden-Verdopplungs-Route ins Chaos. Hingegen zeigen die experimentellen Daten, daß für höhere pH-Werte, d. h.  $\text{pH} > 5,4$ , die Dynamik einer anderen Route ins Chaos folgt. Hier beobachtet man eine sogenannte Perioden-Additions-Sequenz [P1, P2]. Diese Sequenz zeichnet sich dadurch aus, daß mit zunehmendem Wert des Bifurkationsparameters die "Einheitszelle" der Oszillationen, die aus einer Schwingung großer Amplitude  $L$  ( $=1$ ) und  $S$  Schwingungen kleiner Amplitude besteht, so geändert wird, daß in zwei aufeinanderfolgenden periodischen Zuständen die Anzahl von Oszillationen kleiner Amplitude sich um 1 unterscheidet. Das heißt, die periodischen Zustände  $L^S$  gehen in die Zustände  $L^{S+1}$  über.

Die Perioden-Additions-Sequenz entspricht der obersten Ebene eines sog. Farey-Baums. Das Konzept der Farey-Sequenzen stammt aus der Zahlentheorie und besagt, daß zwischen zwei rationalen Brüchen  $\frac{p_1}{q_1}$  und  $\frac{p_2}{q_2}$  ein Bruch  $\frac{p_3}{q_3}$  existiert, der nach dem Bildungsgesetz

$$\frac{p_3}{q_3} = \frac{p_1}{q_1} \oplus \frac{p_2}{q_2} = \frac{p_1 + p_2}{q_1 + q_2} \quad (2.2)$$

erzeugt wird. Setzt man die sog. Windungszahl  $\frac{p_i}{q_i}$  gleich dem Verhältnis zwischen der Anzahl an Oszillationen großer und kleiner Amplitude

$$\frac{p_i}{q_i} = \frac{L}{S} \quad (2.3)$$

so kann die Perioden-Additions-Route dadurch erzeugt werden, daß man mit  $\frac{p_1}{q_1} = \frac{0}{1}$  und  $\frac{p_2}{q_2} = \frac{1}{0}$  (d.h. den Zuständen  $0^1$  bzw.  $1^0$  in  $L^S$ -Notation) beginnt und die Sequenz dann "einseitig" fortsetzt. Jede Tochtersequenz  $\frac{p_{i+1}}{q_{i+1}}$  wird aus dem Glied  $\frac{p_i}{q_i}$  und dem Grundglied  $\frac{p_1}{q_1}$  gebildet.

Die Abfolge der Zustände in der Perioden-Additions-Route ins Chaos bei pH = 6,3 wurde einer genaueren Untersuchung unterzogen [P1]. Zum einen wurde ermittelt, daß ein periodischer Zustand  $L^S$  mit zunehmendem Wert des Bifurkationsparameters seine Stabilität über eine Kaskade von Periodenverdopplungen verliert und in eine enge chaotische Domäne mündet. In diesen engen chaotischen Fenstern zwischen zwei benachbarten Mixed-Mode-Zuständen  $L^S$  und  $L^{S+1}$  konnten wiederum engere Domänen von periodischer Dynamik nachgewiesen werden. Bei weiterer Erhöhung des Bifurkationsparameters verliert das chaotische Verhalten seinerseits seine Stabilität und es entstehen Oszillationen der Periodizität  $L^{S+1}$ . Dies gilt für die Abfolge von periodischen Zuständen bis  $L^S = 1^{S_{max}}$  (wobei  $S_{max} = 4$ , wenn 2,4-Dichlorophenol [P1, P2],  $S_{max} = 2$ , wenn 4-Hydroxybenzoesäure [P4] und  $S_{max} = 3$ , wenn Vanillin [P5] als aromatische Kofaktoren eingesetzt werden). Wird die Flußrate (der Bifurkationsparameter) über den Existenzbereich der  $1^{S_{max}}$ -Oszillationen erhöht, so geht das System in ein relativ breites Fenster chaotischer Dynamik über, das bei noch höheren Werten des Bifurkationsparameters periodischen Zuständen weicht, die nur noch aus Oszillationen kleiner Amplitude bestehen ( $L^S = 0^S$ ).

Zur Klassifizierung der Zeitserien des breiten Fensters zwischen den  $1^{S_{max}}$ - und dem  $0^2$ -Zustand als deterministisch chaotisch wurden Methoden der Zeitserienanalytik angewandt [P1, P5]. Die rekonstruierten Attraktoren wurden durch Poincaré-Schnittebenen so geschnitten, daß diese Ebenen genau senkrecht zu den Trajektorien der Attraktoren liegen. Die aus den Durchstoß-Punkten der Trajektorien durch die Poincaré-Schnittebenen ermittelten eindimensionalen Abbildungen ( $x_{i+1}$  gegen  $x_i$ ) sind verzweigt. Die einzelnen Zweige werden von Trajektorienpaaren gebildet, die durch eine Anzahl von  $n$  Oszillationen kleiner Amplitude getrennt sind, deren Amplitude nicht ausreicht, um die Poincaré-Ebene zu schneiden. Dieses Verhalten ist charakteristisch für homokline chaotische

Dynamik [39, 40, 41]. Weitere Unterstützung erfährt dies durch das Vorhandensein eines Sattel-Fokus, der durch den Verlauf eines einzelnen Umlaufs des Attraktors recht gut gezeigt werden kann [P1].

Der Übergang zwischen der Perioden-Verdoppelungs-Route bei pH 5,2 und der Perioden-Additions-Route ins Chaos bei pH 6,3 wurde untersucht, indem die Dynamik der PO-Reaktion in  $\Delta\text{pH}$ -Intervallen von 0,1 bzw. 0,2 pH-Einheiten experimentell ermittelt wurde [P2]. Für pH-Werte unterhalb 5,4 bilden sich Perioden-Verdopplungs-Sequenzen aus, während im Intervall  $5,5 \leq \text{pH} \leq 6,3$  Perioden-Additions-Sequenzen beobachtet werden. Je weiter der pH-Wert von 5,4 entfernt ist, umso ausgeprägter sind die jeweiligen Sequenzen: zum einen weisen sie eine größere Anzahl von komplex-periodischen Zuständen auf, zum anderen ist der Parameterbereich, in dem die einzelnen Zustände existieren, breiter. Nähert man sich  $\text{pH} = 5,4$  an, so beobachtet man, daß sukzessive die periodischen Oszillationen höchster Komplexität verschwinden. Bei  $\text{pH} = 5,4$  treten nur noch Oszillationen der Periode-1 und Periode-2, bzw. der chaotische Zustand auf, so daß eine Klassifizierung nach Sequenz nicht mehr möglich ist, da die höheren Glieder fehlen. Der Übergang zwischen den beiden Routen ins Chaos erfolgt also kontinuierlich und geht mit dem Verlust von periodischen Oszillationen höherer Komplexität einher.

Numerische Simulationsrechnungen wurden unter Verwendung eines detaillierten mechanistischen Modells durchgeführt, das von Bronnikova, Fed’kina, Schaffer und Olsen vorgeschlagen wurde, und als *BFSO*-Modell bekannt ist [42]. Es umfaßt insgesamt 10 chemische Spezies (Variable) und 14 Reaktionsschritte, deren Geschwindigkeitskonstanten mit einer Ausnahme experimentell bestimmt worden sind. Das BFSO-Modell liefert realistische Beschreibungen der Dynamik bei  $\text{pH} \sim 5$ . Obwohl die Geschwindigkeitskonstanten von praktisch allen Teilreaktionen des BFSO-Modells pH-abhängig sind, ist der genaue Zusammenhang experimentell nicht bestimmt worden. Daher haben wir zur Modellierung des pH-Effekts nur die Geschwindigkeitskonstante einer einzigen Reaktion variiert, um die Dynamik der PO-Reaktion bei verschiedenen pH-Werten zu simulieren, nämlich die der Dimerisation der  $\text{O}_2^-$  in [P1] bzw. die der Dimerisation der NAD-Radikale in [P2, P3]. Die Empfindlichkeit der Dimerisation der NAD-Radikale gegenüber dem pH-Wert wird den Protonierungsgleichgewichten ihrer Phosphatgruppen und den, je nach Protonierungsgrad unterschiedlichen, Coulomb’schen Kräften zwischen den geladenen NAD-Radikalen zugeschrieben [P2]. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde die Empfindlichkeit der einzelnen Reaktionsschritte des BFSO-Schemas auf die pH-Wert-analogen Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten systematisch überprüft, wobei festgestellt wurde, daß nur drei der Reaktionen sehr empfindlich auf den pH-Wert reagieren, darunter auch die Dimerisation der NAD-Radikale [43].

Die Simulationsrechnungen der PO-Reaktion für verschiedene Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Dimerisation von NAD-Radikalen zeigen sowohl die Existenz von Perioden-Verdoppelungs- als auch von Perioden-Additions-Sequenzen [P2]. Auch der Über-

gang zwischen diesen Routen ins Chaos wird durch die Simulationsrechnungen gut wiedergegeben: wie im Experiment, beobachtet man auch hier das graduelle Verschwinden der periodischen Oszillationen höchster Komplexität, je weiter man sich dem pH-Wert des Übergangs zwischen beiden Szenarien annähert. Am Übergang selbst ist die Dynamik so "verarmt", daß selbst für die numerischen Daten eine Klassifizierung der Art der Sequenz nicht möglich ist.

Ein weiterer Aspekt, der durch Simulationen genauer beleuchtet wurde, sind die Übergänge zwischen zwei benachbarten periodischen Zuständen  $1^S$  und  $1^{S+1}$  innerhalb einer Perioden-Additions-Sequenz [P3]. Untersucht wurde, wie der Zustand  $1^S$  seine Stabilität verliert und welche dynamischen Zustände im engen Intervall auftreten, bevor der neue Zustand  $1^{S+1}$  erreicht wird. Dazu wurde der Übergang  $1^0 \rightarrow 1^1$  im Detail betrachtet, und die Analogien mit den Übergängen zwischen komplexeren dynamischen Zuständen ( $1^1 \rightarrow 1^2$  und  $1^2 \rightarrow 1^3$ ) ausgearbeitet. Es zeigt sich in den Simulationen, daß in einer Perioden-Additions-Sequenz zwei benachbarte periodische Zustände durch eine enge Domäne komplexer Dynamik getrennt sind. Dabei verliert der Zustand  $1^S$  seine Stabilität zunächst durch Periodenverdopplung, bevor dieser periodenverdoppelte Zustand wiederum einer quasiperiodischen Dynamik weicht. Aus diesem quasiperiodischen Zustand entsteht dann letztendlich der neue Zustand  $1^{S+1}$ .

Die Dynamik in den Übergangsbereichen zwischen den  $1^S$  und  $1^{S+1}$ -Oszillationen wurde für verschiedene pH-Werte (d.h. Werte der Geschwindigkeitskonstante der Dimerisation von NAD-Radikalen) berechnet, so daß die Bedingungen den gesamten pH-Bereich vom Einsetzen der Perioden-Additions-Route bis zur ausgeprägten Sequenz abdecken [P3]. Die Simulationen zeigen, daß im Übergangsgebiet  $1^S \rightarrow 1^{S+1}$  der quasiperiodische Torus umso aufgeweiteter und ausgeprägter ist, je alkalischer das Medium ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Simulationsrechnungen sowohl die Details der Dynamik des Übergangs zwischen den einzelnen Routen ins Chaos als auch die Abfolge der dynamischen Zustände innerhalb der Perioden-Additions-Sequenz überraschend gut wiedergeben, obwohl auch kleinere Unterschiede zwischen den experimentellen und den numerischen Ergebnissen bestehen. Diese betreffen vor allem den Übergang zwischen dem  $1^0$ - und dem  $1^1$ -Zustand. Hier sagen die Simulationsrechnungen einen engen Bereich komplexer Dynamik voraus [P2, P3], der in den Experimenten nicht beobachtet wurde [P1, P2].

## 2.3 Beiträge zum Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus, der der Peroxidase-Oxidase-Reaktion zugrunde liegt, wurde ausgiebig untersucht, wobei von enzymologischer Seite die Reaktionen besonders ausführlich erforscht wurden, an denen das Enzym direkt beteiligt ist. Im Übersichtsartikel [44]

werden die Arbeiten zum Reaktionsmechanismus sowie die Studien zu den Reaktionen, die während der PO-Reaktion stattfinden bzw. stattfinden können, detailliert zusammengefaßt.

Während der Reaktion durchläuft die Peroxidase einen Reaktionszyklus, in dem sie in 5 verschiedenen Oxidationsstufen (+2, +3, +4, +5 und +6) auftritt [45, 46]. Das erste detaillierte Reaktionsmodell, in dem dies berücksichtigt ist, wurde von Yakota und Yamazaki vorgeschlagen [47]. Der in diesem Modell bestimmte enzymatische Reaktionszyklus wird in allen seither vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen für die PO-Reaktion mehr oder weniger streng übernommen. Im Gegensatz zum enzymatischen Teil der PO-Reaktion besteht noch einiger Forschungsbedarf, um einerseits die Bedeutung der nicht-enzymatischen Reaktionsschritte genauer zu verstehen [48, 49], und andererseits die mechanistische Rolle von zwei Substanzen aufzuklären, die als Effektoren der Enzymaktivität wirken.

In den Experimenten werden der Reaktionslösung neben dem Enzym Peroxidase und seinen zwei Substraten NADH und O<sub>2</sub>, auch zwei weitere Substanzen in mikromolekularen Konzentrationen zugesetzt, die die Aktivität der Peroxidase beeinflussen. Es handelt sich dabei um Methylenblau einerseits und eine phenolische Verbindung, in der Regel um 2,4-Dichlorphenol. Diese Effektoren oder Cofaktoren modulieren die Aktivität der Peroxidase, wobei 2,4-Dichlorphenol die Enzymaktivität steigert [50, 51], während Methylenblau als deaktivierend beschrieben wird [27, 51]. Ferner kommt Methylenblau die Aufgabe zu, das Enzym vor Zerstörung durch Radikale zu schützen [51]. Die genaue Wirkungsweise der zwei Effektoren und deren Beteiligung an Reaktionen des PO-Systems ist weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund und eingedenk der niedrigen Konzentrationen der Effektoren in der PO-Reaktion werden diese in den Reaktionsmechanismen des PO-Systems bisher nicht berücksichtigt.

### 2.3.1 Der phenolische Effektor

Werden Experimente in Abwesenheit eines geeigneten phenolischen Effektors durchgeführt, so ist die Dynamik des PO-Systems auf stationäre Zustände (bei pH 6,3) und gedämpfte Oszillationen (bei pH 5,1) beschränkt. Der Effektor 2,4-Dichlorphenol ist also notwendig, um komplexeres Verhalten zu induzieren. Um die mechanistische Rolle zu erforschen, die 2,4-Dichlorphenol in der Peroxidase-Oxidase-Reaktion spielt, wurden Versuchsserien durchgeführt, in denen 2,4-Dichlorphenol durch eine Reihe von phenolischen Verbindungen [**P4**, **P5**, **P6**] sowie durch zwei primäre aromatische Amine [**P4**] ersetzt wurde. Ziel ist es, erstens, sowohl bei pH 5,1 als auch bei pH 6,3 zu ermitteln, ob 2,4-Dichlorphenol durch andere Phenole ersetzt werden kann; zweitens welche Phenole oder aromatische Amine zu komplex-periodischen oder gar chaotischen Oszillationen führen können [**P4**, **P6**]; und drittens welche physikalische Eigenschaft der Phenole für das Auftreten der verschiedenen Arten der Dynamik in der PO-Reaktion verantwortlich ist [**P6**]. Aus diesen Informatio-

nen lassen sich dann Schlüsse bezüglich der mechanistischen Rolle dieser aromatischen Verbindungen ziehen.

