

Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Analysenmethode zur
Charakterisierung von zellfreien enzymatischen Reaktionen in
miniaturisierten Produktionssystemen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Dominic Mähler

geboren in Lüdenscheid

Fakultät für Chemie

Universität Duisburg-Essen

2022

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2017 bis Juli 2020 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver J. Schmitz am Institut für Angewandte Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Erik Freier am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. in Dortmund durchgeführt.

Prof. Dr. Oliver J. Schmitz

1. Gutachter

Universität Duisburg-Essen

Prof. Dr. Torsten C. Schmidt

2. Gutachter

Universität Duisburg-Essen

Dr. Erik Freier

Betreuer

Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V.

Tag der mündlichen Prüfung

10. März 2023

Bestätigung der Autorschaft

Hiermit versichere ich an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz verfasst habe. Bei der Abfassung dieser Arbeit wurden nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet.

Essen, 20.11.2022

Dominic Mähler

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78293

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230424-103955-2



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Kurzfassung

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines miniaturisierten enzymatischen Reaktorsystems, das im Rahmen einer Proof-of-Concept Applikation eine einfache *in vitro* Biosynthese der Grundbausteine MalCoA und AcCoA für die Herstellung potenziell antibiotisch wirksamer Substanzen der Naturstoffklasse der Polyketide mit zeitaufgelöster, automatisierter und quantifizierender CE-Analytik ermöglicht. Dazu wurde eine CZE-UV/Vis Messmethode zur Quantifizierung der Nukleotide AMP, ADP und ATP und der Coenzyme CoA, MalCoA und AcCoA in enzymatischen Reaktionsmatrices entwickelt, die mit geringsten Probenmengen ohne Probenvorbereitung auskommt und zeiteffiziente Analysen ermöglicht. Dabei wurde die Messmethode hinsichtlich Kapillardruck, Kapillarspannung, Kapillartemperatur, Art des Puffers, Pufferkonzentration und pH systematisch optimiert, sodass sich die Nukleotide, Coenzyme als auch der interne Standard cAMP vollständig separieren ließen. Anschließend wurden sequenzielle Mehrfachinjektionen von enzymatischen Matrices durchgeführt, die eine Reihe von Trennproblemen bei der Verwendung der entwickelten Analysenmethode verursachten. Durch eine Anpassung der Kapillardimensionen, der Injektionsparameter und der Konditionierungsbedingungen wurde die ursprüngliche Güte der Trennung wiederhergestellt. Anschließend wurde die Methode auf Basis der von der ICH bereitgestellten Richtlinien zur Validierung analytischer Methoden hinsichtlich Spezifität, Selektivität, Genauigkeit, Präzision, Linearität und Nachweisempfindlichkeit validiert. Mit Hilfe der CZE-UV/Vis Methode wurden die Stabilitäten der kritischen Analyten CoA, MalCoA, AcCoA und ATP evaluiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich eine quantifizierte Dimerisierung von CoA in der enzymatischen Matrix durch die Zugabe von TCEP vermeiden lässt. Zudem wurde eine Hydrolyse bedingte Instabilität von AcCoA und MalCoA quantifiziert. ATP erwies sich unter gleichen Bedingungen hingegen als stabil. Im weiteren Verlauf wurden die zellfreien Enzyme Malonyl-CoA Synthetase Y3K-deGFP MatB, Malonyl-CoA Decarboxylase Y3K-mRuby MatA und Citratsynthase Y3K-eBFP CitZ hinsichtlich Spezifität, Kinetik und Nutzbarkeit zur Produktion der CoA-Fettsäureester CoA, MalCoA und AcCoA evaluiert. Dazu wurden sequenzielle Mehrfachinjektionen von Einzel- als auch Mehrenzymbreaktionen durchgeführt und zeitaufgelöst quantifiziert. Dadurch wurde die Funktionalität der nativen Enzyme sowohl einzeln als auch im Verbund nachgewiesen, wobei keine Nebenprodukte beobachtet wurden. Anschließend wurden die Enzyme auf magnetischen Ni-NTA Beads immobilisiert und durch Wiederholung der zuvor mit nativen Enzymen durchgeführten Reaktionen die Funktionalität der immobilisierten Enzyme nachgewiesen. Darüber hinaus wurden die Aktivitäten von nativen als auch immobilisierten Enzymen durch eine entwickelte und validierte Methode zur Inaktivierung der verwendeten Enzyme durch pH-Wert Änderung bestimmt. Final wurde ein in die CE integrierbarer miniaturisierter Durchfluss-Membranreaktor im Rahmen einer Proof-of-Concept Applikation für einfache *in vitro* Biosynthese von Citrat und der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA mit einem integriertem CoA-Recycling

System entwickelt. Neben der direkten Kopplung des Reaktors mit der Analytik wurde ein *Upscaling* im Vergleich zu den bisherigen *Batch* Ansätzen und eine Arbeit im Durchfluss ermöglicht. Der Reaktor lässt sich kostengünstig produzieren, ressourcenschonend nutzen und unter definierten Reaktionsbedingungen betreiben. Vorteilhaft erwies sich die durch den sequenziellen Einsatz von mit Enzymen beladenen Filtereinheiten nachgewiesene Modularität des Reaktors und die potenzielle Wiederverwendbarkeit der Enzymeinheiten. Allerdings ergaben sich einige ungeklärte Fragestellungen hinsichtlich der Stabilität der Immobilisierung, da bei Mehrfachverwendung von immobilisierten Enzymen verringerte Aktivitäten nachgewiesen wurden. Ausstehend, aber Bestandteil aktueller Forschungen, ist die Kopplung des Reaktors an eine Free-Flow Elektrophorese (FFE) Einheit zur kontinuierlichen Separation der Produkte von der Reaktionsmatrix und die Integration einer zellfreien Polyketid-Synthase zur Herstellung eines potenziellen Wirkstoffs im Reaktorsystem.

Abstract

This work describes the development of a miniaturized enzymatic reactor system that enables a simple *in vitro* biosynthesis of the building blocks MalCoA and AcCoA for the production of potentially antibioticly active substances within the natural product class of polyketides with time-resolved, automated and quantifying CE analytics in a proof-of-concept application. For this purpose, a CZE-UV/Vis analytical method was developed for the quantification of the nucleotides AMP, ADP and ATP and the coenzymes CoA, MalCoA and AcCoA in enzymatic reaction matrices, which requires minimal sample amounts without any sample preparation and enables time-efficient analyses. The measurement method was systematically optimized with respect to capillary pressure, capillary voltage, capillary temperature, type of buffer, buffer concentration and pH, so that the nucleotides, coenzymes as well as the internal standard cAMP were completely separated. Sequential multiple injections of enzymatic matrices were then performed, which caused a number of separation issues when using the developed analytical method. Adjustment of the capillary dimensions, injection parameters, and conditioning method restored the original separation efficiency. Subsequently, the method was validated based on the guidelines provided by the ICH for validation of analytical methods in terms of specificity, selectivity, accuracy, precision, linearity and sensitivity. The CZE-UV/Vis method was then used to evaluate the stabilities of the critical analytes CoA, MalCoA, AcCoA, and ATP. It was found that quantified dimerization of CoA in the enzymatic matrix could be avoided by the addition of TCEP. In addition, hydrolysis-induced instability of AcCoA and MalCoA was quantified. ATP, on the other hand, was proved to be stable under the same conditions. In the further course, the cell-free enzymes malonyl-CoA synthetase Y3K-deGFP MatB, malonyl-CoA decarboxylase Y3K-mRuby MatA, and citrate synthase Y3K-eBFP CitZ were evaluated with respect to specificity, kinetics, and applicability for the production of the CoA fatty acid esters CoA, MalCoA, and AcCoA. For this purpose, sequential multiple injections of single as well as multi-enzyme reactions were performed and quantified in a time-resolved manner. This demonstrated the functionality of the native enzymes individually as well as in combination, and no by-products were observed. Subsequently, the enzymes were immobilized on magnetic Ni-NTA beads and the functionality of the immobilized enzymes was demonstrated by repeating the previously performed reactions with native enzymes. Furthermore, the activities of native as well as immobilized enzymes were determined by a developed and validated method for inactivation of enzymes by pH change. Finally, a miniaturized flow-through membrane reactor that can be integrated into the CE was developed as part of a proof-of-concept application for a simple *in vitro* biosynthesis of citrate and the polyketide building blocks MalCoA and AcCoA with an integrated CoA recycling system. In addition to direct coupling of the reactor with the analytical system, upscaling compared to previous batch approaches and working in a flow-through system was enabled. The reactor can be produced cost-effectively, used in a resource-saving manner and operated under

defined reaction conditions. The modularity of the reactor, demonstrated by the sequential use of enzyme-loaded filter units, and the potential reusability of the enzyme units proved advantageous. However, some unresolved issues arose regarding the stability of immobilization, as reduced activities were shown with multiple uses of immobilized enzymes. Pending, but part of current research, is the coupling of the reactor to a free-flow electrophoresis (FFE) unit for continuous separation of products from the reaction matrix and the integration of a cell-free polyketide synthase for the production of a potential drug in the developed reactor system.

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt DR. ERIK FREIER für sein uneingeschränktes Vertrauen und den damit verbundenen Freiheiten bei der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, die tollen inhaltlichen Diskussionen und seine große und stetige Hilfsbereitschaft während und nach der aktiven Zeit am Institut. Einen herzlichen Dank auch dafür, dass du die Promotionszeit so angenehm gestaltet hast und Raum für die persönliche Weiterentwicklung geschaffen hast!

Ein großer Dank gilt zudem PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ für seine Tätigkeiten als Doktorvater und die Übernahme der Arbeit als Erstgutachter. Danke für die unkomplizierten Gespräche und Absprachen rund um die Promotion.

Ebenfalls möchte ich mich bei PROF. DR. TORSTEN C. SCHMIDT für die Übernahme der Tätigkeit als Zweitgutachter bedanken.

Meinen Mitstreitern PAUL EBERSBACH und MATTHIAS JENDER möchte ich für die immer gute Stimmung in der Arbeitsgruppe und die durch zahlenreiche private Unternehmungen geschaffenen schönen Erinnerungen an die Promotionszeit bedanken.

Ein lieber Dank gilt außerdem DR. UTE MÜNCHBERG für das Teilen ihrer wertvollen Erfahrungen und Expertise zum erfolgreichen Vorantreiben des Projektes.

Vielen lieben Dank außerdem an KERSTIN KAPPLER für ihre tolle Unterstützung im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Der größte Dank gilt an dieser Stelle meiner FAMILIE, die mir durch ihre unermüdliche und bedingungslose Unterstützung den Weg zur Promotion ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis

Bestätigung der Autorschaft	I
Kurzfassung	II
Abstract	IV
Danksagung	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung.....	5
2 Theoretische Grundlagen	6
2.1 Kapillarelektrophorese	6
2.1.1 Instrumenteller Aufbau	6
2.1.2 Elektrophorese	7
2.1.3 Migrationszeit.....	8
2.1.4 Trennkapillaren.....	9
2.1.5 Injektion.....	11
2.1.6 Elektroosmotischer Fluss.....	13
2.1.7 Puffersysteme.....	14
2.1.8 Trennleistung.....	15
2.1.9 Trennmethoden.....	16
2.1.10 Detektion	17
3 Ergebnisse und Diskussion	19
3.1 Methodenentwicklung	19
3.1.1 Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Messmethode	20
3.1.2 Variation des Kapillardrucks.....	22
3.1.3 Variation der Kapillarspannung	23
3.1.4 Variation der Kapillartemperatur	24
3.1.5 Variation der Pufferkonzentration und des pH-Wertes	25

3.1.6	Empirische Methodenverbesserungen	29
3.2	Methodenvalidierung.....	40
3.2.1	Spezifität und Selektivität.....	40
3.2.2	Genauigkeit.....	42
3.2.3	Präzision	43
3.2.4	Linearität, Arbeitsbereich und Kalibrierung	47
3.2.5	Detektionslimit	49
3.3	Stabilität der Reaktanden.....	52
3.3.1	Coenzyme A.....	52
3.3.2	Malonyl-Coenzym A.....	55
3.3.3	Acetyl-Coenzym A.....	56
3.3.4	Adenosintriphosphat.....	58
3.4	Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme	59
3.4.1	Reaktion von MatB	60
3.4.2	Reaktion von MatA.....	62
3.4.3	Reaktion von CitZ.....	64
3.4.4	Reaktion von MatB/MatA/CitZ.....	66
3.4.5	Stabilität der Enzyme.....	76
3.4.6	Nachweis der Enzyme mittels CZE-LIF.....	81
3.5	Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme.....	83
3.5.1	Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ	84
3.5.2	Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ	87
3.6	Bestimmung der Aktivität von nativen und immobilisierten Enzymen	90
3.6.1	Stoppen enzymatischer Reaktionen.....	91
3.6.2	Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme.....	94
3.6.3	Aktivitätsbestimmung immobilisierter Enzyme	97
3.7	CE integriertes enzymatisches Reaktorsystem.....	100
3.7.1	Auslegung des Reaktorsystems	100

3.7.2	Stabilität der Enzym-Immobilisierung	103
3.7.3	Reaktion von MatB/MatA/CitZ.....	107
3.7.4	Sequenzielle Zugabe von MatB, MatA und CitZ.....	109
4	Zusammenfassung.....	112
5	Ausblick.....	116
5.1	Optimierungsmöglichkeiten des Produktionssystems	116
5.2	Präparative Reinigung von enzymatischen Reaktionsmatrices mittels FFE	118
5.3	Weitere Optimierung der CE-Trennung	120
5.4	Erweiterung der CE-Trennung	122
6	Material und Methoden	125
6.1	Materialien	125
6.2	Enzyme	127
6.3	Chemikalien	127
6.4	Geräte.....	129
6.5	Software	129
6.6	Puffersysteme.....	130
6.7	CE Methoden.....	131
6.7.1	Standard CZE-UV/Vis Methode	131
6.7.2	Standard CZE-LIF Methode.....	133
6.7.3	Konditionierung der CE Kapillare vor erstmaliger Verwendung	134
6.7.4	Tägliche Konditionierung der CE Kapillare	134
6.8	Validierungen	135
6.8.1	Kalibrierung	135
6.8.2	Detektionslimit	135
6.9	Enzymatische Reaktionen.....	136
6.9.1	Ansetzen der Enzym-Stammaliquote	136
6.9.2	Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen	136
6.9.3	Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen.....	137

6.9.4	Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen	138
6.9.5	Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen	138
6.9.6	Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen	139
6.9.7	Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen	141
6.10	Bestimmung von Enzymaktivitäten	142
6.10.1	Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten	142
6.10.2	Untersuchungen zum Stoppen von Enzymreaktionen durch pH-Wert Änderung.....	143
6.10.3	Bestimmung der Enzymaktivität der nativen Enzyme.....	144
6.10.4	Bestimmung der Enzymaktivität der immobilisierten Enzyme	145
6.10.5	Untersuchungen zur Enzymaktivität	146
6.11	Immobilisierung von Enzymen	148
6.11.1	Berechnung der Kapazität und Beladung der Beads	148
6.11.2	Immobilisierung der Enzyme auf Beads	150
6.12	Enzym-Reaktionen im Reaktor	152
6.12.1	Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen.....	152
6.12.2	Präparation des Reaktors	153
6.12.3	Zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor	155
6.12.4	Untersuchung zur Stabilität der Enzym-Immobilisierung	156
6.12.5	Sequenzielle Zugabe von immobilisierten Enzymen	157
6.13	Datenverarbeitung	158
6.13.1	Ausgabe von elektrophoretischen Daten.....	158
6.13.2	Berechnung von Analyt-Konzentrationen	158
7	Referenzen	159
8	Anhang.....	172

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
(μ)FFE	(Mikro)-Freiflusselektrophorese
O/V-Verhältnis	Oberfläche/Volumen-Verhältnis
AcCoA	Acetyl Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bestimmungsgrenze
BGE	Hintergrundelektrolyt (engl.: <i>background electrolyte</i>)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDER	Engl.: <i>Center for Drug Evaluation and Research</i>
CE	Kapillarelektrophorese (engl.: <i>capillary electrophoresis</i>)
CEC	Kapillarelektrochromatographie (engl.: <i>capillary electrochromatography</i>)
CGE	Kapillargelelektrophorese (engl.: <i>capillary gel electrophoresis</i>)
CIEF	Kapillarisoelektrische Fokussierung (engl.: <i>capillary isoelectric focusing</i>)
CITP	Kapillarisotachophorese (engl.: <i>capillary isotachophoresis</i>)
CitZ	Citratsynthase Y3K-eBFP CitZ
CoA	Coenzym A
CZE	Kapillarzonenlektrophorese (engl.: <i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	<i>Diodenarray</i> -Detektor (engl.: <i>diode array detector</i>)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EG	Erfassungsgrenze
EIC	Extracted ion chromatogram
EMA	Engl.: <i>European Medicines Agency</i>
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FA	Ameisensäure (engl.: <i>formic acid</i>)
FAD	Flavin adenine dinucleotide
GEFI	Gelfiltrationspuffer
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure

HKI	Hans-Knöll-Institut
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high-performance liquid chromatography</i>)
ICH	Engl.: <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
ID	Innendurchmesser (engl.: <i>inner diameter</i>)
IS	Interner Standard
ISAS	Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V.
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz (engl.: <i>laser-induced fluorescence</i>)
LOD	Detektionslimit (engl.: <i>limit of detection</i>)
LRC	Engl.: <i>Leibniz Research Cluster</i>
MalCoA	Malonyl Coenzym A
MatA	Malonyl-CoA Decarboxylase Y3K-mRuby MatA
MatB	Malonyl-CoA Synthetase Y3K-deGFP MatB
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (engl.: <i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
MS	Massenspektrometrie (engl.: <i>mass spectrometry</i>)
NaMal	Natriummalonat
NG	Nachweisgrenze
OD	Außendurchmesser (engl.: <i>outer diameter</i>)
OxAc	Oxalessigsäure
PDA	Photodiodenzeile (engl.: <i>photodiode array</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PS	Polyketid-Synthase
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RSD	Relative Standardabweichung (engl.: <i>relative standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNODC	Engl.: <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbar (engl.: <i>Ultraviolet/visible</i>)

1 Einleitung

Mit der Entdeckung des von durch Mikroorganismen produzierten und antibiotisch wirkenden Sekundärmetaboliten Penicillins (1928) und dessen Großindustrieller Produktion (1940) begann eine medizinische Revolution ¹. In der Folge konnten Millionen Menschenleben durch die Verwendung von Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen geschützt und die durchschnittliche Lebenserwartung um mehrere Jahrzehnte erhöht werden ^{1,2}. Heute, rund 80 Jahre nach dieser Revolution, werden bakterielle Infektionen durch jahrzehntelange übermäßiger Inanspruchnahme, unsachgemäßen Gebrauch und aufgrund mangelnder Entwicklung neuer Antibiotika bedingt durch reduzierte wirtschaftliche Anreize und hoher regulatorischer Anforderungen für pharmazeutische Unternehmen sowohl im Bereich der Medizin als auch im Bereich der Landwirtschaft erneut zur Bedrohung ³⁻⁵. Die übermäßige und oftmals nicht zielgerichtete Behandlung von Infektionen mit Antibiotika führte zu einer immer rascheren Entwicklung von Antibiotika-resistenten Bakterien, welche zunächst durch eine Reihe neuer Antibiotika weiter wirksam behandelt werden konnten. Über die Jahrzehnte hinweg spitzte sich diese Problematik jedoch immer weiter zu. Der Zeitraum zwischen Zulassung eines Antibiotikums und auftretender (Multi-) Resistenz wurde immer weiter verkürzt, während regulatorische Anforderungen bei der Entwicklung und Zulassung von Medikamenten an die pharmazeutischen Unternehmen kontinuierlich stiegen ³. Hinzukam die Einordnung neuer potenter Antibiotika in die Gruppe der Reserve-Antibiotika zur langfristigen Gewährleistung einer Behandlung von schwerwiegenden Infektionen mit multiresistenten Erregern ^{6,7}. Die damit einhergehenden Restriktionen bei der Indikation schränkten eine weitere Vermarktung durch die Pharmaindustrie zunehmend ein. Das wirtschaftliche Risiko einer durchschnittlichen Investition von etwa 1,5 Milliarden US\$ zur marktreifen Entwicklung eines Antibiotikums ⁸ bei ungewisser zeitlicher Wirksamkeit und Vermarktungsmöglichkeit konnte in den letzten Jahren nur noch von wenigen großen Pharmaunternehmen getragen werden. Heutzutage betreiben nur noch vier der größten Pharmaunternehmen aktive Forschung im Bereich der Antibiotika Entwicklung ^{8,9}, wodurch kurz und mittelfristig von enormen Einschränkungen bei der Bekämpfung von bakteriellen Erregern in allen Lebensbereichen auszugehen ist ^{3,10}.

Mit der Erkenntnis und Einsicht über die mit der Antibiotika Krise einhergehenden Risiken führten diese auch auf weltpolitischer Ebene zum Disput ¹¹. Die Folge war eine teilweise, länderspezifische Einführung von Aktionsplänen mit Beschränkungen bei der Verwendung von Antibiotika, einer zielgerichteteren Diagnose und einer individuellen Behandlung von Patienten ^{4,12-14}. Auch wenn diese Maßnahmen bislang nur in einigen wenigen Ländern umgesetzt geworden sind konnten dennoch erste Erfolge durch strikte Hygienemaßnahmen wie die Reduzierung multiresistenter Keime in Krankenhäusern ³ erzielt werden. Dennoch handelte es sich bei diesen präventiven Maßnahmen

oftmals um mittel- und langfristige Erfolgskonzepte ohne den aufkommenden akuten Mangel an medizinischer Versorgung von bakteriellen Infektionen gerecht zu werden. Entsprechend wurde darüber hinaus eine Reduzierung regulatorischer Hindernisse für besonders systemrelevante Medikamente ermöglicht und die öffentliche und privatwirtschaftliche Forschung durch Fördergelder der Länder und der Privatwirtschaft unterstützt, um möglichst kurzfristige Erfolge durch neue wirtschaftliche Anreize zu schaffen ^{4,8}.