Eine Reihe der als mögliche Effektoren getesteten Phenole, sowie Anilin, modulieren die Aktivität der Peroxidase so, daß autonome Oszillationen induziert werden können [P4, P5, P6]. Interessanterweise sind all diese phenolischen Verbindungen Substrate der klassischen Peroxidase-Reaktion, d.h. der enzymkatalysierten Reduktion von  $H_2O_2$  nach



wobei YH für das elektronenliefernde Substrat (in unserem Fall die phenolischen Verbindungen) steht.

Um den Zusammenhang zwischen den molekularen Eigenschaften der Phenole und ihrer Wirkung auf die Dynamik der PO-Reaktion zu ermitteln, wurde eine Studie mit einer Reihe natürlich vorkommender Phenole durchgeführt [P6]. Die eingesetzten Phenole wurden nach Strukturmerkmalen (Substitutionsmuster am Phenylring) ausgewählt. Diese Kriterien wurden dann verglichen mit der Art des komplexesten dynamischen Verhaltens, das diese Verbindungen in der PO-Reaktion hervorrufen konnten. Derartige Vergleiche zeigen, daß die Art der induzierten Dynamik weder mit den Substitutionsmustern am aromatischen Ring, noch mit der Oxidationsstufe des zur phenolischen OH-Gruppe para-ständigen Substituenten korreliert. Das einzige strukturelle Merkmal, das erfüllt sein muß, ist das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am aromatischen Ring.

Die molekulare Eigenschaft der Phenole, die hervorragend mit der induzierten Dynamik korreliert, ist das elektrochemische Potential der Oxidation der Phenole zu den jeweiligen Phenyl-Radikalen [P6] nach



Phenole, deren Halbwellen-Potentiale  $E_{1/2}$  zwischen 890 und 960 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode betragen, sind in der Lage, im PO-System komplexe oder chaotische Dynamik hervorzubringen. Je weiter das Halbwellen-Potential der Phenole von diesen Werten entfernt liegt, desto einfacher wird die Dynamik, die das jeweilige Phenol induzieren kann. Diese Feststellungen weisen darauf hin, daß im Mechanismus Reaktionen von sehr großer Bedeutung sind, bei denen jeweils ein Elektron übertragen wird.

Um die etwaigen Reaktionsprodukte der Umsetzungen, an denen der phenolische Effektor teilnimmt, zu ermitteln, wurden verschiedene dynamische Zustände der PO-Reaktion mittels Membran-Inlet-Massenspektroskopie verfolgt [P6]. Die Massenspektren zeigen keinerlei Intensität bei Massenzahlen  $m/z$ , die den etwaigen Dimerisations- oder Radikaladditions-Produkten entsprechen würden. Stattdessen bleibt die Intensität des Massenpeaks während der gesamten Reaktion im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant bei 100% des eingesetzten Phenols. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß, sobald

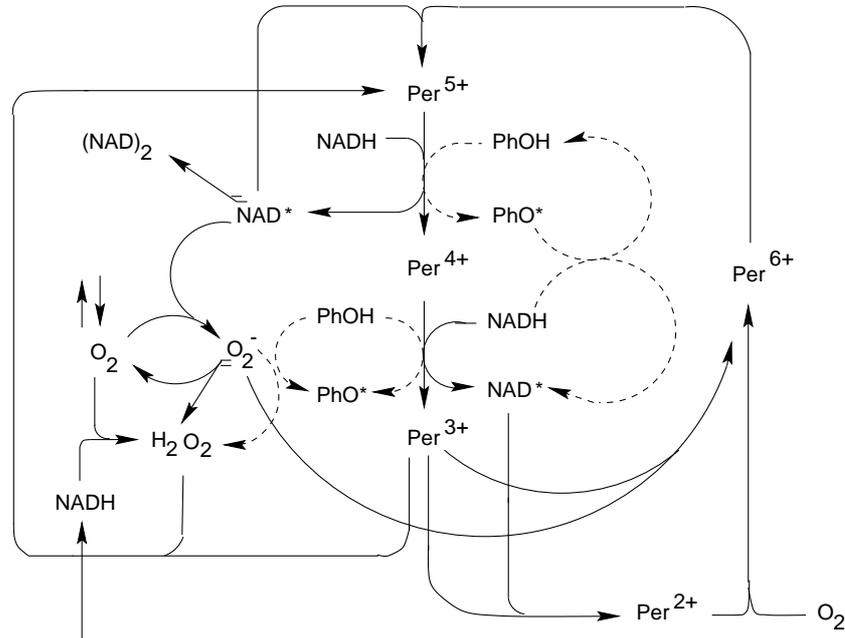


Abb. 2.1: Das ursprüngliche Reaktionsschema der PO-Reaktion nach Bronnikova, Fed'kina, Schaffer und Olsen (BFSO) [42] wird durch durchgezogene Linien wiedergegeben. Die in [P6] postulierten Reaktionen der phenolischen Effektoren sind als gestrichelte Linien eingetragen. Die verschiedenen Oxidationsstufen der Peroxidase werden mit  $Per^{2+}$ ,  $Per^{3+}$ ,  $Per^{4+}$ ,  $Per^{5+}$  und  $Per^{6+}$  bezeichnet. Abbildung entnommen aus [P7].

Phenyl-Radikale gebildet werden, diese sofort wieder zum Phenol reduziert werden. Wir postulieren daher, daß die Phenole als Elektronenüberträger fungieren und während der PO-Reaktion nicht verbraucht werden.

Schließlich wird aus den experimentellen Ergebnissen ein Reaktionsmechanismus postuliert, der die Wirkungsweise der phenolischen Effektoren im PO-System wiedergibt [P6]. Ein Vergleich der Halbwellen-Potentiale  $E_{1/2}$  der Phenole mit den Ein-Elektronen-Redoxpotentialen  $E'_0$  der verschiedenen Enzymformen zeigt, daß sowohl  $Per^{5+}$  als auch  $Per^{4+}$  (d.h. Enzym in den Oxidationsstufen +5 und +4) das Phenol nach Reaktion (2.5) zum Radikal oxidieren können. Die Reduktion der gebildeten Phenyl-Radikale erfolgt durch das in großem Überschuß vorhandene  $NADH$ . Abbildung 2.1 faßt das gesamte Reaktionsschema der PO-Reaktion zusammen, das aus dem BFSO-Mechanismus [42] besteht sowie aus den in [P6] hergeleiteten Erweiterungen durch die Reaktionen, an denen die phenolischen Effektoren beteiligt sind.

### 2.3.2 Methylenblau

Methylenblau ist ein Effektor, der die Aktivität der Peroxidase verringert [27, 51]. Diese Substanz wurde in das Reaktionssystem eingeführt, um die Oszillationen zu stabilisieren [27, 47, 51].

In [P7] wird der Einfluß der Konzentration an Methylenblau auf die Dynamik der PO-Reaktion untersucht, wobei ungedämpfte Dynamik beobachtet werden kann, wenn die Reaktionslösung zwischen  $5 \text{ nmol l}^{-1}$  und  $250 \text{ nmol l}^{-1}$  Methylenblau enthält. Ohne Methylenblau zeigt die PO-Reaktion ausschließlich gedämpfte Oszillationen. Zugleich wird Enzym durch irreversible Zerfalls- oder Inaktivierungsreaktionen aus dem PO-Reaktionssystem entzogen. Bei Konzentrationen  $[\text{MB}]_0 > 250 \text{ nmol l}^{-1}$  beobachtet man wieder nur gedämpfte Oszillationen, wobei gezeigt wurde, daß das gesamte Enzym im Reaktionszyklus verbleibt und nicht durch Zufallsreaktionen abgebaut wird [P7]. Bei Methylenblau-Überschuß wird also der inhibierende Effekt von Methylenblau dominierend.

Ungedämpfte Oszillationen treten bei Anwesenheit von geringen bis mittleren Konzentrationen an Methylenblau auf. Dabei nehmen die Amplituden der Oszillationen mit zunehmender Methylenblau-Konzentration ab. Besonders ausgeprägt ist der Einfluß von Methylenblau auf die Amplituden der Oszillationen der reduzierten Form des Enzyms ( $\text{Per}^{2+}$ ), die ebenfalls stark abnehmen und für  $[\text{MB}]_0 \geq 100 \text{ nmol l}^{-1}$  im Rahmen der Meßgenauigkeit verschwinden [P7]. Interessanterweise geht mit der Abnahme der Oszillationsamplituden kein Verlust an Komplexität der Dynamik einher.

Der ausgeprägte Einfluß der Methylenblau-Konzentration auf die Oszillationsamplituden der Enzymspezies, insbesondere auf die reduzierte Enzymform  $\text{Per}^{2+}$ , legt nahe, daß Methylenblau entweder die Bildung oder die Anreicherung von  $\text{Per}^{2+}$  während der Reaktion verhindert. Letztendlich bewirken diese beiden Möglichkeiten, daß weniger Enzym zur oxidierten Form  $\text{Per}^{6+}$  umgesetzt wird, so daß die Oszillationsamplituden mit zunehmender Methylenblau-Konzentration kleiner werden [P7].

Ein prinzipiell wichtiges Ergebnis aus der Untersuchung der Rolle von Methylenblau in der PO-Reaktion stellt der erstmalige experimentelle Nachweis dar, daß die reduzierte Form der Meerrettich-Peroxidase ( $\text{Per}^{2+}$ ) an den Oszillationen beteiligt ist. Die Feststellung ist vor allem von Bedeutung, da die Beteiligung von  $\text{Per}^{2+}$  an der PO-Reaktion in einigen Reaktionsmechanismen postuliert worden ist [42, 52, 53]. Dabei zeigen jene Reaktionsmechanismen, die Reaktionen der Oxidationsstufe +2 der Peroxidase ( $\text{Per}^{2+}$ ) miteinbeziehen, unter gewissen Bedingungen chaotisches Verhalten [42, 52, 53], während solche, die diese Oxidationsstufe nicht berücksichtigen [47, 54, 55], nur zu stationärem und periodischem Verhalten fähig sind.

Neueste Arbeiten haben nachgewiesen, daß das PO-System lichtempfindlich ist [56]. Diese Photosensitivität wird durch Methylenblau hervorgerufen, das photochemische Umsetzungen mit NADH (und deren Abkömmlingen) eingeht. Als Folge dieser Lichtempfind-

lichkeit kann die Dynamik der Peroxidase-Oxidase-Reaktion durch geeignete Beleuchtung gesteuert und manipuliert werden.

## 2.4 Oszillationen unter *in vivo*-Bedingungen?

Die Peroxidase-Oxidase-Reaktion wird von Pflanzen auch *in vivo* durchgeführt, wobei NADH umgesetzt wird, das aus der Oxidation von Malat im Zitronensäure-Zyklus stammt [57, 58, 59]. Ob in den lebenden Zellen diese Reaktion auch oszillatorisch verläuft, ist nicht bekannt. In diesem Abschnitt werden Ergebnisse von Versuchen zusammengefaßt, in denen einige der künstlichen Bedingungen der *in vitro*-Versuche an jene Bedingungen angenähert wurden, die in natürlichen *in vivo* Systemen vorherrschen.

Bisher wurden *in vitro* Oszillationen im PO-System untersucht, die typischerweise 2,4-Dichlorphenol als phenolischen Effektor enthalten. Dieser Aktivator stellt eine nicht-physiologische Verbindung dar, die erhebliche Toxizität aufweist. Daher bedeutet die in Abschnitt 2.3.1 berichtete Tatsache, daß auch natürlich vorkommende Phenole komplexe oszillatorische Dynamik hervorbringen können, einen ersten Schritt, der darauf hinweist, daß die Peroxidase-Oxidase-Reaktion tatsächlich auch in lebenden Organismen in oszillatorischer Form vorkommen könnte. So ermöglichen der in Meerrettichwurzeln vorkommende [60] Effektor 4-Hydroxybenzoesäure [**P4**, **P6**], das in Pflanzen häufige [61] Vanillin [**P5**, **P6**], und das in tierischen Zellen vorkommenden Umbelliferon [**P6**] dieselbe reichhaltige Dynamik, die man von der PO-Reaktion mit dem klassischen Effektor 2,4-Dichlorphenol kennt.

Als nächstes wurde ermittelt, welche dynamische Antwort Zellextrakte zeigen, die aus Meerrettichwurzeln gewonnen wurden, wenn einer Suspension dieser Extrakte das Substrat NADH zugefügt wird [**P5**]. Dazu wurden wildwachsende Meerrettichwurzeln ausgegraben und daraus nach einem modifizierten Verfahren nach Elstner und Heupel [57] Zellextrakte hergestellt [**P5**]. In den Versuchen wird die Zell- und Membran-freie Fraktion des Zellextrakts verwendet, da diese turbide Suspension hauptsächlich die cytosolischen Komponenten enthält.

Verfolgt wird der Übergang zwischen dem stationären Zustand, der unter anaeroben Bedingungen eingenommen wird ( $N_2$ -Atmosphäre), zu einem neuen Zustand, den das System einnimmt, sobald die Zusammensetzung der Gasphase Sauerstoff enthält. In Anwesenheit der Effektoren Methylenblau und 2,4-Dichlorphenol beobachtet man, daß dieser Übergang erfolgt, indem Sauerstoff sich überschußartig im Zellextrakt kurzzeitig anreichert, bevor sich die Sauerstoffkonzentration über sehr stark gedämpfte Oszillationen dem sauerstoff-“reichen” stationären Zustand annähert.

Zellfreie Zellextrakte enthalten einen reichhaltigen und in seiner Zusammensetzung undefinierten “Cocktail“ von Enzymen, der neben der Peroxidase auch andere Oxidasen

enthält, die mit der Peroxidase um Substrate konkurrieren können. Eines der Enzyme, das in den Extrakten vorkommt ist die Superoxid-Dismutase, welche  $O_2^-$ -Radikale hocheffektiv abfängt. Da aber dieses Radikal ein wichtiges Intermediat der PO-Reaktion ist (siehe Abb. 2.1), wirkt die Superoxid-Dismutase der Entstehung von Oszillationen der Peroxidase-Oxidase-Reaktion entgegen. Es ist also nicht selbstverständlich, daß Oszillationen der PO-Reaktion in den Zellextrakten auftreten können. Umso bemerkenswerter ist, daß es in den Zellextrakten aus Meerrettichwurzeln zu gedämpften Oszillationen des PO-Systems kommt. Umso mehr deuten die stark gedämpften Oszillationen darauf hin, daß in einem intakten biologischen System Oszillationen der PO-Reaktion auftreten können.

Unterstützt wird die obige Annahme durch die empirische Beobachtung, daß die Induktion von (stark gedämpften) PO-Oszillationen nur in Extrakten beobachtet wurde, deren Wurzeln im Spätherbst geerntet werden. Diese jahreszeitliche Abhängigkeit der Dynamik korreliert gut mit den Expressionsraten des Enzyms, das im Spätherbst besonders stark exprimiert wird, da Peroxidase am Aufbau von Zellwänden beteiligt ist [62].

Oszillierendes Verhalten in der Aktivität von Peroxidase konnte vor kurzem erstmals in Blättern von Reispflanzen nachgewiesen werden, die mit dem Pilz *Pyricularia oryzae*, dem Erreger des Blattbrandes, infiziert wurden [63]. Die Oszillationen der Peroxidase-Aktivität bestätigen frühere Hinweise, daß derart geschädigte Reispflanzen Peroxidase-kontrollierte Oszillationen der  $O_2^-$ -Konzentration hervorbringen, die ein Teil der frühen Immunantwort der Pflanze auf Infektionen sind [64].

## 2.5 Mögliche biologische Bedeutung der Oszillationen

Oszillationen in biochemischen Systemen *in vivo* dienen verschiedenen physiologischen Funktionen. Oszillationen und Wellen von sekundären Botenstoffen, wie  $Ca^{2+}$ , wirken als Informationsüberträger in der zellulären Kommunikation [12, 65], wobei der Informationsgehalt in der Form der Oszillationen codiert ist [65]. Ferner wirken Oszillationen als Taktgeber für physiologische Vorgänge [9]. Im Falle der Peroxidase-Oxidase-Reaktion ermöglichen Oszillationen eine erhöhte thermodynamische Effektivität des Reaktionssystems im Vergleich zu einer entsprechenden stationären Reaktionsführung [66].

In den Aufsätzen [P8, P9] wird eine weitere mögliche Funktion der Oszillationen nachgewiesen: Die oszillierende Dynamik schützt das Enzym vor irreversibler Desaktivierung durch schädliche Substanzen, die während des enzymatischen Reaktionszyklus oder durch andere metabolische Reaktionen erzeugt werden. Im Verlauf der PO-Reaktion werden die reaktiven sauerstoffhaltigen Verbindungen  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  gebildet und umgesetzt (Abb. 2.1). Diese Spezies, die auch als sekundäre Botenstoffe wirken [14], sind einerseits integraler Bestandteil der PO-Reaktion, andererseits besitzen sie die Fähigkeit, die Peroxidase irreversibel zu deaktivieren.

Untersucht wird das Verhalten der PO-Reaktion in einem bistabilen Parameterbereich einer subkritischen Hopf-Bifurkation, in dem ein stationärer Zustand und ein Grenzyklus koexistieren [P8, P9]. Der Umsatz an NADH ist in beiden Fällen gleich groß, so daß ein direkter Vergleich möglich ist. In beiden Fällen treten nur drei der fünf Oxidationsstufen des Enzyms in meßbaren Konzentrationen auf, so daß die Summe  $\Sigma = [\text{Per}^{2+}] + [\text{Per}^{3+}] + [\text{Per}^{6+}]$  mit der Gesamtkonzentration des Enzyms zu jedem Zeitpunkt der Reaktion gleichgesetzt werden kann, vorausgesetzt, ein Zerfall des Enzyms findet während der PO-Reaktion nicht statt.

Aus den Experimenten geht hervor, daß  $\Sigma(t)$  weder in oszillierenden noch in stationären Zeitserien der PO-Reaktion konstant ist, was auf eine irreversible Inaktivierung des Enzyms hindeutet [P8, P9]. Spektroskopische Daten legen nahe, daß das Proteingerüst des Enzyms und nicht dessen Porphyrin-Einheit durch Radikale angegriffen wird [P8]. Vergleicht man die Rate, mit der die Peroxidase inaktiviert wird, so stellt man fest, daß die Inaktivierung während nicht-oszillierender Reaktionsführung stets deutlich schneller voranschreitet als im oszillierenden Regime [P8, P9]: so sind im oszillierenden Zustand nach 12000 s etwa 15% des Enzyms inaktiviert, während bei stationärer Reaktionsführung der “Verlust” fast die Hälfte des eingesetzten Enzyms beträgt [P8].

Die Rate an Enzym-Inaktivierung hängt auch von der Konzentration des phenolischen Effektors ab, wobei bei diesem funktionellen Zusammenhang ebenfalls unterschieden werden muß zwischen oszillatorischer und stationärer Dynamik [P9]. Während eine Erhöhung der Konzentration des phenolischen Effektors die Inaktivierung des Enzyms in oszillatorischen Versuchen deutlich verlangsamt, zeigen analoge Änderungen der Reaktionsbedingungen kaum einen Einfluß bei entsprechenden nicht-oszillierenden Zeitserien.

Die Inaktivierung der Peroxidase wird Reaktionen von reaktiven Intermediaten wie  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxylradikalen mit dem Enzym zugeschrieben [P8, P9]. Um diesem Verhalten in den Simulationen Rechnung zu tragen, wird dem Reaktionsmechanismus [42] (Abb. 2.1) eine weitere Reaktion zugefügt,



die die Inaktivierung des Enzyms beschreibt. Dabei ist für die Modellierung unwichtig, welche der reaktiven Spezies ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$ ) in Reaktion (2.6) nun tatsächlich die Bildung der inaktivierten Form des Enzyms,  $\text{Per}_{\text{inaktiv}}$ , hervorruft, da die Wahl der reaktiven Spezies für die Ergebnisse nicht kritisch ist. Die  $\text{O}_2^-$ -Radikale bieten sich an, da diese bereits im Mechanismus der PO-Reaktion vorkommen.

Auch in den Simulationsrechnungen wird das Enzym langsamer inaktiviert, wenn die Dynamik oszillatorisch ist. Ein wichtiger Vorteil der Simulationen ist, daß die Konzentrationen aller Reaktionsteilnehmer zugänglich sind. Vergleicht man nun die  $\text{O}_2^-$ -Konzentration des stationären Zustandes (die laut Annahme, nach Reaktion (2.6) ausschließlich für die Inaktivierung verantwortlich ist) mit der über eine Oszillationsperiode gemittelte  $\text{O}_2^-$ -

Konzentration einer entsprechenden oszillatorischen Zeitserie, so stellt man fest, daß die gemittelte  $O_2^-$ -Konzentration der oszillatorischen Zeitserien um das fünf- bis achtfache niedriger ist als die bei stationärer Reaktionsdynamik [**P8**, **P9**]. Die größere Stabilität des Enzyms im oszillatorischen Zustand läßt sich leicht damit erklären, daß der potentiell enzschädigende Metabolit  $O_2^-$  in deutlich niedrigerer mittlerer Konzentration vorliegt. Ein weiterer Vorteil der oszillatorischen Dynamik ist, daß die  $O_2^-$ -Konzentration kurzzeitig am Maximum der Oszillationen sehr hohe Werte erreicht, was eine Informationsübertragung mittels dieses sekundären Botenstoffs erlaubt.

Weitere Simulationsrechnungen wurden mit einer Variante des BFSO-Mechanismus durchgeführt, der explizit die Umsetzungen des phenolischen Effektors berücksichtigt [**P9**]. Die Modellrechnungen zeigen, daß eine Erhöhung der Konzentration des phenolischen Effektors zunächst ein Absinken der  $O_2^-$ -Konzentration bewirkt, die dann ab einer Effektor-konzentration von ca.  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  einen Sättigungswert erreicht. Dieser Zusammenhang ist für oszillatorische Zeitserien ausgeprägter als für eine stationär verlaufende Reaktion. Für oszillierende Zeitserien führt die Erhöhung der Effetorkonzentration zu einer scheinbar widersprüchlichen Beobachtung, nämlich einem Absinken der mittleren  $O_2^-$ -Konzentration bei gleichzeitig höheren Maximalwerten dieser Konzentration. Dies liegt darin begründet, daß auch die Form der Oszillationen sich mit der Effetorkonzentration ändert.

Betrachtet man die berechneten Konzentrationen aller Intermediate für die beiden stabilen Zustände des bistabilen Systems, so stellt man fest, daß sich die Konzentrationen von drei Spezies um etwa zwei Größenordnungen unterscheiden. Da aber der Gesamtumsatz an NADH in der bistabilen Domäne des PO-Systems annähernd unabhängig von dem jeweiligen dynamischen Zustand ist, ist es durchaus denkbar, daß dem Übergang zwischen oszillatorischer und stationärer Dynamik eine weitere physiologische Funktion zugeschrieben werden kann. Solch instantane Übergänge, die eine drastische Änderung der Konzentration eines Nebenproduktes bei gleichzeitig konstanter Produktionsrate des Hauptprodukts hervorrufen, entsprechen einem Schalten zwischen zwei Reaktionspfaden. Diese Fähigkeit ermöglicht es biologischen Systemen, extrem rasch auf Änderung ihrer Umweltbedingungen zu reagieren. Eine derartige Rolle kann auch dem PO-System als Bestandteil des Immunsystems [63] zugeschrieben werden [**P9**].



# Kapitel 3

## Die Hemin – Wasserstoffperoxid – Sulfid – Reaktion

### 3.1 Einführung

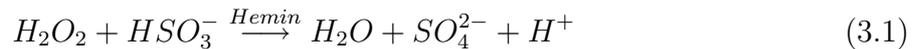
Das Hemin - Wasserstoffperoxid - Sulfid-Reaktionssystem wurde entwickelt [P10, P11, P12], um die Anzahl jener Enzym- bzw. Enzymmodell-Systeme zu erweitern, die nichtlineares dynamisches Verhalten zeigen. Es handelt sich in zweifacher Hinsicht um ein minimales Modellsystem. Zum Einen kommt es mit einer kleinstmöglichen Anzahl an Reaktanden aus, nämlich den beiden Substraten Sulfid ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und dem Hemin als Katalysator. Die zweite Ebene der Abstraktion stellt die Verwendung von Hemin als Enzym-Modellverbindung dar.

Hemin wird in diesem Reaktionssystem als Modell für die Häm-Gruppe verwendet, die in sehr vielen Enzymen das aktive Reaktionszentrum bildet, also den Teil des Enzyms, an dem die chemische (enzymatische) Umsetzung stattfindet. Der einzige Unterschied zwischen Hemin und Häm ist die Oxidationsstufe des zentralen Eisenatoms, die im Häm +2 und im Hemin +3 beträgt. Die Verwendung von Hemin als Enzym-Modellverbindung für hämhaltige aktive Zentren rückt die Reaktivität der Häm-Gruppe in den Mittelpunkt und vernachlässigt die Funktionen der Proteingerüste von Enzymen. Diese Betonung der Häm-Funktion wird durch die Tatsache motiviert, daß die Reaktivität des Enzyms stark von der Chemie des reaktiven Zentrums abhängt. Die genaue Reaktivität eines hämhaltigen Enzyms wird jedoch vom Proteingerüst des Enzyms moduliert, so daß die eigentliche Wirkungsweise des Enzyms erst durch die Wechselwirkung zwischen der Häm-Gruppe und dem Proteingerüst definiert wird. Das Proteingerüst entscheidet also mit, welche Reaktion ein bestimmtes Häm-haltiges Enzym katalysiert, d.h. ob es als Katalase, Oxidase oder Peroxidase, usw., wirkt.

Gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  und einem geeigneten elektronendonierenden Reaktionspartner be-

sitzt Hemin Peroxidase- [67, 68] und/oder Katalase-Aktivität [68]. Hemin wird aus diesem Grund in vielen Studien als Modell-Verbindung eingesetzt, die die Rolle dieser Enzyme übernimmt [67, 68].

In diesem Kapitel wird die Hemin-medierte Oxidation von Hydrogensulfit (bzw. Sulfit) durch Wasserstoffperoxid zu Sulfat nach



untersucht. Als Reaktionsprodukte werden neben Sulfat und Wasser auch Protonen gebildet, so daß der pH-Wert des Reaktionsmediums durch die Reaktion beeinflußt wird. Eine herausragende Eigenschaft des  $H_2O_2$  - Sulfit - Hemin-Systems ist die Fähigkeit, Oszillationen im pH-Wert des Reaktionsmediums hervorzurufen [P10]. Dies ist von biologischer Relevanz, da viele physiologische Prozesse, wie die Aktivität von Enzymen oder die Permeabilität von Membranen, pH-abhängig bzw. pH-Wert-gesteuert sind. So konnten pH-Oszillationen in biologischen Signaltransduktionskaskaden, in der Glycolyse [69, 70] oder in lebenden Neutrophilen (eine der Arten von weißen Blutkörperchen) [13] nachgewiesen werden.

## 3.2 Dynamik

Die Dynamik des Hemin -  $H_2O_2$  - Sulfit-Systems wurde unter offenen Reaktionsbedingungen als Funktion der Flußrate  $k_0$  der Materiezufuhr und -abfuhr in den, bzw. aus dem Reaktor untersucht [P10, P11]. Für niedrige Flußraten bildet sich ein stationärer Zustand niedrigen pH-Werts aus. Erhöht man die Flußrate über einen kritischen Wert, so treten zunächst einfach-periodische pH-Oszillationen auf. Bei höheren Flußraten beobachtet man in der sauren Domäne des Oszillationszyklus die Entstehung einer zweiten, kleinen Oszillation, die als "Burst" bezeichnet wird [71]; damit besteht der Oszillationszyklus aus einer pH-Oszillation von großer Amplitude und einer Oszillation von kleiner Amplitude. Bei einer stetigen Erhöhung der Flußrate nimmt die Anzahl der Oszillationen kleiner Amplitude, die pro Oszillationszyklus auftreten, um jeweils ein weiteres pH-Minimum (um einen weiteren "Burst") zu. Bei hohen Flußraten beobachtet man dynamische Zustände, die viele Bursts aufweisen, wobei innerhalb einer Zeitserie sowohl die Anzahl als auch die Amplitude der Bursts in den einzelnen Oszillationszyklen scheinbar unregelmäßig variiert. Bei noch höheren Flußraten geht das Reaktionssystem in einen stationären Zustand über, der einen hohen pH-Wert besitzt [P10].

Die Amplituden der pH-Oszillationen können bis zu 2 pH-Einheiten erreichen; das oszillierende System verbleibt aber stets innerhalb des physiologischen pH-Bereichs ( $5.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$ ). Aus der Entwicklung der Oszillationsamplituden in der Nähe der unteren kritischen Flußrate  $k_{0,crit}$ , die den Übergang vom stationären Zustand in den Grenzzyklus

markiert, kann man auf die Art der zugrundeliegenden Bifurkation schließen: Die Oszillationen beginnen mit Amplitude  $A = 0$  (für  $k_0 = k_{0,crit}$ ); mit zunehmender Entfernung von  $k_{0,crit}$  ( $k_0 > k_{0,crit}$ ) wachsen die Amplituden  $A$  nach einem Wurzelgesetz gemäß

$$A = A_{(k_{0,crit})}(k_0 - k_{0,crit})^{1/2} \quad (3.2)$$

an [P10]. Dieses Verhalten ist charakteristisch für superkritische Hopf-Bifurkationen [72].

Im Gegensatz zu den Amplituden der experimentell gemessenen Oszillationen ändern sich deren Perioden nur unwesentlich [P10, P11]. Um periodische und bursting-Oszillationen vergleichen zu können, wird eine ‘‘Periode‘‘ definiert als das zeitliche Intervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden Übergängen des Reaktionsmediums vom Alkalischen ins Saure, gemessen am Minimum des pH-Werts [P11]. Unter Verwendung dieser Arbeitsdefinition betragen die ‘‘Perioden‘‘ der oszillatorischen Zeitserien stets etwa 20 min.

Das interessanteste dynamische Verhalten stellt der Übergang zwischen einfach-periodischen und bursting-Oszillationen dar. Der Typ der Bifurkation, die diesem Übergang zugrundeliegt, konnte aus den experimentellen Daten nicht bestimmt werden [P10, P11]. Die Komplexität innerhalb der Domäne der bursting-Oszillationen nimmt mit der Flußrate über eine Perioden-Additions-Sequenz zu. Die Perioden-Additions-Sequenz des Hemin-Oszillators unterscheidet sich etwas von der, die in der Peroxidase-Oxidase-Reaktion bei  $\text{pH} \geq 5.5$  (Abschnitt 2.2) gefunden wurde: während diese Route in der PO-Reaktion chaotische Fenster aufweist, wurde solches Verhalten im Hemin -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Sulfit-System bisher nicht gefunden. Es ist aber durchaus möglich, daß die unregelmässigen Burst-Oszillationen bei hohen Flußraten chaotisch sein können, jedoch ist es wegen der langsamen Dynamik des Hemin-Oszillators kaum möglich, ausreichend lange Zeitserien zu erzeugen, um diese auf deterministisches Chaos hin zu analysieren.