Einen solchen Anreiz stellt unter anderem die durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Jahr 2010 gegründete Initiative „Nächste Generation biotechnologischer Verfahren – Biotechnologie 2020+“ zur Förderung nachhaltiger biotechnologischer Produktionsverfahren dar ¹⁵. Im Rahmen dieser Initiative wurde das Leibniz Research Cluster (LRC) Projekt „Bio/synthetische multifunktionale Mikroproduktionseinheiten – neuartige Wege der Wirkstoffentwicklung“ ¹⁶ gefördert, dessen erklärtes Ziel es ist, durch biotechnologische und ingenieurwissenschaftliche Forschung von fünf kooperierenden Leibniz-Instituten Bio-Wirkstoffsynthesen in neuartigen, zellfreien Produktionssystemen zu ermöglichen. Dabei stand vor allem im Vordergrund, die Zelle als Produktionsstätte relevanter Zielmoleküle durch Isolierung biotechnologisch hergestellter Enzyme abzulösen und diese zellfrei als Biokatalysatoren in miniaturisierten Reaktoreinheiten zu verwenden. Konkret sollte im Rahmen des LRC daher ein modulares, zellfreies, enzymatisches und miniaturisiertes Produktionssystem zur Herstellung von Polyketid-Grundbausteinen und Polyketiden entwickelt werden. Polyketide stellen dabei eine große Gruppe von Naturstoffen dar, die als natürliche Metaboliten in verschiedenen Organismen von Polyketidsynthasen auf Basis von Coenzym-A-Fettsäureestern wie Acetyl-Coenzym A und Malonyl-Coenzym A produziert werden ¹⁷⁻¹⁹. Verwendung finden Polyketide als Krebs-, Pilz- und cholesterinsenkende Mittel, Parasitizide, Immunmodulatoren und Antibiotika. Beispiele für Polyketid-Antibiotika stellen Erythromycin und weitere Wirkstoffe aus der Klasse der Tetrazykline und Glycylcycline dar ¹⁷⁻¹⁹. Der jährlich erzielte Umsatz mit auf Basis von Polyketiden hergestellten Arzneimitteln beträgt dabei inzwischen mehr als 20 Milliarden US\$ pro Jahr ¹⁷. Vor allem im Bereich der Antibiotika stellen Polyketide ein großes Potenzial dar, da die Anzahl potenziell zu kultivierender Polyketide-produzierender Mikroorganismen nahezu unbegrenzt erscheint ^{18,19}. Durch die Produktion solcher antibiotisch wirkenden Naturstoffe in miniaturisierten Reaktoren unter Zuhilfenahme von zellfreien Enzym-Biokatalysatoren wird der Produktionsprozess hinsichtlich ökologischer und ökonomischer Faktoren durch geringen Material- und Energieeinsatz, hoher Reaktionsgeschwindigkeiten aufgrund kurzer Diffusionswege und guter Prozesskontrolle zudem zunehmend interessant ^{20,21}.

Daher wurde im Rahmen der Zielsetzung des LRC-Projektes zunächst ein potenzielles modulares Reaktor Design zur Demonstration einer zellfreien Herstellung der Polyketid-Grundbausteine Malonyl-Coenzym A (MalCoA) und Acetyl-Coenzym A (AcCoA) bei gleichzeitigem Recycling des kostenintensiven Reaktanden Coenzym A (CoA) und Produktion von Citrat entworfen (Abbildung 1).

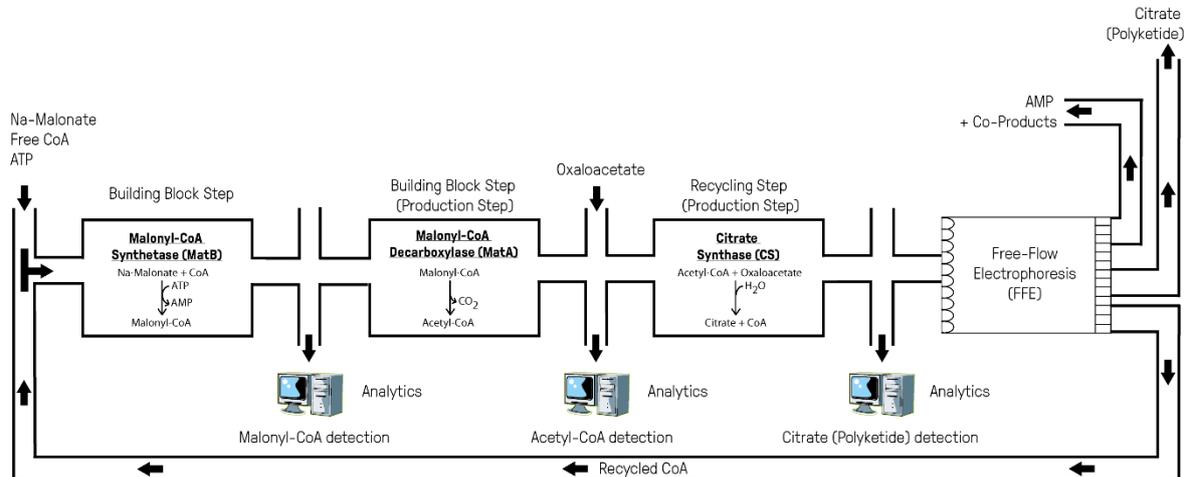


Abbildung 1: Potentielles modulares Reaktordesign zur zellfreien Herstellung von Polyketid-Grundbausteinen und Recycling von kostenintensiven Reaktanden. Eine dreistufige Enzymkaskade der Enzyme Malonyl-CoA Synthetase (MatB), Malonyl-CoA Decarboxylase (MatA) und Citrat Synthase (CS) ermöglicht die Produktion der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA bei gleichzeitiger Wiederverwendung und Separation von CoA und weiteren Co-Produkten durch eine Free-Flow Elektrophorese (FFE) Einheit. Auf Basis der Polyketid-Grundbausteine lässt sich eine Polyketid-Synthase für die Produktion eines Polyketides einsetzen.

In einem ersten Produktionsschritt katalysiert das Enzym Malonyl-CoA Synthetase MatB die Bildung von Malonyl-Coenzym A ausgehend von Natrium Malonat (NaMal) und Coenzym A unter der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) und freiem Phosphat (P) ^{22–24}. In einem zweiten Produktionsschritt katalysiert Malonyl-CoA Decarboxylase MatA die Bildung von Acetyl-Coenzym A ausgehend von MalCoA durch Abspaltung von Kohlendioxid (CO₂) ²⁵. MatA kann entsprechend das von MatB produzierte MalCoA zur Produktion von AcCoA nutzen. In einem dritten und letzten Produktionsschritt katalysiert die Citrat-Synthase CitZ die Bildung von CoA und Citrat ausgehend von AcCoA und Oxalessigsäure (OxAc) ²⁶. CitZ nutzt entsprechend das von MatA produzierte AcCoA zur Produktion von CoA und Citrat. Eine Trennung und Reinigung des Produktionsgemisches soll im Anschluss kontinuierlich über eine Free-Flow Elektrophorese Einheit erfolgen ^{27,28}, die eine Rückführung von unverbrauchten Reaktanden und Abführung von Produkten ermöglichen kann. In diesem Produktionssystem stellt zunächst das durch CitZ synthetisierte Citrat das Produkt dar, welches zu einem späteren Zeitpunkt durch eine geeignete Polyketid-Synthase (PS) zur Herstellung eines Polyketids auf Basis von MalCoA und AcCoA ersetzt werden wird. Das etablierte Recycling von CoA

wird zudem dem Anspruch der BMBF-Initiative nach einem ökonomischen, nachhaltigen, kosteneffizienten und biotechnologiebasierten Produktionsweg gerecht.

Der hohen Komplexität des Projektvorhabens wurde dabei bereits zu Beginn des Projektes mit einem hohen Anspruch an Multidisziplinarität begegnet, wodurch letztlich fünf verschiedene Leibniz-Institute mit vorwiegend biotechnologischer und ingenieurwissenschaftlicher Expertise der Projektbearbeitung betraut wurden. Zwei dieser Leibniz-Institute sollten schwerpunktmäßig die biotechnologische Entwicklung und Herstellung der zellfreien Enzyme gewährleisten. Zwei weitere Leibniz-Institute sollten die Ausarbeitung und Umsetzung eines miniaturisierten modularen Reaktorkonzepts vorantreiben, das in der Lage sein soll, die zellfreie Herstellung von Polyketid-Grundbausteinen und das Recycling von kostenintensiven Reaktanden zu gewährleisten. Neben der biotechnologischen und ingenieurwissenschaftlichen Expertise sollte zudem ein Leibniz-Institut der analytischen Wissenschaften (ISAS - e.V.) unterstützen. Dabei lag der Fokus zunächst vor allem auf der Charakterisierung der zellfreien Enzymreaktionen in den entwickelten Reaktorkonzepten. Im Projektverlauf nahmen die analytischen Wissenschaften darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Bewertung der institutsübergreifenden Projektarbeiten ein. Zudem wurden diese selbst zu einer treibenden Kraft bei der Ausarbeitung und Umsetzung eigener Konzepte, welche in dieser Arbeit beschrieben werden.