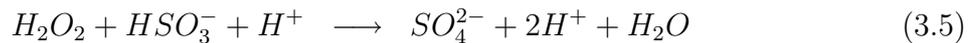
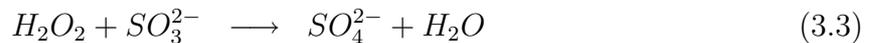
Stichprobenhaft wurde die Dynamik des Hemin-Oszillators auch unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre untersucht, um zu überprüfen, ob und inwieweit das Verhalten des Hemin-Systems durch die in der Luft vorhandenen Gase  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  beeinflusst wird [P10]. So könnten  $\text{CO}_2$  und das daraus nach  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$  entstehende  $\text{HCO}_3^-$  in der Reaktion das  $\text{H}^+$  abfangen oder erzeugen [73, 74], während  $\text{O}_2$  Sulfit zu Sulfat oxidieren kann. Einfach-periodische und bursting-Oszillationen treten sowohl unter atmosphärischen Bedingungen als auch unter Schutzgas auf. Allerdings sind die Perioden der Oszillationen unter Schutzgas etwa doppelt so lang wie jene, die bei ansonsten entsprechender Parameterwahl unter atmosphärischen Bedingungen gemessen werden. Daraus wird geschlossen, daß  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  die Dynamik zwar beeinflussen, aber keine essentielle Spezies für die Entstehung von nichtlinearer Dynamik im Hemin -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Sulfit-System sind [P10].

### 3.3 Beiträge zum Reaktionsmechanismus

#### 3.3.1 Erstellung des Reaktionsmechanismus

Der Hemin-Oszillator ist ein Mitglied der Familie von pH-Oszillatoren, die auf der Oxidation von Sulfit durch  $H_2O_2$  basieren. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Reaktanden und Reaktionen, die einer unbegrenzten katalytischen Produktion von  $H^+$  entgegenwirken [73, 74, 75, 76]. Bisher wurden zu diesem Zweck ausschließlich unphysiologische, anorganische Verbindungen verwendet.

Die unkatalysierte Oxidation von Sulfit bzw. Hydrogensulfit durch Wasserstoffperoxid ist pH-abhängig, wobei im Neutralen und im Sauren die Bildung von  $H^+$  autokatalytisch verläuft [73, 74, 75]. Damit wird eine der grundlegenden Voraussetzungen für das Auftreten von nichtlinearem dynamischem Verhalten erfüllt. Die bereits gut untersuchten Reaktionsschritte (3.3 – 3.6) der direkten Reaktion zwischen  $H_2O_2$  und Wasserstoffperoxid



werden daher im Mechanismus für den Hemin-Oszillator übernommen [P11, P12]. Damit es zu Oszillationen kommen kann, sind Reaktionen notwendig, die einer ungebremsen Produktion von  $H^+$  entgegenwirken (sog. "feed back"-Schritte) [6].

Für das Hemin -  $H_2O_2$  - Sulfit-Systems bestand die Aufgabe darin, die geeigneten "feed back"-Reaktionen zu ermitteln [P11, P12]. Diese Reaktionen sollen einerseits unter Einbeziehung von Hemin  $H^+$  verbrauchen, andererseits die chemischen Umsetzungen des Hemins selbst beschreiben. Als mögliche Kandidaten wurden in der Literatur untersuchte Reaktionen betrachtet. Als  $H^+$ -verbrauchende und erzeugende Umsetzungen kommen zwei pH-abhängige Gleichgewichte zwischen verschiedene Hemin-Spezies in Frage, und zwar die Protonierung/Deprotonierung eines axialen Aquo- bzw. Hydroxoliganden (Reaktion 3.7), sowie die pH-abhängige Dimerisierung des Hemins (Reaktion 3.8):



wobei A,  $A^+$  und  $A_2$  für die verschiedenen Formen des Hemins stehen, wie in Abb. 3.1 dargestellt [P12]. Ferner muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß Hemin durch hochkonzentrierte  $H_2O_2$ -Lösungen irreversibel abgebaut wird. Da aber nicht genau bekannt ist, ob  $H_2O_2$  selbst oder eines seiner Reaktionsprodukte Hemin angreift [77], wird der Abbau von Hemin in der allgemeinen Form



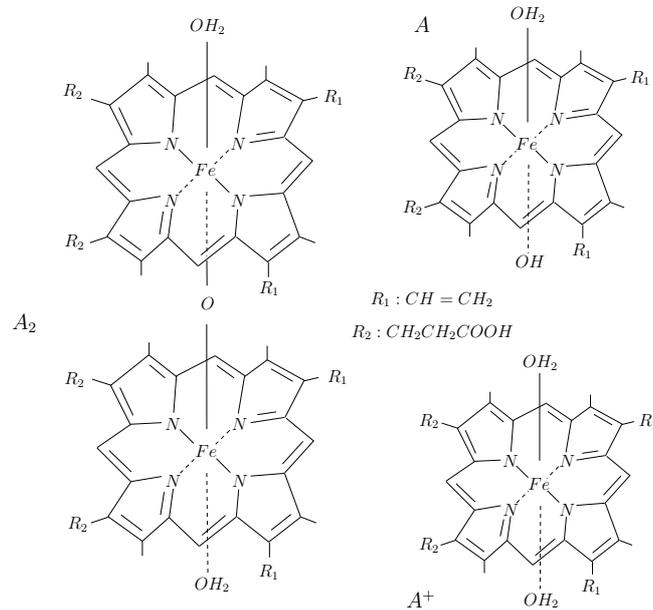


Abb. 3.1: pH-Abhängige Formen von Hemin. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer axialen Liganden. Während A<sup>+</sup> zwei axiale Aquo-Liganden trägt, sind an A je ein Aquo- und ein Hydroxyl-Gruppe koordiniert. A<sub>2</sub> stellt das  $\mu$ -oxo-Dimer dar. Abbildung aus [P12].

in den mechanistischen Studien berücksichtigt [P12], wobei angenommen wird, daß die Abbauprodukte nicht weiter an der Reaktion teilnehmen.

### 3.3.2 Numerische Simulationen

Der Reaktionsmechanismus, der durch Reaktionen (3.3) – (3.9) festgelegt wird, berücksichtigt 7 chemische Spezies. Damit bestehen die Entwicklungsgleichungen des Hemin-Oszillators aus einem gekoppelten Differentialgleichungssystem (3.10), das 7 Variablen enthält, die stark über die Konzentration von Protonen miteinander gekoppelt sind:

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= -k_1 x_1 x_2 + k_4 x_3 - k_5 x_1 x_4 + k_0 (x_1^0 - x_1) \\
 \dot{x}_2 &= -k_1 x_2 x_1 - k_2 x_2 x_3 - k_3 x_2 x_3 x_4 + k_0 (x_2^0 - x_2) \\
 \dot{x}_3 &= -k_2 x_2 x_3 - k_3 x_2 x_3 x_4 - k_4 x_3 + k_5 x_1 x_4 - k_0 x_3 \\
 \dot{x}_4 &= k_2 x_2 x_3 + k_3 x_2 x_3 x_4 + k_4 x_3 - k_5 x_1 x_4 + k_6 x_6 - k_7 x_4 x_5 + k_8 x_5^2 - k_9 x_4 x_7 \\
 &\quad + k_0 (x_4^0 - x_4) \\
 \dot{x}_5 &= k_6 x_6 + k_9 x_4 x_7 - 2k_8 x_5^2 - k_7 x_4 x_5 - k_{10} x_5 + k_0 (x_5^0 - x_5) \\
 \dot{x}_6 &= k_7 x_4 x_5 - (k_0 + k_6) x_6 \\
 \dot{x}_7 &= k_8 x_5^2 - k_9 x_4 x_7 - k_0 x_7
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

Im DGL-System (3.10) entsprechen  $\text{SO}_3^{2-} \leftrightarrow x_1$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow x_2$ ,  $\text{HSO}_3^- \leftrightarrow x_3$ ,  $\text{H}^+ \leftrightarrow x_4$ ,  $\text{A} \leftrightarrow x_5$ ,  $\text{A}^+ \leftrightarrow x_6$  und  $\text{A}_2 \leftrightarrow x_7$ . Die Konzentration der Spezies in den Vorratsbehältern wird mit  $x_i^0$  und die Flußrate mit  $k_0$  bezeichnet.

Ergebnisse der numerischen Untersuchungen des Reaktionsmechanismus (3.10) werden im Aufsatz [P12] berichtet und sollen im Folgenden zusammengefaßt werden. Veröffentlichung [P12] ist gleichzeitig eine Erweiterung der vorangehenden Arbeit [P11] und auch eine Richtigstellung, da in [P11] ein fehlerhaftes Differentialgleichungssystem für die numerische Simulation verwendet wurde.

Um die Art der Bifurkationen zu ermitteln, die für die Änderungen in der Dynamik des pH-Oszillators verantwortlich sind, wurden Kontinuationsrechnungen durchgeführt. Parallel dazu wurden Zeitserien für verschiedene Parameterwerte durch Integration des DGL-Systems (3.10) berechnet. Letztere Methode liefert neben Informationen zur Dynamik auch die Linienform der Oszillationen. Die Information zur simulierten Dynamik des PO-Modells basiert also auf Ergebnissen, die mit diesen zwei Verfahren erhalten wurden [P12].

Die experimentell beobachtete Dynamik des Hemin -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Sulfit-Systems wird weitgehend durch das Differentialgleichungssystem (3.10) modelliert [P12]. Das Einsetzen von Oszillationen bei niedrigen Flußraten erfolgt, in Analogie zu den experimentellen Beobachtungen, über eine superkritische Hopf-Bifurkation. Erhöht man den Wert der Flußrate geringfügig, so steigen die Amplituden der periodischen Oszillationen in einem engen Flußratenintervall (in unmittelbarer Nähe der Hopf-Bifurkation) zunächst rasch an. Anschließend vergrößert sich die Amplitude dieser periodischen Oszillationen nur noch geringfügig. Die Linienformen sowie die Entwicklung der Amplituden der periodischen Oszillationen entsprechen weitgehend der in den Experimenten beobachteten Dynamik.

Bei einer gewissen Flußrate verlieren die periodischen Oszillationen auch in den Simulationsrechnungen ihre Stabilität. Bei höheren Flußraten beobachtet man bursting-Oszillationen, die wiederum stark den experimentellen Oszillationen ähneln. Je höher die Flußrate ist, desto schwächer ausgeprägt ist die Amplitude der bursts [P12]. In guter Übereinstimmung mit den Experimenten sind auch in den Simulationen die Anzahl und Amplitude der bursts unregelmässig [P11].

Probleme bereitet jedoch die Klassifizierung des Übergangs zwischen den periodischen und den burst-Oszillationen [P12]. Hier liefern Kontinuationsrechnungen und direkte numerische Integrationen unterschiedliche Ergebnisse. Laut Kontinuation sollen die periodischen Oszillationen ihre Stabilität über Perioden-Verdoppelungs-Kaskaden verlieren. Demgegenüber liefert die direkte Integration ein anderes Bild: hier tritt zwischen  $n$  periodischen Oszillationen eine Oszillation auf, die bursts aufweist. Die Zahl  $n$  von periodischen Oszillationen zwischen zwei Oszillationen mit bursts nimmt mit höherer Flußrate ab, bis nur noch bursting-Oszillationen vorhanden sind [P12]. Beide Verhalten unterscheiden sich von der experimentell beobachteten Dynamik. In Experimenten wurden keine alter-

nierenden Folgen von periodischen und bursting-Oszillationen (wie in direkt integrierten Zeitserien) beobachtet, sondern eine Art von Perioden-Addition der Anzahl von kleinen Bursts bei Erhöhung der Flußrate. Damit stellt der Übergang zwischen periodischen und bursting-Oszillationen eine noch offene Frage dar, die gegenwärtig – in einem Rahmen, der über diese Habilitationsschrift hinausgeht – weiter untersucht wird.

Wiederum gute Übereinstimmung herrscht zwischen beiden Simulationsmethoden (den Kontinuationsrechnungen und der direkten Integration) bei der Beschreibung des Übergangs zwischen bursting-Oszillationen und dem stationären Zustand bei hohen Flußraten. Dieser Übergang erfolgt über eine homokline Bifurkation [P12], was sich ebenfalls in der rasch ansteigenden, gegen Unendlich strebenden "Periode" der bursting-Oszillationen bei hohen Flußraten [P11] widerspiegelt. Das Flußratenintervall, in dem es zu dem dramatischen Anstieg der Oszillationsperioden kommt, ist sehr eng [P11], so daß es experimentell noch nicht untersucht wurde.

### 3.3.3 Vereinfachung des Reaktionsmechanismus

Die Zielsetzung der Studien zum Reaktionsmechanismus des Hemin-haltigen pH-Oszillators ist es, unter Beibehaltung der charakteristischen Dynamik des Hemin-Systems, die Anzahl der am Reaktionsmechanismus beteiligten Variablen so weit wie möglich zu verringern. Es wird angestrebt, ein möglichst einfaches Reaktionsmodell zu erhalten, mit dessen Hilfe die Bifurkationen untersucht werden können, die zu bursting-Oszillationen führen.

In einem ersten Schritt wurden die Beiträge der drei  $H^+$ -verbrauchenden "feed back"-Reaktionen zur Dynamik des Gesamtsystems untersucht [P11, P12]. Dabei zeigt sich, daß Reaktion (3.7) unerläßlich ist, damit überhaupt oszillatorische Dynamik erhalten wird [P11, P12]. Dagegen bewirkt der irreversible Abbau von Hemin (Reaktion 3.9) das Auftreten von bursting-Oszillationen: Bei Vernachlässigung dieser Abbaureaktion ist die Dynamik auf stationäre und einfach periodische Zustände beschränkt [P12]. Simuliert man dagegen das Hemin-System unter Vernachlässigung des Dimerisationsgleichgewichts von Hemin (Reaktion 3.8), so erhält man Bifurkationsdiagramme und Zeitserien, die sich kaum merklich von denen unterscheiden, die unter Verwendung des vollständigen 7-Variablen-Systems (Gleichung 3.10) berechnet wurden [P12]. Durch Elimination der Dimerisierung von Hemin (Reaktion 3.8) läßt sich das Reaktionsmodell also von 7 auf 6 Variablen reduzieren. Der Informationsverlust durch die Vereinfachung ist so niedrig, daß das 7- und das 6-Variablen-System nahezu identische Bifurkationsdiagramme liefern [P12].

Als nächster Schritt wird der 6-Variablen-Mechanismus (Gleichungssystem (3.10) mit  $k_8 = k_9 = 0$ ) in Vektornotation umgeschrieben

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{R}(k_i, \mathbf{x}) + k_0(\mathbf{x}^0 - \mathbf{x}) \quad (3.11)$$

wobei  $\mathbf{x}$  den Konzentrations-Vektor der beteiligten Spezies,  $\mathbf{C}$  die Matrix der stöchiome-

trischen Koeffizienten,  $\mathbf{R}(k_i, \mathbf{x})$  den Vektor der Reaktionsgeschwindigkeiten und  $k_0(\mathbf{x}^0 - \mathbf{x})$  den Vektor der Flußterme bezeichnet. Die Berechnung des Rangs der stöchiometrischen Matrix  $\mathbf{C}$  liefert die Zahl linear unabhängiger Komponenten. Da  $\text{Rang}(\mathbf{C}) = 4$  kleiner ist als die Anzahl der Variablen (nämlich 6), bestehen lineare Abhängigkeiten zwischen den Variablen, die in der Form

$$x_3 = x_2 - x_1 + x_1^0 - x_2^0 \quad (3.12)$$

$$x_4 = x_1 - x_2 - x_6 - x_1^0 + x_2^0 + x_4^0 \quad (3.13)$$

berücksichtigt werden können.

Die Gleichungen (3.12) und (3.13) stellen Massenerhaltungsbedingungen für die S-Atome und  $\text{H}^+$  dar. Dies läßt sich anschaulich am Fall der im Reaktionssystem beteiligten Schwefel-Atome zeigen. Die Quelle der S-Atome ist die  $\text{SO}_3^{2-}$ -Stammlösung, während die Umwandlungen in  $\text{HSO}_3^-$  und  $\text{SO}_4^{2-}$  als Senken wirken. Wegen der Massenerhaltung gilt

$$[\text{SO}_3^{2-}]_0 = [\text{SO}_3^{2-}] + [\text{HSO}_3^-] + [\text{SO}_4^{2-}] \quad (3.14)$$

Da aber Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) nur durch die Umsetzung von den anderen schwefelhaltigen Spezies mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, kann man die  $\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration als Funktion der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ausdrücken. Dies ist umso einfacher, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Gleichungssystem (3.3) – (3.9) nur zur Produktion von  $\text{SO}_4^{2-}$  verbraucht wird. Damit gilt:

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{SO}_4^{2-}] \quad (3.15)$$

Setzt man nun den Ausdruck für  $[\text{SO}_4^{2-}]$  aus Gleichung (3.15) in die Massenerhaltungsgleichung (3.14) für die Schwefel-Atome ein, so erhält man Gleichung (3.16)

$$[\text{HSO}_3^-] = [\text{SO}_3^{2-}] - [\text{H}_2\text{O}_2] - [\text{SO}_3^{2-}]_0 + [\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad (3.16)$$

welche mit der Beziehung (3.12) identisch ist. In analoger Weise läßt sich Gleichung (3.13) herleiten.

Ersetzt man also  $x_3$  und  $x_4$  durch die rechten Seiten der Gleichungen (3.12) bzw. (3.13), so ergibt sich für das Hemin-System das Differentialgleichungssystem (3.17) [78],

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= -k_1 x_1 x_2 + k_4 (x_2 - x_1 + x_1^0 - x_2^0) - k_5 x_1 (x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1) \\ &\quad + k_0 (x_1^0 - x_1) \\ \dot{x}_2 &= -k_1 x_1 x_2 - x_2 [k_2 + k_3 (x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)] (x_2 - x_1 + x_1^0 - x_2^0) \\ &\quad + k_0 (x_2^0 - x_2) \\ \dot{x}_5 &= k_6 x_6 + k_9 (x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1) x_7 - 2k_8 x_5^2 - k_7 x_4 x_5 - k_{10} x_5 \\ &\quad + k_0 (x_5^0 - x_5) \\ \dot{x}_6 &= k_7 (x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1) x_5 - (k_0 + k_6) x_6 \end{aligned} \quad (3.17)$$

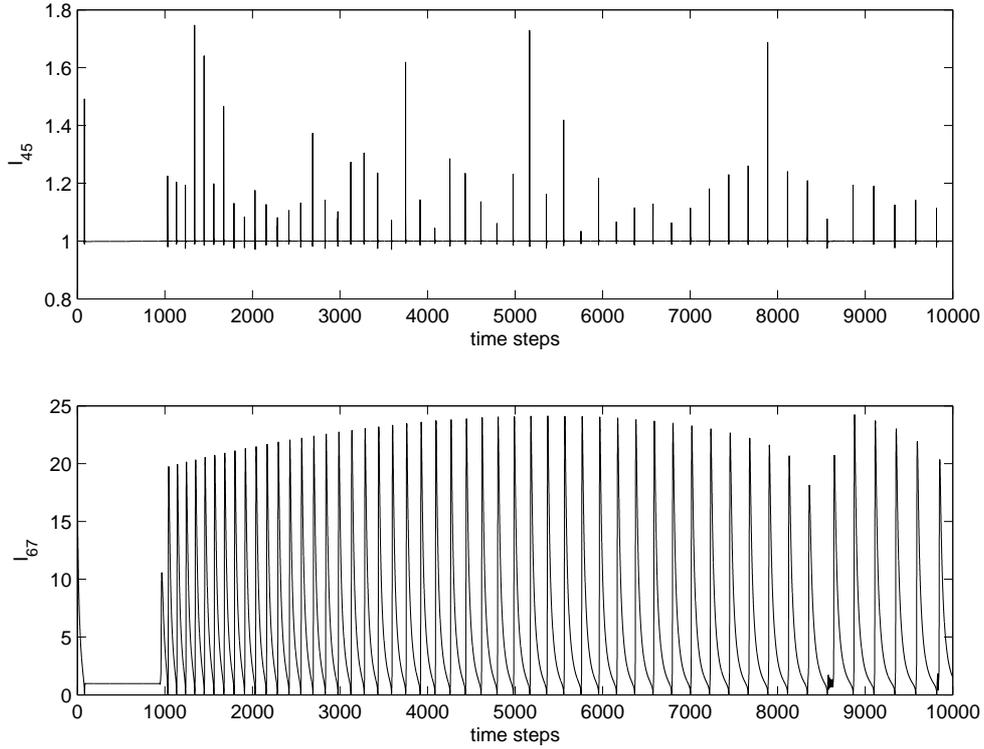


Abb. 3.2: Oben: das Verhältnis  $I_{45}$  der Reaktionsraten  $R_4(k_4, \mathbf{x})$  und  $R_5(k_5, \mathbf{x})$  konvergiert, bis auf einige numerische Ausreißer, gegen einen konstanten Wert. Unten: Beispiel für voneinander unabhängige Reaktionsterme.  $R_6(k_6, \mathbf{x})$  und  $R_7(k_7, \mathbf{x})$  sind voneinander unabhängig, da das Verhältnis  $I_{67}$  nicht konvergiert [78].

das nur noch 4 Variable enthält.

Um das reduzierte System (3.17) weiter zu vereinfachen, wurde überprüft, ob es Reaktionsraten  $R_k$  gibt, die auf einer schnellen Zeitskala mit anderen Reaktionsraten  $R_l$  equilibrieren. Dazu wurden Verhältnisse  $I_{kl}$  der Form

$$I_{kl} = \frac{R_k(k_i, \mathbf{x})}{R_l(k_i, \mathbf{x})} \quad (3.18)$$

berechnet, wobei nur solche Reaktionsraten berücksichtigt wurden, die mit entgegengesetztem Vorzeichen in den Ratengleichungen einer Spezies  $x_i$  auftreten. Die Trajektorien für  $I_{kl}$  wurden für die Parameterwerte berechnet, bei denen Oszillationen auftreten. Dabei wurden die in [P12] angegebenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  verwendet. Mit einer Ausnahme konvergiert keiner der Quotienten  $I_{kl}$  gegen einen konstanten Wert, was daher rührt, daß die Reaktionsterme  $R_k$  und  $R_l$  voneinander unabhängig sind (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu konvergiert der Quotient  $I_{45}$

$$I_{45} = \frac{R_4(k_4, \mathbf{x})}{R_5(k_5, \mathbf{x})} = \frac{k_4(x_2 - x_1 + x_1^0 - x_2^0)}{k_5 x_1 (x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)} \sim 1 \quad (3.19)$$

Aus diesem in erster Näherung konstanten Verhältnis (Abb. 3.2) kann man nun eine weitere Variable durch eine Funktion der verbliebenen drei Variablen ausdrücken.

Eliminiert man die Variable  $x_1$ , indem man die in Näherung (3.19) nach  $x_1$  auflöst, so erhält man für das Hemin-System das Differentialgleichungssystem (3.20)

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_2 &= -k_1 x_1 x_2 - x_2 [k_2 + k_3(x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)](x_2 - x_1 + x_1^0 - x_2^0) \\
 &\quad + k_0(x_2^0 - x_2) \\
 \dot{x}_5 &= k_6 x_6 + k_9(x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)x_7 - 2k_8 x_5^2 \\
 &\quad - k_7(x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)x_5 - k_{10}x_5 + k_0(x_5^0 - x_5) \\
 \dot{x}_6 &= k_7(x_4^0 + x_2^0 - x_1^0 - x_6 - x_2 + x_1)x_5 - (k_0 + k_6)x_6
 \end{aligned} \tag{3.20}$$

in dem  $x_1$  in den rechten Seiten der Gleichungen durch

$$x_1 = \frac{1}{2} \left( x_1^0 - x_2^0 - x_4^0 + x_2 + x_6 - \frac{k_4}{k_5} \pm \sqrt{\left( x_1^0 - x_2^0 - x_4^0 + x_2 + x_6 - \frac{k_4}{k_5} \right)^2 + 4 \frac{k_4}{k_5} (x_4^0 - x_6)} \right) \tag{3.21}$$

ersetzt werden muß (da  $x_4^0$  stets größer als  $x_6$  und  $x_1 \stackrel{!}{>} 0$ , kommt nur der positiven Wurzel physikalische Bedeutung zu). Das Gleichungssystem (3.20) enthält nun noch 3 Variable.

Damit konnte in Rahmen des Habilitationsvorhabens der Reaktionsmechanismus des Hemin-Systems nicht nur aufgestellt, sondern auch auf eine minimale Anzahl von Variablen reduziert werden. Während der Reduktion wurde darauf geachtet, daß möglichst wenig Informationsverlust im Verlaufe des Vereinfachungsvorgangs auftrat. Es ist in der Tat so, daß das durch Kontinuationsrechnungen erhaltene Bifurkationsdiagramm des 3-Variablen-Modells (Gleichungen 3.20) mit dem des ursprünglichen 7-Variablen-Modells (Gleichungen 3.10) qualitativ (und nahezu quantitativ) identisch ist. Mit dem Gleichungssystem (3.20) steht nun ein dreidimensionales Modell zur Verfügung, das in numerischen Untersuchungen verwendet werden wird. Ein Hauptaugenmerk dieser Studien wird sein, das Bifurkations-szenario des Hemin-Systems am Übergang zwischen einfach periodischen und bursting-Oszillationen zu bestimmen.

# Kapitel 4

## Das biomimetische Cytochrom P450-Modellsystem

### 4.1 Einführung

Das biomimetische Cytochrom P450-Modellsystem stellt in dreierlei Hinsicht eine thematische Erweiterung des Untersuchungsgegenstands dieser Habilitationsarbeit dar. Erstens finden die Reaktionen in diesem System nicht länger in einem homogenen flüssigen Medium statt. Die wichtigen enzymatischen Komponenten sind membrangebunden, wobei das aktive Zentrum des Cytochrom P450 in der lipophilen Umgebung der Membran eingebettet ist. Da die Substrate dagegen wasserlöslich sind, kommt der Kompartimentierung des Reaktionsraumes in eine hydrophile und eine lipophile Domäne eine wichtige Rolle zu. Damit verbunden ist zweitens die Tatsache, daß Substrate bzw. Elektronen zwischen der wäßrigen und der lipiden Pseudo-Phase des Systems transportiert werden müssen. Die Art des Transports trägt daher wesentlich zur Wirkungsweise des biomimetischen Systems bei. Der dritte neue Aspekt im biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem ergibt sich wiederum aus dessen Komplexität: man hat es hier mit einem System zu tun, das den Übergang zwischen einem minimalen Enzymsystem und einem minimalen Reaktionsnetzwerk darstellt. Dies ist insofern der Fall, als das sowohl am natürlichen als auch am biomimetischen Cytochrom P450-Reaktionssystem zwei Enzyme beteiligt sind, nämlich das eigentliche Cytochrom P450 und die NADPH-Cytochrom P450-Reductase. Damit bildet das biomimetische System einen "Brückenkopf", der von den minimalen Enzymsystemen ausgehend in Richtung minimaler metabolischer Netzwerke weist.

Auch aus biologischer bzw. enzymologischer Sicht sind die eben erwähnten Aspekte von Bedeutung. Enzyme sind in der Regel an Membranen gebunden, so daß das biomimetische System einen Prototypen darstellt, an dem untersucht werden kann, welche Arten von nichtlinearem Verhalten in membrangebundenen Enzymsystemen auftreten können. Ferner

liefert das biomimetische System einen experimentellen Zugang zur Erforschung des Einflusses der Kompartimentierung auf die Reaktionsdynamik von enzymatischen Systemen.

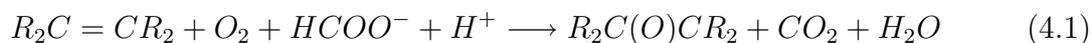
## 4.2 Das natürliche und das biomimetische Cytochrom P450-System

Das Cytochrom P450-System nimmt zwei wichtige physiologische Aufgaben wahr. Es ist erstens an der Biosynthese von steroiden Hormonen maßgeblich beteiligt [79]. Zweitens spielt es eine herausragende Rolle im Stoffwechsel wasserunlöslicher Xenobiotika, also von Substanzen, die dem normalen Metabolismus fremd sind und dort nicht vorkommen. Das Cytochrom P450-System sorgt dafür, daß die wasserunlöslichen Fremdstoffe durch oxidative Hydroxylierung bzw. Epoxidierung in wasserlösliche Metaboliten umgewandelt werden. Diese werden dann in das Blut abgegeben, in den Nieren ausgefiltert und schließlich aus dem Organismus ausgeschieden [79, 80].

Die beiden Enzyme des natürlichen Systems, das Cytochrom P450 und die NADPH-Cytochrom P450-Reductase, sind in der Membran eingebunden. Die Reductase nimmt Elektronen vom hydrophilen Substrat NADPH auf, transportiert sie an das lipophile Ende des Enzyms und überträgt sie auf das Cytochrom P450. Dieses zweite Enzym reagiert dann mit dem innerhalb der Membran vorliegenden, wasserunlöslichen Fremdstoff, indem es die Elektronen sowie ein Sauerstoff-Atom auf den Fremdstoff überträgt [80, 81].

Bei dem biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem handelt es sich um ein völlig synthetisches, supramolekulares Analogon des natürlichen Cytochrom P450-Systems. Das biomimetische System imitiert nicht nur die Reaktivität sondern auch die charakteristischen Struktureigenschaften des natürlichen Vorbilds. Im hier untersuchten biomimetischen System [82, 83] (Abb. 4.1) spielt das hydrophobe Mangan(III)-(5,10,15,20-tetrakis-[2,6-dichlorphenyl]porphyrin) **1** (MnTDDCP) die Rolle des natürlichen Cytochrom P450. Analog zum natürlichen Vorbild wird das "Modell-Enzym" in die lipide Domäne der Phospholipid-Doppelschicht von Vesikeln eingebettet, die aus L- $\alpha$ -Diphosphatidylcholin (DPPC) hergestellt werden. Zusätzlich zu diesen Phospholipiden sind in die Vesikel geringe Mengen des amphiphilen Rhodium-Komplexes **2** (Abb. 4.1) eingebaut, der die phasenkatalytische Funktion der NADPH-Cytochrom P450-Reductase übernimmt. Die Aufgabe des Komplexes **2** besteht darin, Elektronen von dem Substrat Formiat, das in der wäßrigen Phase vorliegt, aufzunehmen und diese an das Mn-Porphyrin **1** zu übertragen.