1.1 Zielsetzung

Auf dem Weg zur Umsetzung des beschriebenen Reaktordesigns werden im Rahmen dieser Arbeit wichtige projektrelevante Entwicklungsschritte mit starkem analytischem Fokus bearbeitet. Dabei soll zunächst eine adäquate Analysenmethode aus dem Bereich der Trenntechniken zur Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen entwickelt werden. Diese instrumentelle Analysenmethode soll die bislang standardmäßig verwendeten Assay-basierten^{29–33} Methoden ersetzen und dabei die Möglichkeit bieten die bei den enzymatischen Reaktionen genutzten Nukleotide und Co-Enzyme selektiv voneinander zu trennen und die jeweiligen Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktionen zu bestimmen. Dabei soll die Analysenmethode mit geringsten Probenvolumina im Nanoliter- bis Mikroliterbereich und enzymatischen Matrices mit hohem Salzgehalt ohne zusätzliche Probenvorbereitung auskommen, um potenzielle Proben aus miniaturisierten enzymatischen Reaktionssystemen zeiteffizient analysieren zu können. Zudem soll diese präzise, wiederholbar, robust und automatisierbar bei geringem instrumentellem und applikativem Aufwand sein. Anhand der zu entwickelnden Analysenmethode sollen daraufhin die Reaktionen der Enzyme MatB, MatA und CitZ und Kombinationen aus diesen hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit, Spezifität und Kinetik charakterisiert werden. Anschließend soll eine Strategie zur Immobilisierung dieser Enzyme entwickelt und die Nutzbarkeit der Immobilisierung untersucht werden. Dabei soll die Immobilisierung im Idealfall eine Wiederverwendung und vielseitige Nutzung der Enzyme in einem Reaktorsystem ermöglichen. Final soll die Nutzbarkeit der immobilisierten Enzyme im Rahmen einer technischen Anwendung demonstriert werden. Dabei soll ein Reaktorsystem entwickelt werden, das im Rahmen einer Proof-of-Concept Applikation eine einfache *in vitro* Biosynthese der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA darstellt und zur Demonstration einer potenziellen industriellen Anwendbarkeit dient. Dieses Reaktorsystem soll zudem im Sinne der Prozessüberwachung eine direkte Kopplung mit der entwickelten Analysenmethode ermöglichen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kapillarelektrophorese

Elektrophorese wurde erstmals im Jahre 1937 von TISELIUS als Trenntechnik verwendet³⁴. Dabei nutzte TISELIUS die Möglichkeit der Trennung von Proteinmischungen auf Basis der unterschiedlichen Anziehung und Abstoßung enthaltener Ionen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Mit der Fertigungsmöglichkeit von Kapillaren mit immer geringeren Innendurchmessern gelang es JORGENSON in den 1980er Jahren schließlich die Kapillarelektrophorese (engl.: *capillary electrophoresis*; CE) als Analysenmethode zu etablieren, welche heutzutage Verwendung im Bereich der Routineanalytik findet^{35–38}. Dabei zeichnet sich diese durch eine hohe Trennleistung, eine Notwendigkeit geringster Probenvolumina, eine Quantifizierungsmöglichkeit über einfache *on-column* Detektionsmethoden sowieso Massenspektrometrie und einem hohen Grad an Automatisierung aus³⁴.

2.1.1 Instrumenteller Aufbau

Grundsätzlich zeichnet sich die Kapillarelektrophorese durch die Einfachheit ihrer Instrumentierung aus³⁴. Eine Kapillare verbindet dabei die Vorratsgefäße auf der Ein- und Auslassseite. Sowohl Kapillare als auch die beiden Vorratsgefäße sind während der Trennung mit einem Elektrolyten gefüllt. Dieser wird auch als Hintergrundelektrolyt bezeichnet (englisch: *background electrolyte*; BGE). In den meisten kommerziell erhältlichen Geräten wird die Kapillare in einer Kunststoffkartusche installiert. Dadurch wird ein einfacher Ein- und Ausbau der Kapillare und eine Temperierung der Kapillare durch Luft- oder Flüssigkühlung ermöglicht³⁴. Das in dieser Arbeit verwendete Kapillarelektrophorese Gerät PA 800 Plus von Sciex (ehemals Beckman Coulter; siehe Kapitel 6.4 *Geräte*) verfügt über eine Flüssigkühlung zur effizienten Abführung der durch den in der Kapillare fließenden Strom erzeugten Wärme. Neben der Kapillare befindet sich in beiden Reservoirs eine Platinelektrode, die jeweils mit einer Hochspannungsquelle verbunden ist. Mit dieser lassen sich Trennspannungen von bis zu 30 kV an der Kapillare anlegen. Das PA 800 Plus kann außerdem Drücke bis zu 100 psi und Vakua bis zu 5 psi ausüben. Für die Injektion einer Probe (siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion*) wird durch einen *Autosampler* ein Reservoir gegen ein Probengefäß ausgetauscht. Die Injektion der Probe in die Kapillare erfolgt anschließend elektrokinetisch oder hydrodynamisch. Nach der Injektion wird das Probengefäß erneut durch ein Pufferreservoir ersetzt und ein elektrisches Feld über die Hochspannungsquelle an die Kapillare angelegt. Die Analyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten getrennt (siehe Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*). Die Detektion erfolgt direkt auf der Kapillare (*on-column*) oder mit Hilfe verschiedener Kopplungstechniken wie Massenspektrometrie^{34–37}.

2.1.2 Elektrophorese

Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Eine elektrophoretische Trennung basiert dabei auf den unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten von geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ions in einem elektrophoretischen System wird beschrieben durch Gleichung 2-1, wobei v die Lineargeschwindigkeit des Ions, μ_e die elektrophoretische Mobilität und E das applizierte elektrische Feld beschreibt ^{34,39}.

$$v = \mu_e E \quad 2-1$$

Die elektrophoretische Mobilität eines Ions stellt dabei eine stoffspezifische Konstante in einem definierten Medium dar. Die elektrische Feldstärke E in der Kapillare lässt sich als Funktion der angelegten Spannung V und der Kapillarlänge L ausdrücken (Gleichung 2-2) ^{34,39}.

$$E = \frac{V}{L} \quad 2-2$$

Die Mobilität eines Ions ist das Resultat der auf das geladene Teilchen entgegengesetzten elektrischen Kraft F_E (Gleichung 2-3) und der Reibungskraft F_F (Gesetz von STOKES, Gleichung 2-4) ^{34,39}.

$$F_E = q E \quad 2-3$$

$$F_F = -6 \pi \eta r v \quad 2-4$$

Dabei ist q die Ladung des Ions, η die Viskosität der Lösung und r der hydrodynamische Radius des Ions. Bei einer gegebenen Geschwindigkeit gleichen sich die Vektorsummen der entgegengesetzten Kräfte aus und liegen im Gleichgewicht. Im Gleichgewicht ist die Wanderungsgeschwindigkeit des Ions konstant (Gleichung 2-5) ^{34,39}.

$$F_E = q E = 6 \pi \eta r v = F_F \quad 2-5$$

Das Auflösen der Gleichung nach der Geschwindigkeit v und Substituieren von Gleichung 2-5 und Gleichung 2-1 resultiert in einer geräteunabhängigen Gleichung zur Beschreibung der elektrophoretischen Mobilität (Gleichung 2-6) ^{34,39}.

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad 2-6$$

Aus der Gleichung geht hervor, dass kleine, hochgeladene Ionen hohe Mobilitäten und große, niedriggeladene Ionen kleine Mobilitäten besitzen. Dabei ist die elektrophoretische Mobilität eine physikalische Konstante, welche für einen vollständig dissoziierten Stoff (Dissoziationsgrad $\alpha_i = 1$) bei extrapoliertem, unendlicher Verdünnung angegeben wird. Da sich die theoretischen Mobilitäten häufig

von den praktischen Mobilitäten unterscheiden, wird die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} angegeben (Gleichung 2-7)^{34,39}.

$$\mu_{eff} = \alpha_i \mu_e \quad 2-7$$

Die effektive elektrophoretische Mobilität ist entsprechend abhängig von pH, Zusammensetzung und Temperatur des Hintergrundelektrolyten. Für die Bestimmung der Mobilität als Summe der elektrophoretischen (μ_e) und elektroosmotischen (μ_{EOF}) Migration (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*) wird die apparente elektrophoretische Mobilität μ_a eingeführt (Gleichung 2-8)³⁴.

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{l L}{t_a V} \quad 2-8$$

Die apparente elektrophoretische Mobilität hängt von der effektiven Kapillarlänge l , der Gesamtkapillarlänge L , der Migrationszeit des Analytens t_a und der angelegten Spannung V ab³⁴.

2.1.3 Migrationszeit

Eine weitere wichtige Kenngröße elektrophoretischer Analysetechniken ist die Migrationszeit. Die Migrationszeit ist definiert als die Zeit, die ein Ion für die Migration vom Injektionspunkt bis zum Detektionspunkt benötigt. Die Berechnung der Migrationszeit erfolgt durch Quotienten-Bildung von migrierter Strecke und Migrationsgeschwindigkeit. Aufgrund der unterschiedlichen Einflussgrößen auf die Migrationsgeschwindigkeiten der Ionen in der Kapillare und entlang des Detektors⁴⁰ (siehe auch folgende Kapitel) ist es bei der Auswertung kapillarelektrophoretischer Daten nicht unüblich eine Zeitkorrektur der erhaltenen Peakflächen durchzuführen⁴⁰. Die Nutzung zeitkorrigierter Peakflächen soll dazu dienen, die durch die Variation der Migrationsgeschwindigkeit verursachte unterschiedliche Verweilzeit am Detektor und die damit einhergehenden Peakflächen-Variationen zu korrigieren, um die Präzision (siehe Kapitel 3.2.3 *Präzision*) der analytischen Methode zu erhöhen⁴⁰. Zur Berechnung der korrigierten Peakfläche A_{Korr} wird die unkorrigierte Peakfläche A mit der effektiven Kapillarlänge l , also der Länge der Strecke zwischen Injektions- und Detektionspunkt, multipliziert und auf die Migrationszeit des Analytens t_a normiert⁴¹.

$$A_{Korr} = vA = \frac{l A}{t_a} \quad 2-9$$

Eine weitere Korrekturmaßnahme zur Erhöhung der Präzision analytischer Daten (siehe Kapitel 3.2.3 *Präzision*) in CE Applikationen kann die Verwendung eines internen Standards darstellen⁴²⁻⁴⁷. Die Verwendung eines internen Standards ermöglicht die Korrektur einiger systematischer Fehler beispielsweise bei der Probenvorbereitung (z.B. Volumen- und Wägefehler) und der Messung (z.B.

schwankende Injektionsvolumina). Grundsätzlich sollte der interne Standard eine strukturelle Ähnlichkeit zu den zu untersuchenden Analyten aufweisen, sich messtechnisch von den Analyten unterscheiden lassen (z.B. spektrale Unterscheidbarkeit, elektrophoretische Trennbarkeit), stabil und nicht Bestandteil der zu untersuchenden Proben sein. Eine weitere Eigenschaft, der ein interner Standard gerecht werden muss ist, dass dieser keine Interaktion mit Probenbestandteilen eingeht. Die Korrektur der Messdaten erfolgt durch die Normierung der erhaltenen Signale (z.B. Peakhöhen, Peakflächen) eines Analyten (a) auf die Signale des internen Standards (IS) der gleichen Analyse^{42,43}. In dieser Arbeit werden zur Erhöhung der analytischen Präzision sowohl zeitkorrigierte Peakflächen (A_{Korr}) als auch auf den internen Standard normierte, zeitkorrigierte Peakflächen ($A_{Norm, Korr}$) verwendet.

$$A_{Norm, Korr} = \frac{A_{Korr,a}}{A_{Korr,IS}} \quad 2-10$$

Die externe Kalibrierung erfolgt entsprechend analog unter Verwendung der auf den internen Standard normierten, zeitkorrigierten Peakflächen, des Y-Achsenabschnitts y , der Steigung m und der Stoffmengenkonzentration c .

$$\frac{A_{Korr,a}}{A_{Korr,IS}} = y + m \frac{c_a}{c_{IS}} \quad 2-11$$

Alternativ lässt sich die Verwendung der elektrophoretischen Mobilität anstelle der Migrationszeit nutzen^{48,49}. Dabei wird der zeitliche Maßstab von der Migrationszeit in die Mobilität transformiert. Die Mobilität und die Peakbreite ist dabei unabhängig von der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten beim Passieren des Detektors und ermöglicht eine höhere Wiederholpräzision^{48,49}.