Das supramolekulare Modellsystem wurde mit dem Ziel optimiert, die typischen Monooxygenase-Eigenschaften des natürlichen Cytochrom P450-Systems nachzuempfinden [84]. So katalysiert das biomimetische System die Epoxidierung von Alkenen



## 4.2. DAS NATÜRLICHE UND DAS BIOMIMETISCHE CYTOCHROM P450-SYSTEM

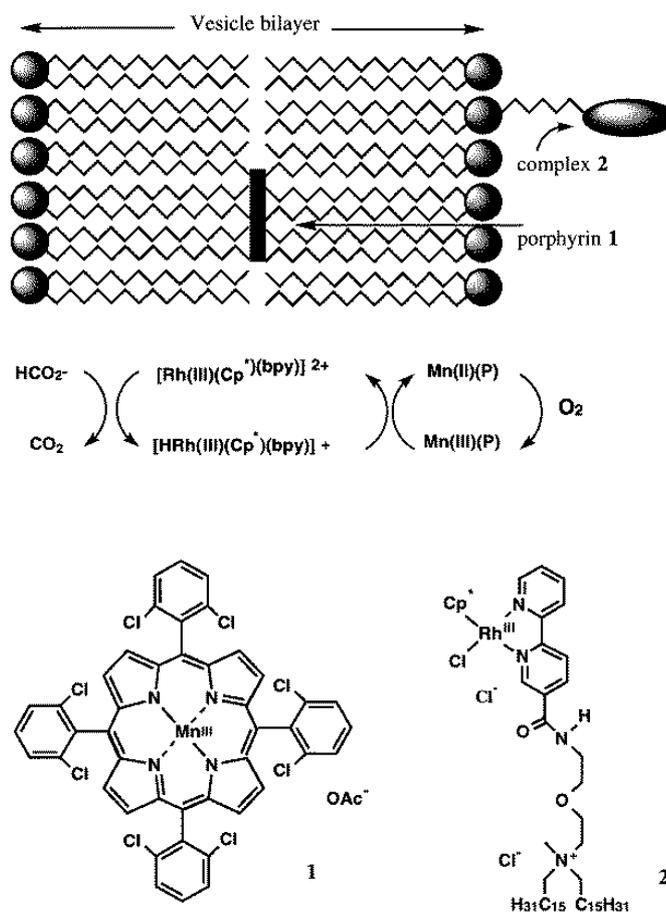
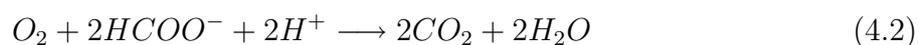


Abb. 4.1: Oben: Schematische Darstellung des biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystems. Mitte: Reaktionszyklus des biomimetischen Systems. Unten: Struktur der "Modellenzyme", dem Manganporphyrin **1** und dem Rhodium-Komplex **2** [82].

in einer ähnlich effizienten Weise wie das natürliche System. Die Wechselzahlen beider Systeme sind vergleichbar [84]. In Abwesenheit geeigneter wasserunlöslicher Substrate, schlagen sowohl das natürliche als auch das biomimetische System den so genannten "nicht-produktiven" Reaktionspfad



ein, in dem Wasser als Reaktionsprodukt gebildet wird [84, 85].

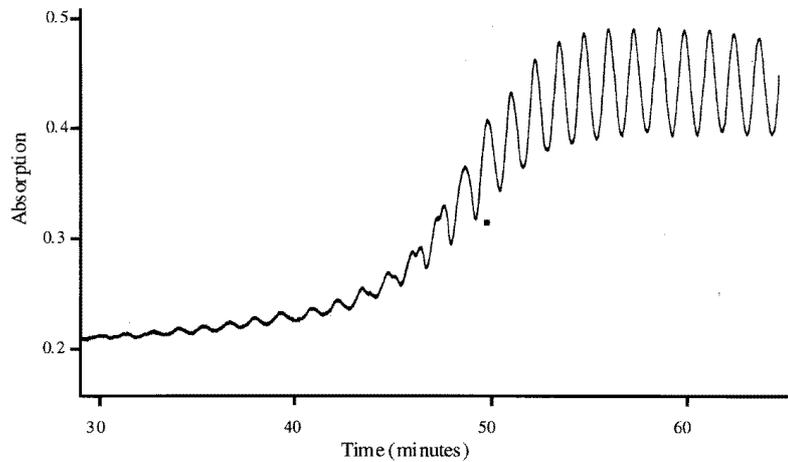


Abb. 4.2: Oszillationen im biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem. Die Absorption bei 435 nm stammt vom Magan(II)porphyrin **1**, das in der lipophilen Schicht der DPPC-Vesikel eingebettet ist [82].

### 4.3 Dynamik

Das dynamische Verhalten des "nicht-produktiven" Reaktionspfades (4.2) des biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystems ist für weite Parameterbereiche stationär. Bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen können jedoch Oszillationen in der Konzentration des Mn-Porphyrins **1** beobachtet werden. Diese in der lipiden Domäne der Vesikel eingebaute Enzymmodell-Verbindung oszilliert periodisch zwischen ihrer oxidierten und der reduzierten Form [82] (Abb. 4.2). Bisher wurden nur Oszillationen der Periode 1 beobachtet. Das transiente Verhalten im Intervall  $t \sim 46 - 48$  min der in Abb. 4.2 dargestellten Zeitserie deutet jedoch an, daß im biomimetischen System Oszillationen der Periode 2 oder noch komplexere Arten der Dynamik möglich sein können.

Vom natürlichen Cytochrom P450-System wurde bisher noch kein oszillatorisches oder anderweitig nichtlineares dynamisches Verhalten berichtet. Wichtige Hinweise, daß eine derartige Dynamik dennoch stattfindet, ergeben sich aus Studien, in denen eine Population von natürlichen Cytochrom P450-Systemen durch wiederholte Laserpulse auf einen einheitlichen Anfangszustand im enzymatischen Reaktionszyklus gebracht werden [86, 87]. Wird anschließend die enzymatische Reaktion gestartet, so reichert sich das Reaktionsprodukt, das selbst nicht an der Reaktion teilnimmt, in stufenförmigen Schüben an. Mit zunehmender Zeit wird die Höhe der Akkumulationsstufen geringer, was mit einem Verlust der Phasenkohärenz zwischen den Cytochrom P450-haltigen Zellen erklärt wird [86, 87]. Die etappenweise Produktion des Produktes ist ein starkes Indiz, daß dem enzymatischen

Prozeß eine oszillatorische Dynamik zugrunde liegt.

## 4.4 Lokalisation der wichtigsten Komponenten

Die Lokalisation des Manganporphyrins **1** im biomimetischen System wurde aus NMR-spektroskopischen und Fluoreszenzlöschungstudien bestimmt. Es wurde gefolgert, daß **1** tief im lipiden Bereich der Vesikel eingebaut ist [84, 88]. Die Rh-Funktionalität des Rh-Komplexes **2** dagegen befindet sich in der wäßrigen Phase [89]. Die aus diesen Studien resultierende Lokalisation der Komponenten ist in Abb. 4.1 dargestellt.

Molekulardynamische Simulationen einer Phospholipid-Doppelschicht aus reinem DPPC bei 48 °C, also der Temperatur, bei der auch die Experimente zur Reaktionsdynamik durchgeführt werden (Abb. 4.2), zeigen, daß polare und geladene Moleküle nur in den Bereich der Kopfgruppen und ihrer benachbarten CH<sub>2</sub>-Gruppen eindringen können [90]. Da das Substrat der biomimetischen Reaktion (HCOO<sup>-</sup>) eine hohe Ladungsdichte aufweist, kann es nicht direkt bis zum vermeintlich tief in der Lipiddoppelschicht inkorporierten Mn-Prophyrin **1** gelangen. Ein über den Rh-Komplex **2** vermittelter Elektronentransport zwischen dem wasserlöslichen Substrat und dem Mn-Porphyrin **1** erscheint auf Grund der molekularen Struktur des Rh-Komplexes **2** ebensowenig realisierbar: die "Brücke" zwischen der reaktiven Funktionalität von **2** und dem lipophilen Anker (d.h. den langen Alkyl-"Schwänzen") beträgt ca. 5 CH<sub>2</sub>-Gruppen (Abb. 4.1) und ist deutlich kürzer als der Abstand zwischen den Kopfgruppen und dem apolaren Bereich des Phospholipids: Der apolare Bereich von DPPC-Vesikeln beginnt erst zwischen der 6. und 9. CH<sub>2</sub>-Gruppe der Alkylkette und erstreckt sich bis an das Kettenende [91]. Daher stellt sich die Frage, wie die Elektronen vom wasserlöslichen Substrat auf das Mn-Prophyrin **1** übertragen werden können.

Um diese Frage aufklären zu können, wurde die Lokalisation der Komponenten, insbesondere die des Mn-Prophyrins **1** nochmals untersucht. Zunächst haben wir die Verteilung von **1** und der Rh-Funktionalität von **2** zwischen der wäßrigen Lösung und der Vesikel spektrophotometrisch bestimmt. Die Absorption  $A$  einer Substanz enthält Beiträge, die von deren Absorption in wäßrigem Medium ( $A_w$ ) und in der Vesikel ( $A_v$ ) herrühren, nach

$$A = \frac{(A_v - A_w)K_D C}{A + K_D C} + A_w \quad (4.3)$$

wobei  $K_D = \frac{c_v}{c_w C}$  die Dissoziationskonstante,  $c_w$  und  $c_v$  die Konzentration der Substanz in der Wasser- bzw. Vesikelphase und  $C$  die Konzentration der DPPC-Monomeren ist [92].  $C$  ist zugleich ein Maß für die verfügbare Membranfläche.

Unsere Experimente zeigen, daß bei 48,0 °C das Mn-Prophyrin **1** mit  $K_D = 2,2 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l}$  fast vollständig vesikelgebunden vorliegt, während das Rh-Zentrum von Komplex

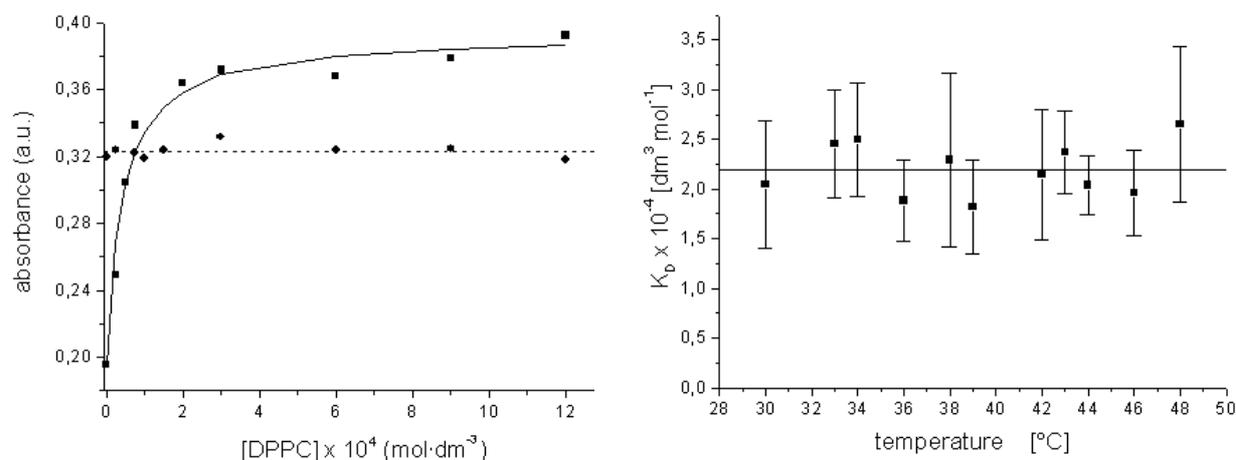


Abb. 4.3: Links: Bestimmung der Verteilung des Mn-Porphyrins 1 (durchgestrichene Linie) und des Rh-Komplexes 2 (gestrichelte Linie) zwischen der wässrigen Phase und der DPPC-Vesikel ( $T = 48 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Rechts: Verteilungskoeffizient des Mn-Prophyrins 1 im Temperaturintervall  $28 \leq T \leq 50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Phasenübergangstemperatur von DPPC-Vesikeln beträgt  $T_m \sim 41,3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

2 ausschließlich in der wässrigen Phase vorkommt (Abb. 4.3). Wiederholt man diese Bestimmung im Temperaturintervall  $28 \leq T \leq 50 \text{ }^\circ\text{C}$ , so stellt man fest, daß die Verteilung des Mn-Prophyrins 1 von der Temperatur unabhängig ist (Abb 4.3). Dies ist bemerkenswert, denn der Phasenübergang zwischen der Gel- und der flüssig-kristallinen Phase von reinen DPPC-Vesikeln erfolgt bei  $T_m \sim 41,3 \text{ }^\circ\text{C}$  [93]. Die Temperaturunabhängigkeit der Verteilung des Mn-Prophyrins ist schwer mit der in Referenzen [84, 88] postulierte Lage von 1 vereinbar. Der Übergang zwischen Gel- und flüssig-kristalliner Phase wird durch eine drastische Änderung im Ordnungsgrad der Alkylketten des Phospholipids verursacht. Dieser Effekt ist mit zunehmender Tiefe des lipiden Bereichs stärker ausgeprägt. Von Molekülen, die in diese Domäne eingebaut werden, ist zu erwarten, daß sie gegenüber der Starrheit bzw. Beweglichkeit der Alkylketten in der Lipiddomäne empfindlich sind, d. h. daß sie dort schwerer oder leichter eingebaut werden. Porphyrine gelten zudem als sensitive Sonden für ihre Mikroumgebung und werden daher in Studien zu Phasenübergängen von Phospholipiden verwendet [94].

Da die Einlagerung des Mn-Porphyrins 1 in die Membran temperaturunabhängig erfolgt und sich daher als unempfindlich gegenüber dem Orientierungsgrad der Alkylketten in den beiden Phasen erweist, folgern wir, daß das Mn-Prophyrin 1 zwar in der lipiden Domäne der Doppelschicht vorliegt, sich jedoch in der Nähe der Phosphatgruppen befindet. Dort ändert sich die Mikroumgebung als Folge des Phasenübergangs des Phospholipids am wenigsten.

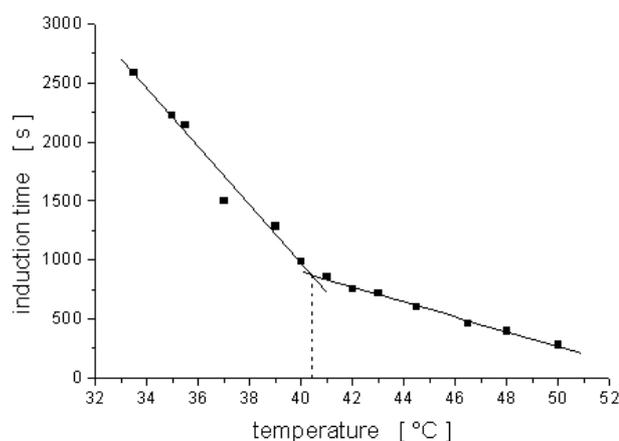


Abb. 4.4: Temperaturabhängigkeit der Induktionszeit von Reaktion 4.4 unter Schutzgasatmosphäre.

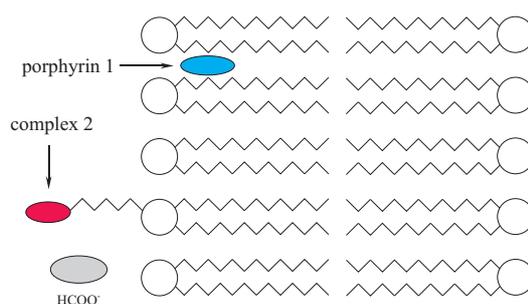


Abb. 4.5: Lokalisation der Bestandteile des biomimetischen Systems. Unseren Interpretationen zufolge wird das lipophile Mn-Porphyrin **1** in der Nähe der Phosphatgruppen der DPPC-Moleküle inkorporiert. Die Rh-Funktionalität von **2** liegt in der wässrigen Phase vor.

Unterstützt wird unsere Interpretation durch Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Induktionszeit für die Reaktion



Die Induktionszeit wird als die Zeitspanne definiert, die zwischen dem Versuchsbeginn und dem Elektronenübertrag zwischen der reduzierten Form des Rh-Komplexes,  $[HRh(Cp^*)bpy]^+$  (**3**), und dem Mn-Porphyrin **1** verstreicht. Die Induktionszeiten werden mit ansteigender Temperatur kürzer (Abb. 4.4). In den Temperaturbereichen  $T < T_m$  und  $T > T_m$  ist der funktionelle Zusammenhang linear, wobei die Steigungen der Geraden unterschiedlich sind. Bei der Übergangstemperatur  $T_m \sim 40,4$  °C der DPPC-Vesikel mit

inkorporierten **1** und **2** (Abb. 4.4) schneiden sich diese Geraden, was darauf hindeutet, daß das Mn-Porphyrin **1** nicht sehr tief in der Lipiddomäne eingebaut sein kann.