2.1.4 Trennkapillaren

Die Anforderungen an die Eigenschaften von Trennkapillaren sind sehr vielseitig. Die Kapillaren sollen chemisch und physikalisch inert sein, aus Detektionsgründen für Wellenlängen im UV/Vis-Bereich durchlässig, flexibel, robust und kostengünstig sein und weitere anwendungsspezifische Eigenschaften aufweisen^{34,50,51}. Aufgrund dieser Ansprüche werden in der Praxis hauptsächlich unbeschichtete Quarzglas kapillaren verwendet. Quarzglas kapillaren sind mit Innendurchmessern zwischen 10 und 200 μm und Außendurchmessern von zwischen 150 und 520 μm kommerziell erhältlich. Die am häufigsten genutzten Quarzglas kapillaren haben Innendurchmesser zwischen 25 und 100 μm und Außendurchmesser von zwischen 350 und 400 μm . Die Wahl der Länge der Kapillare hängt von der geforderten Qualität der Trennung und Analysenzeit ab. Daher variiert die Länge der Kapillare von 10 cm für gelgefüllte Kapillaren und bis zu 100 cm Kapillaren für komplexere Kapillarzonenelektrophorese (englisch: *capillary zone electrophoresis*; CZE) -Applikationen (siehe Kapitel 2.1.9 *Trennmethoden*)^{34,50}. Zur Erhöhung der Flexibilität und Robustheit der Kapillaren, werden

diese mit Polyimid beschichtet. Für eine optische Detektion direkt auf der Kapillare muss die Polyimid Beschichtung am Detektionspunkt entfernt werden, um ein transparentes Detektionsfenster zu erstellen. Darüber hinaus sind Quarzglas kapillaren aufgrund ihrer freien Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche nicht vollständig inert, wodurch es zum Auftreten des Elektroosmotischen Flusses (EOF) kommt (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*)^{34,51}. Zudem kann es zu Interaktionen von Bestandteilen des Trennsystems und der Kapillaroberfläche kommen. Dazu zählen ionische, als auch hydrophobe (z.B. Van-der-Waals-kräfte) und hydrophile Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) von Analyten und Hintergrundelektrolyten mit der negativ geladenen Kapillarwand. Dabei hängt die Deprotonierung der Silanolgruppen ($pK_s=6.3$ ⁵²) vom jeweiligen pH-Wert des Hintergrundelektrolyten ab. Bei pH-Werten größer 3 erfolgt eine signifikante Deprotonierung der Silanolgruppen ($\text{SiOH} \rightarrow \text{SiO}^-$)⁵³. Diese Interaktionen mit der negativ geladenen Kapillarwand werden durch das hohe Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis (O/V-Verhältnis) kleindimensionierter Kapillaren begünstigt und können signifikanten Einfluss auf die Trennung haben. Vor allem bei Trennungen von Peptiden und Proteinen, die sowohl ionische als auch hydrophobe Interaktionen eingehen können, können Adsorptionseffekte Einfluss nehmen. Andererseits begünstigt das hohe O/V-Verhältnis die effiziente Wärmeabfuhr aus der Kapillare³⁴.

Zur Unterdrückung oder zur Kontrolle der verschiedenen Wechselwirkungen und des EOFs lässt sich die Kapillaroberfläche auf verschiedene Arten modifizieren. Dabei werden permanente und dynamische Modifizierungen unterschieden. Bei permanenten Modifizierungen wird die Kapillare durch chemisches oder physikalisches Binden funktioneller Moleküle verändert. Dabei handelt es sich häufig um einfache Silane, die mit einer weiteren funktionellen Gruppe versehen sind und an der Kapillaroberfläche über eine Siloxanbindung (Si-O-Si) chemisch binden. Durch anschließende Polymerisationsreaktion mit z.B. Methylacrylamid und Bisacrylamid wird die Oberfläche deaktiviert. Physikalische desaktivierende Modifizierungen können beispielsweise durch die Abscheidung von Polyethylenglykol (PEG) oder Polyvinylalkohol (PVA) erfolgen^{34,51}. Dynamische Modifizierungen werden durch Zugabe von Modifikatoren zum Hintergrundelektrolyten umgesetzt. Die modifizierenden Zusätze benetzen dabei permanent die Kapillaroberfläche. Allgemein lassen sich sowohl durch dynamische als auch permanente Modifizierungen⁵¹ Interaktionen zwischen Kapillaroberfläche und Bestandteilen aus dem Trennsystem beeinflussen, als auch der EOF aufgehoben, reduziert, umgekehrt oder verstärkt werden. Die unterschiedlichen Modifizierungsstrategien weisen jeweils verschiedene Vor- und Nachteile auf, welche für die jeweilige Anwendung abgewogen werden müssen. Eine ausführlichere Diskussion der verschiedenen Methoden erfolgt im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen Relevanz nicht.

Die Oberflächenbeschaffenheit ist auch für unbeschichtete Quarzglaskapillaren essentiell. Die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten hängt von einer sorgfältigen Konditionierung der Kapillare vor den Trennungen ab. Daher sollte die Kapillare täglich mehrere Minuten mit Natriumhydroxid, Wasser und Trennpuffer gespült werden. Zusätzlich sollte ein kurzer Spülvorgang vor jeder Messung in die Methode eingebunden werden³⁴. Die genaue Vorgehensweise der Konditionierung, die in der Arbeit verwendet wurde, ist in Kapitel 6.7.3 *Konditionierung der CE Kapillare vor erstmaliger Verwendung* und 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare* beschrieben.

2.1.5 Injektion

Neben einer Vielzahl verschiedener Injektionsmethoden sind vor allem die hydrodynamische und elektrokinetische Injektion etabliert. Am häufigsten wird die hydrodynamische Injektion verwendet, wobei ein Überdruck an der Injektionsseite der Kapillare oder ein Unterdruck an der Detektionsseite appliziert wird^{34,39}. Vorteilhaft an der druckbasierten Injektionsmethode ist, dass die injizierte Probenmenge unabhängig von der Probenmatrix ist und es nicht zur Diskriminierung von Probenbestandteilen kommt. Das Injektionsvolumen V_{inj} mittels hydrodynamischer Injektion lässt sich nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gleichung 2-12) berechnen³⁴:

$$V_{inj} = \frac{\Delta P r^4 \pi t_{inj}}{8 \eta L} \quad 2-12$$

Das injizierte Probenvolumen hängt von dem angelegten Druck ΔP , der Viskosität des Puffers η , der Injektionszeit t_{inj} , der Gesamtkapillarlänge L und dem Radius der Kapillare r ab. In der Praxis betragen die Injektionszeiten bis zu 30 Sekunden bei Injektionsdrücken von etwa 25-100 mbar (0,35-1,45 psi)³⁴.

In der Kapillarelektrophorese sind die Injektionsvolumina bedingt durch die geringen Kapillardimensionen grundsätzlich sehr gering. Die Injektionsvolumina werden in Abhängigkeit der Probenzonenlänge gewählt, welche näherungsweise nicht länger als 1 bis 2 % der Gesamtkapillarlänge (oder des Gesamtvolumens nach $V_{Kapillare} = \pi r^2 L$) betragen sollte. Ein Verlust an Auflösung durch Überladung der Kapillare mit Probenvolumen wird somit verhindert³⁴. Das maximale Injektionsvolumen einer 60 cm langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm liegt entsprechend bei etwa 12 bis 24 nL bei einem Gesamtkapillarvolumen von etwa 1178 nL. Grundsätzlich werden in Abhängigkeit der Kapillardimensionen Probenvolumina von etwa 1 bis 50 nL gewählt^{34,39}. Im Vergleich zu Anwendungen in der konventionellen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *high-performance liquid chromatography*; HPLC) sind die Injektionsvolumina in der CE um bis zu drei Größenordnungen geringer. Eine Überladung der Kapillare mit Probenvolumen wirkt sich aufgrund von peakverbreiternden und -deformierenden Effekten negativ auf die Trenneffizienz (siehe Kapitel 2.1.8 *Trennleistung*) aus^{34,39}. Grund dafür ist, dass die Länge der diffusionskontrollierten Zone

kleiner ist als die des Probenpfropfens. Die maximale Probenpfropflänge L_{inj}^{max} lässt sich, wie bereits beschrieben, grob abschätzen oder über folgende Gleichungen mit dem Diffusionskoeffizienten D , der Migrationszeit t_D und dem Radius der Kapillare r berechnen ³⁴.

$$L_{inj}^{max} = \sqrt{6Dt_D} \quad 2-13$$

$$\Delta P t_{inj} = \frac{L_{inj}^{max} 8 \eta L}{r^2} \quad 2-14$$

Die Injektionsparameter ergeben sich entsprechend aus der Kombination von angelegtem Druck ΔP und Injektionszeit t_{inj} . In der Praxis wird häufig aufgrund fehlender Daten zu Diffusionskoeffizienten die maximale Probenmenge näherungsweise bestimmt. Neben dem Injektionsvolumen ist die Konzentration bzw. die Leitfähigkeit der Probe im Vergleich zum BGE entscheidend für die Trenneffizienz. Ist die Leitfähigkeit der Probe gering im Vergleich zum BGE ist das elektrische Feld in der Probenzone und damit die Migrationsgeschwindigkeit der Analyten hoch (vgl. Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*) ³⁴. Wird der Unterschied zu groß, liegt das Peakmaximum im vorderen Teil der Probenzone und führt zu *Peak Tailing*. Entsprechend umgekehrt verhält es sich bei hohen Leitfähigkeiten in der Probenzone. Die Trenneffizienz ist letztlich ein Zusammenspiel aus Volumen, Konzentration und Leitfähigkeit der injizierten Probe. Werden diese Einflussgrößen im Vergleich zum BGE geschickt gewählt, lässt sich die Trenneffizienz durch sogenanntes „Stapeln“ der Analytmoleküle (engl.: *sample stacking*) erhöhen. Dabei werden die Analyt Moleküle an der Grenzfläche zwischen BGE und Probenzone angereichert und nehmen ein geringeres Volumen ein. Damit sind die Analyt Zonen und folglich die Peaks schmaler ³⁴.

Eine weitere Möglichkeit zur Probenapplikation ist die elektrokinetische Injektion. Dabei wird eine Spannung an der Kapillare angelegt, wodurch die Analyten aus der Probe in die Kapillare migrieren. Typische Spannungen sind dabei etwa drei bis fünf Mal kleiner als die eigentliche Trennungsspannung. Die Injektionszeiten betragen etwa 10 bis 30 Sekunden. Die injizierte Menge Q (Masse in Gramm oder Stoffmenge in Mol) wird unter Einbezug der Analytkonzentration C nach Gleichung 2-15 berechnet ^{34,39}.