Aus unseren Untersuchungen schließen wir, daß das Mn-Porphyrin **1** in einem Bereich der Vesikel eingelagert ist, der von der reduzierten Form des Rh-Komplexes **2** erreicht werden kann (Abb. 4.5). Damit ist eine Übertragung von Elektronen vom Rh-Komplex auf das Mn-Porphyrin möglich, wodurch der Transport über die Phasengrenze hinweg erfolgen kann. Eine detaillierte Untersuchung dieses Elektronenübertragungsprozesses mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wurde soeben begonnen.

## 4.5 Kinetische Untersuchungen

Studien zur Kinetik von Reaktionen, die im biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem ablaufen, werden zur Zeit durchgeführt, um erste Einblicke in den Mechanismus dieses Reaktionssystems zu gewinnen. Dazu wird die Kinetik von ausgewählten Teilreaktionen einerseits in homogener wäßriger Phase, andererseits in Gegenwart von Vesikeln untersucht. Unterscheidet sich die Kinetik einer Teilreaktion je nach Reaktionsmedium, so können diese Unterschiede möglicherweise Aufschluß geben über die Rolle der Vesikel als Reaktionsraum, oder über die Art des Transports über die Phasengrenze hinweg.

Im Folgenden wird exemplarisch über unsere Untersuchungen zur Kinetik des biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystems berichtet. Die Kinetik der Reduktion des Rh-Komplexes **2** durch das Substrat  $\text{HCOO}^-$



wird in verschiedenen Reaktionsmedien bestimmt, und zwar in einer homogenen wäßrigen Lösung, sowie in Gegenwart von Vesikeln. Reaktion (4.5) stellt den ersten Schritt der Elektronenübertragungssequenz des biomimetischen Systems dar, nämlich den Übertrag von Elektronen vom Substrat zum künstlichen Analogon der NADPH-Cytochrom P450-Reductase.

Führt man Reaktion (4.5) in wäßrigem Medium für verschiedene Konzentrationen des Rh-Komplexes unter großem Überschuß an Formiat und unter Schutzgasatmosphäre durch, so läßt sich die Pseudo-Ordnung der Reaktion bezüglich **2** ermitteln, nach

$$\frac{d[\mathbf{2}]}{dt} = k[\mathbf{2}]^\alpha [\text{HCOO}^-]^\beta = k'[\mathbf{2}]^\alpha \quad (4.6)$$

mit  $k' = k[\text{HCOO}^-]^\beta = \text{konstant}$ . Die Geschwindigkeitskonstante wird aus den Anfangssteigungen der kinetischen Kurven ermittelt [95]. In homogener wäßriger Lösung wird der Rh-Komplex **2** in einer Reaktion der Ordnung  $1,75 \pm 0,20$  verbraucht. Die reduzierte Form des Rh-Komplexes,  $[\text{HRh}(\text{Cp}^*)(\text{bpy})]^+$  (**3**), entsteht dagegen nach einem Zeitgesetz,

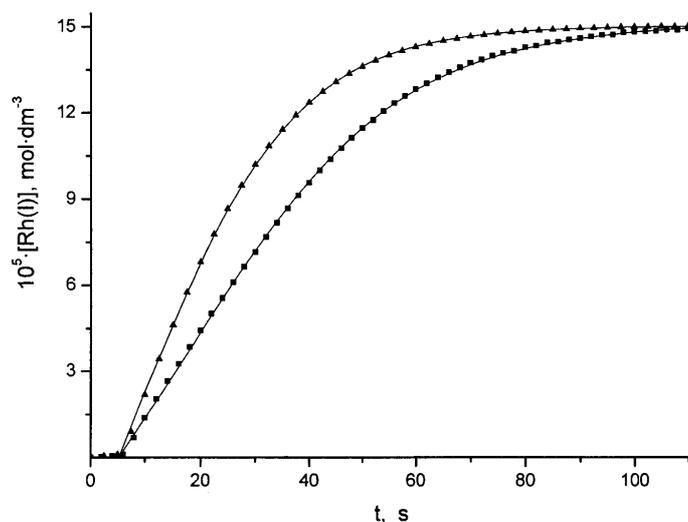
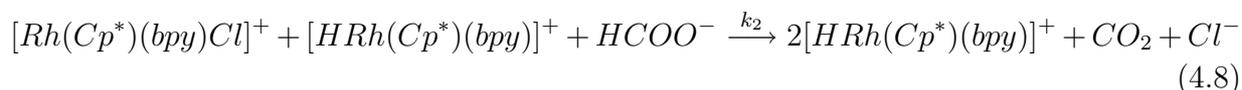


Abb. 4.6: Bildung der reduzierten Form des Rh-Komplexes (hier als  $[\text{Rh(I)}]$  bezeichnet) in Abwesenheit (Dreiecke) und in Gegenwart (Vierecke) von DPPC-Vesikel. Die durchgezogenen Linien stellen Berechnungen dar, unter der Annahme, daß autokatalytisches Verhalten gemäß Reaktion (4.8) vorliegt.

das bezüglich des Produkts nach 1. Ordnung verläuft. Damit ist Reaktion (4.5) keine Elementarreaktion sondern eine Zusammenfassung mehrerer Elementarreaktionen. Verfolgt man die Bildung der reduzierten Form des Rh-Komplexes **3** dagegen in Gegenwart von DPPC-Vesikeln (Abb. 4.6), so stellt man fest, daß auch diese Umsetzung ebenfalls nach 1. Ordnung bezüglich des Produkts **3** verläuft.

Die kinetischen Kurven in Abb. 4.6 weisen eine kurze Induktionsphase auf. Dieses Verhalten ist typisch für autokatalytische Reaktionen [95]: während der Induktionsphase muß die katalytische Spezies erst in ausreichender Menge gebildet werden, bevor die Autokatalyse einsetzen kann. Autokatalytisches Verhalten wurde kürzlich für die durch **2** katalysierte Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden nachgewiesen [96]. Nimmt man nun an, daß Reaktion (4.5) ebenfalls autokatalytisch ist, so kann sie durch den Ansatz



beschrieben werden, wobei Reaktionen (4.7) und (4.8) den nicht-katalytischen bzw. den autokatalytischen Anteil von Reaktion (4.5) darstellen. Liegt  $\text{HCOO}^-$  in großem Überschuß vor, so gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit  $r$  der Bildung des reduzierten Rh-Komplexes **3**

$$r = k_1'[\mathbf{2}] + k_2'[\mathbf{2}] [[\text{HRh}(\text{Cp}^*)(\text{bpy})]^+] \quad (4.9)$$

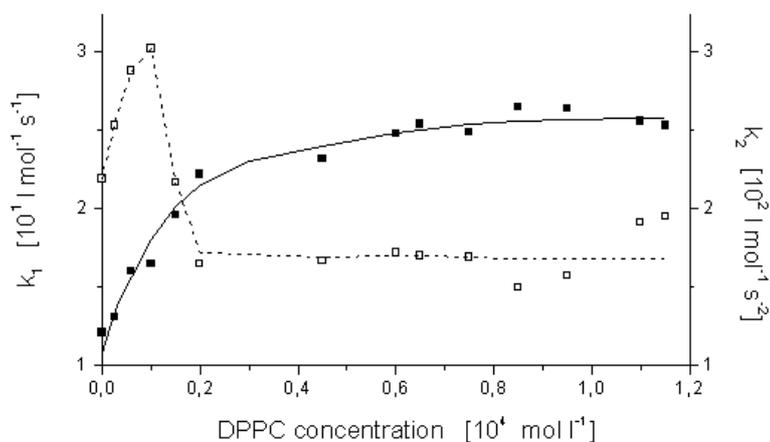


Abb. 4.7: Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  (durchgezogene Linie) und  $k_2$  (gestrichelte Linie) des nicht-katalytischen bzw. des autokatalytischen Schritts der Reduktion von **2**, gemäß Reaktionen (4.7) und (4.8) als Funktion der DPPC-Konzentration.

mit  $k'_1 = k_1[\text{HCOO}^-]$  und  $k'_2 = k_2[\text{HCOO}^-]$ . Fittet man nun die integrierte Form des Zeitgesetzes (4.9) an die kinetischen Daten aus Abb. 4.6 an, so stimmen die experimentellen Daten mit der simulierten Kinetik gut überein [97] (Abb. 4.6).

Wiederholt man diese Experimente für verschiedene DPPC-Konzentrationen, so läßt sich ermitteln, welchen Einfluß die zur Verfügung stehende Membranoberfläche auf Reaktion (4.5) ausübt. Dazu werden die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  über Gl. (4.9) bestimmt. Abbildung 4.7 zeigt, daß die Werte von  $k_1$  und  $k_2$  von der Konzentration an DPPC abhängen. Dies ist insbesondere bei niedrigen DPPC-Konzentrationen (im Intervall  $0 < [\text{DPPC}] \leq 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) der Fall. Für höhere DPPC-Konzentrationen als  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  von der DPPC-Konzentration unabhängig.

Aus Abb. 4.7 wird deutlich, daß die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  der autokatalytischen Bildung der reduzierten Rh-Spezies ein Maximum aufweist. Dies deutet auf eine Affinität der autokatalytischen Reaktion (4.8) zur DPPC-Vesikel hin. Wir interpretieren dieses Verhalten wie folgt: Die reduzierte Form des Rh-Komplexes **3**,  $[\text{HRh}(\text{Cp}^*)(\text{bpy})]^+$ , ist apolar [98] und lagert sich daher an die Vesikel an. Es kommt also zu einer Anreicherung von **3** an der Vesikel. Die maximale Effizienz des autokatalytischen Reaktionsschritts wird erreicht, wenn die Konzentration von **3** in der Membran "optimal" ist. Dies ist bei einer Membranoberfläche der Fall, die einer DPPC-Monomerenkonzentration von  $= 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  entspricht. Für kleinere DPPC-Monomerkonzentrationen steht nicht mehr ausreichend Vesikeloberfläche zur Verfügung um die maximal mögliche Menge an **3** anzulagern, womit die Effizienz und damit die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  der Autokatalyse abnimmt. Für

”zu große” Membranoberflächen kommt es zu einer ”Verdünnung” von membranassoziierten **3** und somit ebenfalls zu einer Senkung von  $k_2$ .

Aus den kinetischen Untersuchungen und den Studien zur Lokalisation der Komponenten (Abschnitt 4.4) des biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystems wird ersichtlich, daß der Kompartimentierung eine tragende Funktion zukommt, die die nichtlineare Dynamik mitbestimmt. So konnte gezeigt werden, daß an der Vesikel (Membran) die Elektronenübertragung zwischen dem hydrophilen Substrat und dem Rh-Komplex **2** autokatalytisch verläuft. Neben dieser Membrankatalyse kommt in Gegenwart von DPPC-Vesikeln dem Transport von Elektronen von der wäßrigen Phase in die Lipiddomäne der Vesikel eine wichtige, sehr wahrscheinlich ebenfalls dynamikbestimmende Rolle zu. Die Studien zur Kinetik und zum Transport im biomimetischen System werden fortgesetzt, um alle Ursachen für nichtlineares dynamisches Verhalten in diesem System zu bestimmen.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nichtlineares dynamisches Verhalten in drei minimalen enzymatischen Reaktionssystemen gefunden und weitgehend untersucht. Neben der Peroxidase-Oxidase-Reaktion handelt es sich um ein biomimetisches Cytochrom P450-Modellsystem, sowie um die "bioinspirierte" Hemin -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Sulfit-Reaktion. Damit kann gezeigt werden, daß Enzymreaktionen, die ein oder zwei Enzyme (oder Enzym-Modellverbindungen) sowie deren Substrate enthalten, durchaus in der Lage sind, oszillierendes Verhalten aufzuweisen. Oszillationen oder rhythmische Dynamik sind also generische Formen der Dynamik, die in einfachen enzymatischen Reaktionssystemen auftreten können.

Obwohl den hier untersuchten Reaktionssystemen gemeinsam ist, daß die Enzyme bzw. Enzym-Modellverbindungen eine Metallporphyrin-Gruppe als aktives Zentrum aufweisen, stellt sich heraus, daß die mechanistische Rolle der jeweiligen Enzyme je nach Reaktionssystem unterschiedlich ist. Das Enzym kann an der Produktion der autokatalytischen Spezies (wie im Fall der Peroxidase-Oxidase-Reaktion) aber auch an Reaktionen beteiligt sein, die der ungehemmten Produktion der autokatalytischen Spezies entgegenwirken (wie im Fall des Hemin-Systems). Gemeinsam ist diesen zwei Reaktionssystemen, daß die Nichtlinearitäten ausschließlich aus den zugrundeliegenden kinetischen Gleichungen stammen. Dagegen ist der Ursprung der Nichtlinearitäten im biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem noch nicht vollständig aufgeklärt. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß die Kompartimentierung am Entstehen von nichtlinearem dynamischem Verhalten maßgeblich beteiligt ist. Eine der Teilreaktionen dieses Reaktionssystems wird an der Membran katalysiert. Damit stehen zwei mögliche Quellen für nichtlineares Verhalten zur Debatte, die sich beide aus der Kompartimentierung des Systems ergeben: einerseits die Membrankatalyse, andererseits der Transport von Elektronen vom hydrophilen Substrat zum "Enzym", das in der lipiden Domäne der Membran eingelagert ist.

Die Dynamik der untersuchten Enzymsysteme erweist sich als reichhaltig. So wurde in der Peroxidase-Oxidase (PO)-Reaktion eine Perioden-Additions-Route ins Chaos beob-

achtet. Der Übergang zwischen dieser Route ins Chaos und der klassischen Route über eine Perioden-Verdoppelungs-Sequenz wurde experimentell erforscht und durch Computersimulationen bestätigt. Im Hemin-System kommen neben periodischen auch bursting-Oszillationen vor, die große Ähnlichkeit mit den Oszillationen von intra- bzw. interzellulärem Calcium haben. Im biomimetischen Cytochrom P450-System wurden bisher nur Oszillationen der Periode 1 beobachtet, jedoch gibt es Hinweise, daß auch komplexere dynamische Zustände auftreten können.

Es wurden ausführliche Studien zu den Reaktionsmechanismen der PO-Reaktion und des Hemin-Systems durchgeführt. Beim biomimetischen Cytochrom P450-System dienen erste Untersuchungen dazu, die Grundlagen zu erarbeiten, auf deren Basis in naher Zukunft ein Reaktionsmechanismus aufgestellt werden kann. Für das Hemin-System wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der auf literaturbekannten Elementarreaktionen beruht. Der Reaktionsmechanismus konnte von sieben auf drei Variable vereinfacht werden. Durch Kontinuationsverfahren wurden die Bifurkationsdiagramme für beide Versionen des Mechanismus berechnet, die qualitativ gut mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen. Die Bifurkationsstruktur am Übergang zwischen periodischen und bursting-Oszillationen bedarf jedoch noch weitergehender Analyse. Die Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus des PO-Systems beschäftigen sich mit der Rolle der Effektoren der Enzymaktivität. Dabei werden die phenolischen Effektoren während der Reaktion nicht verbraucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Komplexität der Dynamik der PO-Reaktion von dem Redoxpotential der Phenole abhängt.

Ein weiterer Aspekt des Habilitationsvorhabens befaßt sich mit der Frage nach der biologischen Realisierung und der Bedeutung von nichtlinearem Verhalten in minimalen Enzymsystemen. Anhand der PO-Reaktion wurde untersucht, ob die *in vitro* beobachtete Dynamik auch *in vivo* realisiert werden kann. In Versuchen mit Zellextrakten aus Meerrettich-Wurzeln konnten stark gedämpfte Oszillationen beobachtet werden. Dies weist darauf hin, daß Peroxidase-Oxidase-basierte Oszillationen in lebenden Organismen möglich sein können.