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L} \quad 2-15$$

Anhand der Gleichung ist ersichtlich, dass die injizierte Menge abhängig ist von der Mobilität der Analyten und vom EOF. Dadurch werden die Analyten mit geringerer Mobilität diskriminiert, weil sie langsamer in die Kapillare migrieren. Entsprechend werden mehr Analyten mit höherer Mobilität injiziert. Die dann gemessene Probenzusammensetzung entspricht nicht derjenigen in der ursprünglichen Probe. Gleiches betrifft die Matrix der Probe, wobei z.B. die injizierte Menge bei

variierendem Salzgehalt unterschiedlich sein kann, weil sich der Widerstand der Probe und die elektrische Feldstärke ändern. Anwendung findet die elektrokinetische Injektion in Applikationen mit Trennproblemen von viskosen Medien oder Gelen ³⁴.

2.1.6 Elektroosmotischer Fluss

Der elektroosmotische oder auch elektroendoosmotische Fluss (engl.: *electroosmotic flow*; EOF) ist ein fundamentales Phänomen in der Kapillarelektrophorese ³⁴. Der EOF ist ein Fluss (Massen-/Stoffstrom) der Pufferlösung, der aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit der Kapillarinnenwand auftritt. In wässriger Lösung weisen die meisten Glas- und Quarzoberflächen (z.B. unbelegte QuarzglasKapillaren) eine negative Überschussladung auf. Ursächlich dafür sind die deprotonierten, terminalen Silanolgruppen und oder oder die Adsorption von Ionenspezies an der Oberfläche. Die negative Überschussladung wird durch positiv geladene Gegen-Ionen aus der Pufferlösung überlagert, um das örtliche Ladungsungleichgewicht auszugleichen. Kationen reichern sich an der Oberfläche an und bilden eine elektrische Doppelschicht aus. Die gebildete elektrische Doppelschicht besteht aus einer starren STERN-Schicht und einer diffusen Schicht ³⁴. In der STERN-Schicht befinden sich aufgrund von COULOMB-Wechselwirkungen mehr Kationen als Anionen. Die Anzahl der Kationen verringert sich bei steigendem Abstand zur Kapillarwand linear in der starren Schicht und exponentiell in der diffusen Schicht. Konsequenz der ungleichen Ladungsverteilung ist ein Potential zwischen den Schichten, das ζ - (Zeta)-Potential. Wird ein elektrisches Feld an der Trennkapillare angelegt werden die Kationen der diffusen Schicht von der Kathode angezogen. Die Kationen selbst sind im Lösungsmittel solvatisiert und ziehen die umgebenen Lösungsmittelmoleküle mit. Das ζ - (Zeta)-Potential führt also zur Ausbildung des EOFs.

Die Geschwindigkeit und die Mobilität des EOF lassen sich anhand der folgenden Gleichungen 2-16 und 2-17 berechnen ^{34,39}.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{\eta} \quad 2-16$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad 2-17$$

Sowohl Geschwindigkeit als auch Mobilität des EOF sind anhängig von der Dielektrizitätskonstanten ϵ und vom ζ -Potential, welches hauptsächlich bestimmt wird durch das Wand Potential ψ_0 ($\zeta \approx \psi_0$). Es ist auch ersichtlich, dass der EOF proportional abhängig von dem elektrischen Feld ist. Darüber hinaus unterliegen die terminalen Silanol-Gruppen der Säure-/Base-Reaktion, dessen Gleichgewicht stark vom pH des umgebenen Mediums abhängt. Entsprechend variiert die Mobilität des EOFs mit dem pH-

Wert. Signifikanten Einfluss gewinnt der EOF bei pH-Werten größer als 3⁵³. Bei geringen pH-Werten werden die Silanol-Gruppen protoniert und der EOF unterdrückt. Ebenso führt eine Erhöhung der Ionenstärke und der Konzentration des BGE zur Komprimierung der elektrischen Doppelschicht, wodurch das ζ -Potential und der EOF reduziert werden⁵⁴. Eine weitere Einflussgröße ist die Temperatur. Bei einer Temperaturänderung von 1 °C ändert sich die Viskosität des BGE um 2-3 %³⁴. Entsprechend variiert mit der Viskosität auch die Geschwindigkeit des EOFs. Neben den bereits genannten Möglichkeiten gibt es eine Reihe weiterer komplexerer Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOFs, die bereits in Kapitel 2.1.4 *Trennkapillaren* diskutiert wurden.

Das Vorkommen des EOFs kann aber auch von Vorteil sein, denn der EOF trägt, anders als in druckbetriebenen Systemen, im Idealfall nicht zur Bandenverbreiterung bei^{34,39}. Aufgrund der gleichmäßig verteilt wirkenden elektrischen Kraft wird in der Kapillarelektrophorese, im Gegensatz zu druckgetriebenen Systemen bei denen Scherkräfte zu einem parabolischen Flussprofil führen, ein flaches Flussprofil ausgebildet. In der Praxis hingegen treten einige bandenverbreiternde Effekte auf (siehe Kapitel 2.1.8 *Trennleistung*)^{55,56}. Der EOF kann in verschiedenen Anwendungen genutzt werden, um beispielsweise Analysenzeiten zu reduzieren ohne an Trennleistung zu verlieren. Zudem wird es ermöglicht negative, neutrale und positive Ionen in einer Analyse zu detektieren^{34,39}.

2.1.7 Puffersysteme

Die Auswahl des richtigen Puffersystems ist in der Kapillarelektrophorese von hoher Bedeutung³⁴. Grundsätzlich findet während einer kapillarelektrophoretischen Trennung eine Elektrolyse an den Elektroden statt. Bei der Elektrolyse von Wasser (H₂O) an der Kathode wird Wasserstoff (H₂) durch die Reduktion von Oxonium-Ionen (H₃O⁺) produziert ($2\text{H}_3\text{O}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Der pH-Wert der umgebenen Pufferlösung steigt. Dahingegen wird durch die Elektrolyse von Wasser (H₂O) an der Anode Sauerstoff (O₂) durch die Oxidation von Hydroxid-Ionen (OH⁻) produziert ($4\text{OH}^- \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^-$)³⁴. Der pH-Wert der umgebenen Pufferlösung sinkt. Entsprechend kann das Puffersystem und dessen pH-Wert bei geringer Kapazität bedeutenden Einfluss auf den EOF als auch auf den Protonierungszustand der Analyten und damit der elektrophoretischen Trennung nehmen. Entsprechend sollte ein Puffersystem verwendet werden, dass unter den gewählten Methodeneinstellungen (z.B. Spannung, Trenndauer etc.) durch eine möglichst hohe Kapazität stabile Trennbedingungen ermöglicht. Die Kapazität eines Puffersystems hängt dabei vor allem von dessen Zusammensetzung, Konzentration, pH-Wert und Volumen ab³⁴. Eine Auswahl gängiger Puffersysteme ist nachfolgend dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht einiger gängiger Puffersystem in der CE ³⁴.

Puffer	pH-Bereich	UV-Transparenz bis [nm]
Phosphat	1,1 – 3,1	195
Formiat	2,7 – 4,8	200
Acetat	3,8 – 5,8	200
Citrat	3,8 – 4,8	200
MES	5,1 – 7,1	230
Citrat	5,4 – 7,4	200
PIPES	5,8 - 7,8	215
Phosphat	6,2 - 8,2	195
HEPES	6,5 - 8,5	230
TRIS	7,3 - 9,3	220
Borat	8,1 - 10,1	180

2.1.8 Trennleistung

Grundsätzlich zeichnet sich die CE durch ein sehr hohes Trennvermögen aus ³⁴. Das Trennvermögen beschreibt dabei die Fähigkeit eines Analysensystems die Peaks zweier Analyten einer Probe voneinander zu trennen. Als Maß für die Trennleistung wird häufig die Bodenhöhe H (Gleichung 2-18) und die Trennstufenzahl bzw. Anzahl theoretischer Böden N (Gleichung 2-19) angegeben ³⁴. Dabei gilt je niedriger die Bodenhöhe und je höher die Trennstufenzahl desto geringer die Verbreiterung der Trennzone bzw. der Peakhalbwärtsbreite $w_{1/2}$ des jeweiligen Peaks und desto höher die potenziell zu erzielende Auflösung R (Gleichung 2-20) ³⁴.

$$N = 5,54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad 2-18$$

$$H = \frac{l}{N} \quad 2-19$$

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu_a}{\bar{\mu}_a} \right) \quad 2-20$$

In der CE werden Trennstufenzahlen von bis zu 500.000 erreicht und damit deutlich höher als in konventionellen HPLC Trennungen ⁵⁷. Neben den grundsätzlich unterschiedlichen Trennmechanismen der wiederholten Verteilung von Analyten zwischen Flüssig- und Festphase bei der Flüssigkeitschromatographie und der Migration geladener Analyten im wässrigen Medium unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bei der CE ist das hohe Trennvermögen vor allem auf das durch den EOF (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*) ausgebildete flache Flussprofil zurück zu führen ^{34,39}. Dadurch beschränken sich die bandenverbreiternden Effekte im Idealfall nur auf die Longitudinal- bzw. Axial-Diffusion. Peakverbreiternde Einflussgrößen wie die Streu-Diffusion und der Massentransfer

(siehe auch weiterführende Literatur zur Van-Deemter-Theorie), wie sie in der Flüssigkeitschromatographie auftreten, finden in unbelegten Quarzglas Kapillaren nicht statt^{34,55,56}.

In der Praxis können allerdings weitere peakverbreiternde Effekte auftreten. Dazu zählen im Wesentlichen durch JOULE'sche Wärme induzierte Temperaturgradienten innerhalb der Kapillare, eine zu hohe Probenpfropflänge (siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion*), unspezifische Wechselwirkungen von Analyten mit der Kapillarwand und Elektrodyspersion (nicht angepasste Verhältnisse der Leitfähigkeiten von Probe und Hintergrundelektrolyten)^{34,55,56}.

2.1.9 Trennmethoden

In der Kapillarelektrophorese gibt es eine Vielzahl von Trennmethoden, welche mit einem Standard CE Instrument durchgeführt werden können. Die einfachste Messmethode ist die Kapillaronenelektrophorese (engl.: *capillary zone electrophoresis*; CZE), welche in dieser Arbeit genutzt wird³⁴. Wie bereits in den Kapiteln 2.1.1 *Instrumenteller Aufbau* und 2.1.2 *Elektrophorese* im Rahmen der Elektrophorese beschrieben, sind in der CZE die Kapillare und die Vorratsgefäße mit BGE gefüllt. Die Probe wird auf der Probenaufgabenseite injiziert und ein elektrisches Feld an der Kapillare angelegt. Die Trennung basiert auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten, wodurch diskret migrierende Analyt Zonen in der Kapillare entstehen. Die Mobilität hängt dabei hauptsächlich von dem Größe-zu-Ladung-Verhältnis des Ions ab. Kleine Ionen mit hoher Ladungszahl migrieren schneller, als große Ionen mit kleiner Ladungszahl. Neutrale Analyten werden vom EOF mitgezogen und nicht voneinander separiert (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*). Unter Standardbedingungen liegt der Pluspol dabei an der Einlassseite (Anode) und der Minuspol (Kathode) an der Detektionsseite der Kapillare. Bei Verwendung einer unbelegten Quarzglas Kapillare und ohne Zugabe von Modifikatoren (siehe Kapitel 2.1.4 *Trennkapillaren* und 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*) ist der EOF in Richtung der Kathode gerichtet. Dies ermöglicht neben den geladenen Analyten ebenso die Detektion neutraler Analyten, die mit dem EOF mitgezogen werden. Positive Ionen wandern entlang des EOFs und negativ geladene Ionen entgegen des EOFs^{34,39}.

Abgesehen von der CZE wurde die Kapillargelelektrophorese (engl.: *capillary gel electrophoresis*; CGE) in der molekularbiologischen Forschung etabliert³⁴. Mit der CGE werden größenspezifische Trennungen von Makromolekülen, beispielsweise Proteine, Desoxyribonukleinsäuren (engl.: *deoxyribonucleic acid*; DNA) und Ribonukleinsäuren (engl.: *ribonucleic acid*; RNA), ermöglicht. Dabei wird eine Kapillare mit Gel gefüllt, in welchem die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*; SDS) denaturiert und linearisiert werden. Die mit SDS-gesättigten Proteine weisen dann ein ähnliches Masse-zu-Ladung-Verhältnis auf und werden beim Durchlaufen der Kapillare durch den „Molekularsieb-Effekt“ des Gels nach ihrer Größe getrennt, wobei größere bzw. längere Proteine

stärker beim Durchlaufen der der Nutzstruktur des Gels gehindert werden als kleinere bzw. kürzere Proteine. Kleinere Moleküle werden entsprechend früher detektiert als große Moleküle ^{34,39}.

Darüber hinaus gibt es vier weitere eher seltener genutzte Trennmethoden ³⁴. Die mizellare elektrokinetische Chromatographie (engl.: *micellar electrokinetic chromatography*; MEKC) und die Kapillarelektrochromatographie (engl.: *capillary electrochromatography*; CEC) sind Hybriden der Elektrophorese und der Chromatographie. Die Trennung wird dabei neben dem elektrischen Feld zusätzlich durch die wiederholte Verteilung der Analyten zwischen zwei Phasen beeinflusst. In der kapillarisoelektrischen Fokussierung (engl.: *capillary isoelectric focusing*; CIEF) und in der Kapillarisotachophorese (engl.: *capillary isotachopheresis*; CITP) werden Analyten in Abhängigkeit diskontinuierlicher Elektrolyt-Systeme getrennt ³⁴. Für detaillierte Informationen zu den Trennmethoden sei an dieser Stelle auf die entsprechende Literatur verwiesen.

2.1.10 Detektion

Eine sensitive Detektion in der CE ist aufgrund der kleinen Dimensionen der Kapillare und der geringen Injektionsvolumina sehr herausfordernd ³⁴. Um Peakverbreiterungen durch Totvolumina, verursacht durch integrierte Detektionszellen, Anschluss- oder Verbindungstücke, zu verhindern hat sich die Detektion direkt auf der Kapillare (engl.: *on-column detection methods*) als Methode der Wahl durchgesetzt. Zu den am häufigsten genutzten *on-column* Detektionsmethoden zählen die UV/Vis Spektroskopie (engl.: *Ultraviolet/visible spectroscopy*; UV/Vis spectroscopy), die Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) und die Leitfähigkeitsdetektion. In der CE werden entsprechend die gleichen Detektionsmethoden wie in der HPLC verwendet. Neben der Detektion direkt auf der Kapillare kann die CE mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt werden. Die MS Detektion ist sensitiv und ermöglicht strukturelle Rückschlüsse des Analyten, allerdings ist die Kopplung technisch herausfordernd ^{34,39}.

Die am häufigsten und auch in dieser Arbeit verwendete *on-column* Detektionsmethode stellt die UV/Vis-Detektion dar ³⁴. Die UV/Vis-Detektion stellt einen guten Kompromiss aus Handhabbarkeit, Sensitivität und Selektivität dar und ist somit universell einsetzbar. Nach Erstellung eines Detektionsfensters durch Abbrennen oder Abätzen der Polyimid-Beschichtung der Kapillare, lässt sich die punktuell transparente Kapillare für eine UV/Vis Detektion in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis zu 600 nm einsetzen. Dabei ist es vor allem aufgrund der kleinen Kapillardimensionen notwendig eine optimale Fokussierung des Lichts auf die Kapillare über einen optischen Schlitz zu gewährleisten. Dabei hängen sowohl Auflösung, Sensitivität als auch Linearität von der Schlitzlänge als auch von der Schlitzbreite ab ^{34,39}.

Die Abschwächung von elektromagnetischer Strahlung beim Durchtritt durch ein Medium lässt sich dabei über das LAMBERT-BEER'sche Gesetz beschreiben (Gleichung 2-21)³⁹:

$$E_{\lambda} = \log \left(\frac{I_0}{I_{\lambda}} \right) = \varepsilon_{\lambda} c d \quad 2-21$$

Das LAMBEERT-BEER'sche zeigt, dass die dimensionslose Extinktion E_{λ} von dem molaren Extinktionskoeffizienten ε_{λ} , der molaren Konzentration c und der Schichtdicke d beziehungsweise von dem Quotienten aus der Intensität vor und nach der Transmission der Strahlung durch ein Medium I_0 und I_{λ} abhängt. Dabei stellt d den intensitätslimitierenden Parameter dar. Bei konstantem ε_{λ} und d lässt sich ein simpler linearer Zusammenhang zwischen Intensität und Konzentration des Analyten im linearen Bereich des Detektors herstellen und sich somit eine Quantifizierung ermöglichen. In den meisten CE-Instrumenten werden inzwischen Diodenarray-Detektoren (DAD) verbaut, welche es ermöglichen vollständige UV/Vis-Spektren über den gesamten Wellenlängenbereich gleichzeitig zu messen. Damit wird ein weitaus größerer Informationsgewinn im Vergleich zur klassischen, auf einer Wellenlänge arbeitenden UV/Vis-Detektion ermöglicht. Somit lassen sich beispielsweise Analyt-Spektren durch den Abgleich mit Spektren-Datenbanken identifizieren und Peak-Reinheiten bestimmen^{34,39}.

Eine weitere und ebenfalls in dieser Arbeit verwendete *on-column* Detektionsmethode stellt die Laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion (LIF) dar³⁴. Die LIF-Detektion ist extrem sensitiv, erfordert in der Regel allerdings eine zusätzliche Derivatisierung des Analyten mit einem kovalent gebundenen Fluoreszenzmarker. Bei der LIF-Detektion wird eine Probe in der Kapillare über ein erstelltes Detektionsfenster mit energiereicher, monochromatischer Strahlung (Laser mit wenigen Milliwatt Leistung) bestrahlt. Entspricht die Anregungswellenlänge eines Moleküls der des Lasers, wird das Molekül durch die Anregungsstrahlung in ein Schwingungsniveau v des ersten angeregten Elektronenzustandes E_1 angehoben (E_1v_x). Von dort fällt das Molekül durch strahlungsfreie Energieabgabe in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Elektronenzustandes (E_1v_0) und anschließend durch die Abgabe von Strahlungsenergie in einen Schwingungszustand des Grundzustandes (E_0v_x) zurück. Bei der dabei abgegebenen Strahlung handelt es sich um Fluoreszenz, dessen Wellenlänge entsprechend höher als die Anregungswellenlänge des Lasers ist. Somit wird eine Verschiebung der Wellenlänge hin zu höheren und energieärmeren Wellenlängen beobachtet. Darüber hinaus lassen sich zudem Streulicht der Anregungswellenlänge, fluoreszierende Verunreinigungen als auch Raleigh- und Raman Streuung des Solvens detektieren. Zur Gewährleistung eines möglichst geringen Untergrundsignals werden diese Signale mit spektralen Filtern oberhalb der Anregungswellenlänge des Lasers unterdrückt³⁴.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt, erläutert und anschließend im Gesamtzusammenhang diskutiert. Dabei gliedert sich der Ergebnisteil im Wesentlichen in die Bereiche Methodenentwicklung und Methodvalidierung, der Charakterisierung von nativen als auch immobilisierten Enzymen in enzymatischen Reaktionen und der Entwicklung sowie der Applikation eines in die CE integrierten miniaturisierten, enzymatischen Produktionssystems.

3.1 Methodenentwicklung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Messmethode zur kinetischen Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen von MatB, MatA und CitZ (siehe Kapitel 3.4.1 *MatB*, 3.4.2 *MatA* und 3.4.3 *CitZ*) entwickelt werden. Die Messmethode sollte dabei messtechnisch als auch applikativ einfach, präzise, spezifisch, selektiv, wiederholbar und automatisierbar bei hoher Trennleistung, minimalen Probeneinsatz und möglichst geringer Probenvorbereitung sein. Eine Analysenmethode die potenziell all diesen Ansprüchen gerecht werden kann ist die Kapillarelektrophorese (CE)^{34–37,50}. Als Stärken der CE lassen vor allem eine hohe Trennleistung, extrem geringe Probenvolumina (1-50 nl) und ein geringer gerätetechnischer Aufwand nennen. Insbesondere die hohe Trennleistung und die geringen Probenvolumina ermöglichen oftmals kurze Analysezeiten bei vernachlässigbarem Probeneinsatz, welche einer Verwendung labiler und hochpreisiger Analyten entgegenkommt. Hinsichtlich der Analyse von Enzymreaktionen ermöglichen die geringen benötigten Probenvolumina die Durchführung von Reaktionsansätzen im Mikroliter-Bereich. Zudem lassen sich potenziell Proben aus Enzymreaktionen mit komplexer Matrix trotz hoher Salzfracht und der Gegenwart von Proteinen ohne weitere Probenvorbereitung analysieren^{58,59}. Die Automatisierbarkeit der CE-Messungen birgt zudem das Potenzial zur Messung zeitaufgelöster Enzymreaktionen durch Mehrfachinjektionen ein und desselben Reaktionsgemisches zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion. Darüber hinaus lässt sich die CE mit diversen Detektorsystemen, wie beispielsweise mit dem UV/Vis- und PDA-Detektor, dem Laserinduzierten Fluoreszenz (LIF)-Detektor und der Massenspektrometrie (MS) koppeln^{34–37,50}. Aufgrund dieser Faktoren wurde entschieden eine kapillarelektrophoretische Messmethode zur Charakterisierung der in dieser Arbeit zu untersuchenden enzymatischen Produktionssysteme zu entwickeln.

Hinweis: Daten dieses Kapitels wurden bereits teilweise in anderer Form im Rahmen einer von Dominic Mähler während des Promotionsprojektes angeleiteten Bachelor Arbeit veröffentlicht⁶⁰.