Schließlich wurde untersucht, welche biologische Funktion der rhythmischen Dynamik dieser Enzymsysteme zukommen kann. Es wurde erstmalig gezeigt, daß die Oszillationen neben der bekannten Rolle als Informationsträger in Signaltransduktionskaskaden auch dazu dienen können, das Enzym gegen die Zerstörung durch toxische Zwischenprodukte des Metabolismus zu schützen.

# Literaturverzeichnis

- [1] M. G. Th. Fechner, *Schweigg. J.* **1828**, *53*, 129 – 151.
- [2] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1900**, *35*, 33 – 76.
- [3] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1900**, *35*, 204 – 256.
- [4] G. Bredig, J. Weinmayr, *Z. Phys. Chem.* **1903**, *42*, 601 – 611.
- [5] I. Prigogine, *Étude thermodynamique des phénomènes irréversibles*, Desoer, Lüttich, 1947.
- [6] R. J. Field, M. Burger, *Oscillations and traveling waves in chemical systems*, Wiley Interscience, New York, 1985.
- [7] I. R. Epstein, K. Showalter, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13122 – 13147.
- [8] I. R. Epstein, J. Pojman, *An introduction to nonlinear chemical dynamics*, Oxford University Press, New York, 1998.
- [9] A. Goldbeter, *Biochemical oscillations and cellular rhythms - The molecular bases of periodic and chaotic behaviour*, Princeton University Press, Princeton, 1988.
- [10] B. Hess, *Q. Rev. Biochem.* **1993** *30*, 121 – 176.
- [11] M. G. Mustafa, K. Utsumi, L. Packer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *24*, 381 – 385.
- [12] P. Camacho, J. D. Lechleiter, *Science* **1993**, *260*, 226 – 229.
- [13] H. R. Petty, R. G. Worth, A. L. Kindzelskii, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 2754 – 2757.
- [14] A. Amit, A. L. Kindzelskii, J. Zanoni, J. N. Jarvis, H. R. Petty, *Cell Immunol.* **1999**, *194*, 47 – 53.
- [15] C. J. Goodner, B. C. Walike, D. J. Koerker, J. E. Ensink, A. C. Brown, E. W. Chideckel, J. Palmer, L. Kalnsay, *Science* **1977**, *195*, 177 – 179.

- [16] D. A. Lang, D. R. Matthews, J. Peto, R. C. Turner, *N. Engl. J. Med.* **1979**, *301*, 1023 – 1027.
- [17] U. Lüttge, *Planta* **2000**, *211*, 761 – 769.
- [18] U. Rascher, M.-T. Hütt, K. Siebke, B. Osmond, F. Beck, U. Lüttge, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11801 – 11805.
- [19] F. F. Seelig, *Z. Naturforsch.* **1976**, *31a*, 731 – 738.
- [20] U. Ryde-Petterson, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 145 – 148.
- [21] G. Hübner, P. Wolna, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, *375*, 31 – 34.
- [22] J. Temminck Groll, *Kolloid Z.* **1917**, *21*, 138 – 148.
- [23] J. A. de Jonge, *Arch. Néerland. Physiol.* **1917**, *1*, 182 – 197.
- [24] J. C. Vincent, E. Sélégnny, S. Alexandre, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1988** *19*, 247 – 261.
- [25] A. J. Davison, A. J. Kettle, D. J. Fatur, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1193 – 1200.
- [26] I. Yamazaki, K. Yokota, R. Nakajima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *21*, 582 – 586.
- [27] S. Nakamura, K. Yokota, I. Yamazaki, *Nature* **1969**, *222*, 794 – 795.
- [28] H. Degn, *Nature* **1968**, *217*, 1047 – 1050.
- [29] L. F. Olsen, H. Degn, *Nature* **1977**, *267*, 177 – 178.
- [30] U. Kummer, K. R. Valeur, G. Baier, K. Wegmann, L. F. Olsen, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1289*, 397 – 403.
- [31] E. H. Liu, D. T. A. Lamport, *Plant. Physiol.* **1974**, *54*, 870 – 876.
- [32] L. F. Olsen, H. Degn, *Nature* **1977**, *267*, 177 – 178.
- [33] T. Hauck, F. W. Schneider, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 391 – 397.
- [34] M. S. Samples, Y.-F. Hung, J. Ross, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7338 – 7342.
- [35] B. D. Aguda, L.-L. H. Frisch, L. F. Olsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6652 – 6656.
- [36] R. Larter, L. F. Olsen, C. G. Steinmetz, T. Geest, in *Chaos in chemical and biological systems*, R. J. Field, L. Györgyi (Hrsg.), World Scientific, Singapur, 1993, S. 175 – 224.

- [37] M. J. B. Hauser, L. F. Olsen, in *Transport versus structure - Their competitive roles in biophysics and chemistry*, S. C. Müller, J. Parisi, W. Zimmermann (Hrsg.), Lecture Notes in Physics 532, Springer, Heidelberg, 1999, S. 252 – 272.
- [38] T. Geest, C. G. Steinmetz, R. Larter, L. F. Olsen, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5678 – 5680.
- [39] F. Argoul, A. Arnéodo, P. Richetti, *Phys. Lett. A* **1987**, *120*, 269 – 275.
- [40] M. Lefranc, D. Hannequin, D. Dangoisse, *J. Opt. Soc. Am. B* **1991**, *8*, 239 – 249.
- [41] C. Letellier, J. Maquet, H. Labro, L. Le Sceller, G. Gouesbet, F. Argoul, A. Arnéodo, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10265 – 10273.
- [42] T. V. Bronnikova, V. R. Fed’kina, W. M. Schaffer, L. F. Olsen, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 9309 – 9312.
- [43] L. F. Olsen, A. Lunding, U. Kummer, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003** *410*, 287 – 295.
- [44] A. Scheeline, D. L. Olson, E. P. Williksen, G. A. Horras, M. L. Klein, R. Larter, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 793 – 756.
- [45] K. Yokota, I. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *105*, 301 – 312.
- [46] I. Yamazaki, K. Yokota, *Mol. Cell. Biochem.* **1973**, *2*, 39 – 52.
- [47] K. Yokota, I. Yamazaki, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1913 – 1920.
- [48] E. S. Kirkor, A. Scheeline, M. J. B. Hauser, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1381 – 1388.
- [49] E. S. Kirkor, A. Scheeline, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5014 – 5022.
- [50] B. Halliwell, *Planta* **1978**, *140*, 81 – 88.
- [51] L. F. Olsen, H. Degn, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *523*, 321 – 334.
- [52] V. R. Fed’kina, F. I. Ataulakhanov, T. V. Bronnikova, *Biophys. Chem.* **1984**, *19*, 259 – 264.
- [53] B. D. Aguda, R. Larter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7913 – 7916.
- [54] B. D. Aguda, B. L. Clarke, *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 3461 – 3470.
- [55] D. L. Olson, E. P. Williksen, A. Scheeline, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *2* – 15.
- [56] J. J. L. Carson, J. Walleczek, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8637 – 8642.

- [57] E. F. Elstner, A. Heupel, *Planta* **1976**, *130*, 175 – 180.
- [58] G. G. Gross, C. Janse, E. F. Elstner, *Planta* **1977**, *136*, 271 – 276.
- [59] M. Mäder, R. Füssli, *Plant Physiol.* **1982** *70*, 1132 – 1134.
- [60] J. A. Duke, *Handbook of phytochemical constituents of GARS herbs and other economic plants*, CRC Press, Boca Raton, 1992.
- [61] J. B. Harborne, H. Baxter, *Phytochemical dictionary*, Taylor and Francis, London, 1993.
- [62] T. W. Goodwin, E. I. Mercer, *Introduction to plant biochemistry*, Pergamon, New York, 1972.
- [63] A. Higa, T. Hidaka, Y. Minai, Y. Matsuoka, M. Haga, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 1852 – 1855.
- [64] M. Haga, Y. Sekizawa, M. Ichikawa, H. Hiramatsu, A. Hamamoto, Y. Takino, M. Ameyama, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1427 – 1436.
- [65] M. J. Berridge, M. D. Bootman, L. Lipp, *Nature* **1998**, *395*, 645 – 648.
- [66] J. G. Lazar, J. Ross, *Science* **1990**, *247*, 189 – 192.
- [67] Z. Genfa, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 517 - 522.
- [68] L. N. Grinberg, P.J. O'Brian, Z. Hrkal, *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 214 - 219.
- [69] B. Hess, A. Boiteux, J. Krüger, *Adv. Enzym. Regul.* **1968**, *7*, 149 - 167.
- [70] Th. Mair, S. C. Müller, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 627 – 630.
- [71] E. M. Izhikevich, *Int. J. Bifurcat. Chaos* **2000**, it 10, 1171 – 1266.
- [72] R. Seydel, *From equilibrium to chaos – Practical bifurcation and stability analysis*, Elsevier, New York, 1988
- [73] Gy. Rábai, I. Hanazaki, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 10615 -10619.
- [74] G. A. Frerichs, R. C. Thompon, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 8142 - 8149.
- [75] Gy. Rábai, K. Kustin, I. R. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3870 – 3874.
- [76] Gy. Rábai, M. Orban, I. R. Epstein, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5413 – 5419.
- [77] S. B. Brown, P. Jones, *Trans. Faraday Soc.* **1968**, *64*, 994 – 998.

- [78] R. Straube, D. Flockerzi, S. C. Müller, M. J. B. Hauser, Manuskript in Vorbereitung für *J. Chem. Phys.*
- [79] P. R. Ortiz de Montellano (Hrsg.), *Cytochrome P<sub>450</sub> – Structure, mechanism, and biochemistry*, 2. Auflage, Plenum, New York, 1995.
- [80] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff – Biochemie, Biologie, Medizin*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1990.
- [81] E. J. Mueller, P. J. Loida, S. G. Sligar, in P. R. Ortiz de Montellano (Hrsg.), *Cytochrome P<sub>450</sub> – Structure, mechanism, and biochemistry*, 2. Auflage, Plenum, New York, 1995, S. 83 – 124.
- [82] A. P. H. J. Schenning, J. H. Lutje Spelberg, M. C. P. F. Driessen, M. J. B. Hauser, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12655 – 12656.
- [83] S. C. Müller, M. J. B. Hauser, in *Handbook of biomimetics*, Y. Osada, S. Kai, Y. Kakazu, K. Kataoka, K. Sakai, J. Tanaka (Hrsg.), NTS Books, Tokyo, 2000, S. 87 – 100.
- [84] A. P. J. H. Schenning, D. H. W. Hubert, J. H. van Esch, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2587 – 2588.
- [85] I. Tabushi, M. Kodera, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1101 – 1103.
- [86] W. Häberle, H. Gruler, Ph. Dutkowski, D. Müller-Enoch, *Z. Naturforsch.* **1990**, *45c*, 273 – 279.
- [87] H. Gruler, D. Müller-Enoch, *Eur. Biophys. J.* **1991**, *19*, 217 – 219.
- [88] A. P. H. J. Schenning, D. H. W. Hubert, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *Langmuir* **1996**, *12*, 1572 – 1577.
- [89] J. H. van Esch, M. A. M. Hoffmann, R. J. M. Nolte, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1599 – 1610.
- [90] W. Shinoda, S. Okazaki, *J. Mol. Liquids* **2001**, *90*, 95 – 103.
- [91] R. Hutterer, F. W. Schneider, H. Lanig, M. Hof, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1323*, 195 – 207.
- [92] L. J. Magid, K. Kon-no, C. A. Martin, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1434 – 1439.
- [93] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 91 – 145.

- [94] F. Ricchelli, S. Gobbo, *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, *29*, 65 – 70.
- [95] H. Mauser, *Formale Kinetik*, Bertelsmann Universitätsverlag, Gütersloh, 1974.
- [96] U. Kölle, H. Fränzel, *Monatshefte Chem.* **2000**, *131*, 1321 – 1326.
- [97] F. Guarrasi, Diplomarbeit (Tesi sprimentale di laurea), Universität Palermo, 2003.
- [98] P. A. Gosling, J. H. van Esch, M. A. M. Hoffmann, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 472 – 473.

# Danksagung

“... sind nicht Individuen, sondern Gruppen, die Träger der Wissenschaft, diese aber sind mehr als eine Vielzahl von Individuen... Dabei kommt es auf die prägenden und stabilen Formen des Gedankenaustauschs an, die sich durch die Ausbildung, die Arbeitsteilung, der verschiedenen Formen von Abhängigkeiten ... in einem Forscherkollektiv ergeben.“

Lothar Schäfer, *Realität, Idealität, Konventionalität*, in W. Marx (Hrsg.), *Determinismus – Indeterminismus. Philosophische Aspekte physikalischer Theorienbildung*, Klostermann, Frankfurt am Main, 1990, S. 41.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, den Personen zu danken, die mich während meines Habilitationsvorhabens begleitet, unterstützt, und auch den Glauben an mich nicht verloren haben. Denn: eine derartig komplexe und langandauernde Arbeit läßt sich nicht in einem “parallelen Universum” auf sich alleine gestellt bewerkstelligen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan C. Müller und Prof. Dr. Lars Folke Olsen ganz herzlich bedanken, denn sie haben diese Arbeit, und damit meine wissenschaftliche Forschung, nach Kräften gefördert und unterstützt. Nicht zuletzt haben sie mir die Möglichkeit eröffnet, dieses Forschungsvorhaben zu entwickeln und in ihren Arbeitsgruppen umzusetzen. Dank schulde ich auch für die vielen fachlichen und freundschaftlichen Diskussionen, die meinen wissenschaftlichen Weg stark geprägt haben.

Meinen Magdeburger Mitarbeitern Ronny Straube, Nico Fricke, Gordon André, Teppei Tosaya und Rebeka Egyházy (geb. Bakos) möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Sie haben einen wichtigen Teil der Ergebnisse zum Hemin- und zum biomimetischen Cytochrom P450-Modellsystem erarbeitet, die in dieser Arbeit Eingang gefunden haben. Danken möchte ich auch Ane-Christine Møller und Anita Lunding, die meine Forschung in meinen ”dänischen Zeiten” ebenso eifrig unterstützt, und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ferner bedanke ich mich bei Anika Strich, Jana Oberender, Marika Busse, Anne-Kristin Jörn und Sören Richter, die im Rahmen ihrer “Abiturientinnen- bzw. Abiturientenprojekte“ bewiesen haben, daß man mit Begeisterung, Neugierde und un“verbildetem“ Verstand interessante Forschungsergebnisse erzielen kann. Es war und ist

mir ein Vergnügen und eine Ehre, sie alle auf ihrem wissenschaftlichen Weg beratend zu begleiten.

Der Gedankenaustausch und die Zusammenarbeit mit Partnern aus anderen Forschungseinrichtungen war für den Erfolg meiner Forschungsprojekte von großer Bedeutung. Besonderen Dank möchte ich deshalb meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Maria Liria Turco Liveri, Francesco Guarrasi (Univestität Palermo), Dr. Ursula Kummer (European Media Laboratory, Heidelberg) und Prof. Dr. Dietrich Flockerzi (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg) aussprechen.

Meinen Kollegen in der Abteilung Biophysik danke ich für das freundschaftliche Verhältnis und für die stete Diskussionsbereitschaft, die ein angenehmes und anregendes Arbeiten ermöglicht. Ein besonderes Dankeschön gilt diesbezüglich Ulrich Storb, Dr. Niklas Manz, Dr. Martin Böckmann, Satenik Bagyan, Dr. Wolfgang Jantob, Christiane Hilgardt, Katja Guttmann und Ramona Bengsch.

Für das unabhängige und kritische Korrekturlesen dieses "Opus" bedanke ich mich bei Dr. Peter Kohlert, Ronny Straube und Anke Senses.

Meinen Freunden, Bekannten und Verwandten, die durch ihre Geduld und ihren Zuspruch zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, schulde ich Dank. Besonders gilt dies für meine Eltern, und für Dr. Sandra Koch, die mich auf der Mason Street in Morgantown, West Virginia, vom Sinn eines Habilitationsvorhabens überzeugt hat.