3.1.1 Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Messmethode

Für die Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Messmethode wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt, um erste Anhaltspunkte für nutzbare kapillarelektrophoretische Methoden zu erhalten. Dabei standen vor allem Methoden im Blickpunkt mit Hilfe derer sich die in dieser Arbeit zur Verfolgung der Enzymreaktionen von MatB, MatA und CitZ relevanten Analyten AMP, ADP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA voneinander schnell und mit geringem applikativem und messtechnischem Aufwand trennen lassen. Die Messungen sollten automatisierbar sein, die Methode eine hohe Trennleistung aufweisen, Probenvolumina minimal und eine möglichst geringe Probenvorbereitung notwendig sein. Eine solche kapillarelektrophoretische Methode wurde von Soga et al. im Jahr 2007 publiziert ⁶¹. Dabei wurden eine Vielzahl von Nukleotiden mit Hilfe von Massenspektrometrie gekoppelter Kapillarzonenelektrophorese getrennt. Als Hintergrundelektrolyt wurde 50 mM Ammoniumacetat-Puffer bei pH 7,5 verwendet. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass eine Equilibrierung einer unbelegten Quarzglas-Kapillare mit einem Konditionierungspuffer bestehend aus 25 mM Ammoniumacetat-Puffer und 75 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) einen positiven Effekt auf die Trennung und Reproduzierbarkeit der Messung hat. Die Autoren begründen dies damit, dass die freien Silanol-Gruppen durch die Konditionierung mit Phosphat-Ionen maskiert werden. Weitere Publikationen zeigten ebenso, dass Phosphat-Puffer besonders für die Trennung von Nukleotiden geeignet sind ⁶²⁻⁶⁴. Da sich allerdings keine Vorarbeiten hinsichtlich einer Messmethode finden ließen, die alle Kriterien erfüllte, wurde ausgehend von der Veröffentlichung von Soga et al. ⁶¹ eine Methodenentwicklung durchgeführt. Die verwendeten Startbedingungen werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2: Startbedingungen der Methodenentwicklung.

Parameter	Startbedingungen	Soga et al. Methode ⁶¹
Konditionierung	6 min (20 psi)	6 min (unbekannter Druck)
	50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 7,5	50 mM NH ₄ CH ₃ COO-Puffer pH 7,5
Hintergrundelektrolyt	50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 7,5	50 mM NH ₄ (CH ₃ COO)-Puffer pH 7,5
Trennungsspannung	30 kV	30 kV
Kapillartemperatur	20 °C	20 °C
Kapillardruck	0,7 psi	50 mbar
Injektionszeit (Probe)	10 s	30 s
Injektionsdruck (Probe)	0,3 psi	50 mbar
Injektionszeit (Wasser)	5 s	k.A.
Injektionsdruck (Wasser)	0,5 psi	k.A.
Detektor	PDA-Detektor	MS
Kapillare	Unbelegte Quarzglas Kapillare	Unbelegte Quarzglas Kapillare
	60 cm (50 cm effektiv)	100 cm (100 cm effektiv)
	75 µm ID x 360 µm OD	50 µm ID x 360 µm OD

Einige Methodenbestandteile, wie die Konditionierung, die Pufferkonzentration, der pH-Wert des Puffers, die Trennungsspannung, die Kapillartemperatur und der Kapillardruck wurden aus der Publikation als Startbedingungen für eine weitere Methodenentwicklung übernommen. Allerdings wurde der verwendete Ammoniumacetat-Puffer durch einen Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer ersetzt. Zum einen weisen Ammoniumacetat-Puffer im Bereich pH 6 bis 8 keine oder geringe Pufferkapazitäten auf^{65,66}, wodurch keine konstanten Trennbedingungen vorliegen (siehe auch Kapitel 2.1.7 *Puffersysteme*). Dies führt möglicherweise auch dazu, dass der pH-Wert eines Ammoniumacetat-Puffers über den Zeitraum längerer Messreihen an der Raumluft nicht stabil ist und keine pH-Konstanz vorliegt. Zum anderen wird die Detektion aufgrund des geringeren gerätetechnischen Aufwands mit einem PDA-Detektor anstelle eines MS erfolgen, wodurch die Beschränkung auf leichtflüchtige Puffer für MS basierte Anwendungen entfällt. Daher wurde ein 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gewählt, der in einem pH-Bereich von 6,2 bis 8,2 einsetzbar ist³⁴. Zudem wurde eine Kapillare mit einem größeren Innendurchmesser gewählt, um das Detektionslimit aufgrund der höheren Schichtdicke bei der UV/Vis-Detektion herabzusetzen (siehe Kapitel 2.1.10 *Detektion*)³⁴. Injektionszeit und Injektionsdruck wurden entsprechend des bei dem gewählten größeren Kapillarinne Durchmesser zu erwartenden höheren Injektionsvolumen verringert und zur Ausnutzung eines *sample stacking* Effektes eine Injektion von Reinstwasser nach der Probe (siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion*) etabliert.

Für die anschließende Methodenentwicklung wurde ein Methoden-Standard (Tabelle 3), bestehend aus den im UV/Vis-Bereich detektierbaren Analyten AMP, ADP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA angesetzt. Darüber hinaus wurde Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als interner Standard hinzugegeben, weil es eine strukturelle Ähnlichkeit zu den hier zu untersuchenden Nukleotiden und Coenzymen aufweist, sich spektral im UV/Vis-Bereich von den Analyten unterscheiden (siehe Kapitel 3.2.1 *Spezifität und Selektivität*) und mittels CZE von den Analyten trennen lässt. Darüber hinaus ist FAD stabil und nicht Bestandteil der Probe, wodurch es den Ansprüchen an einen internen Standard gerecht wird^{67,68}.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Methoden-Standards.

Substanz	Konzentration [mM]
AMP	0,5
ADP	0,5
ATP	0,5
CoA	0,5
MalCoA	0,5
AcCoA	0,5
FAD	0,5

3.1.2 Variation des Kapillardrucks

Mit Hilfe des angesetzten Methoden-Standards sollte zunächst der Einfluss des Kapillardrucks untersucht werden, da dieser in der Regel den größten Einflussfaktor hinsichtlich der Trenndauer darstellt. Der durch den Druck in der Kapillare induzierte Fluss ist um ein Vielfaches größer als der durch den EOF induzierte Fluss^{69–71}. Somit sind Flussgeschwindigkeit und Flussrichtung im Wesentlichen bestimmt durch den angelegten Druck. Je größer der angelegte Druck, desto größer der zu erwartende Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit und damit der Analysenzeit. Zur Variation des Drucks werden die Startbedingungen zur Methodenentwicklung (Tabelle 2) verwendet und ein variierender einseitiger Druck von 0,0 psi, 0,3 psi und 0,7 psi in Richtung des Detektors angelegt. Die resultierenden CZE-UV/Vis Elektropherogramme sind in Abbildung 2 dargestellt.

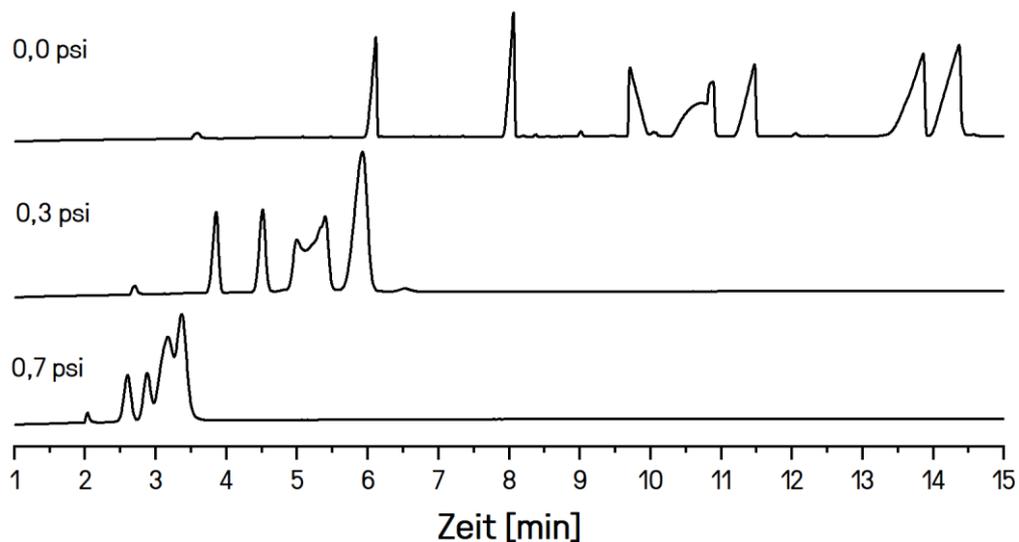


Abbildung 2: Variation des Kapillardrucks. Variierender einseitiger Druck von 0,0 psi, 0,3 psi und 0,7 psi in Richtung des Detektors. Für weitere Methodeinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2).

Das Elektropherogramm mit 0,0 psi angelegtem Druck in Richtung des Detektors lässt eine Basislinientrennung von zehn Peaks in einer Analysenzeit von ca. 14,5 min erkennen. Die größten sieben Peaks entsprechen der Anzahl der Analyten im Methoden-Standard, somit lässt sich von einer Trennung aller Analyten ausgehen. Allerdings sind die Peaks teilweise deformiert und weisen asymmetrische Peakformen auf, die auf Elektrodiseperfions-Effekte zurückzuführen sind^{34,55,72}. Im Falle des ersten kleinen Peaks handelt es sich um den EOF-Peak, welcher sich durch die Messung einer Leerprobe (Wasser) nachweisen ließ. Die zwei kleinen zusätzlichen Peaks sind unbekannter Herkunft. Dabei handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen in der Probe oder um Systempeaks⁷³. Wird ein

zusätzlicher Druck von 0,3 psi und 0,7 psi in Richtung des Detektors angelegt, verringern sich die Analysenzeiten auf unter 6 min. In beiden Fällen verringert sich die Anzahl der Peaks von zuvor 7 auf 5 bzw. 4 Peaks. An dieser Stelle ist von einer unzureichenden Trennung der Analyten auszugehen. Der durch den Druck in der Kapillare induzierte Fluss spült die Analyten in Richtung Detektor. Die Zeit, die die negativ geladenen Analyten haben, um gegen diesen Fluss in Richtung Anode (Injektionsseite) zu migrieren wird verkürzt. Insgesamt reicht diese Zeit nicht mehr aus, um die Analyten voneinander zu trennen. Das Anlegen eines Drucks an die Kapillare ist für die Trennung in diesem Fall nicht hilfreich, daher werden die Startbedingungen der Methodenentwicklung hinsichtlich des Kapillardrucks zu einer drucklosen Trennung angepasst.

3.1.3 Variation der Kapillarspannung

Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf die Trennung nimmt, ist die Trennungsspannung. Mit der Trennungsspannung variiert auch die elektrische Feldstärke, die auf die Analyten wirkt³⁴. Mit steigender Trennungsspannung steigt die elektrische Feldstärke und damit die Migrationsgeschwindigkeit der geladenen Analyten aber auch die Flussgeschwindigkeit des EOFs. Insgesamt werden dadurch die Analysenzeit und die Güte der Trennung beeinflusst. Zur Abschätzung dieses Einflusses werden Trennungsspannungen von 20 kV, 25 kV und 30 kV verwendet. Die resultierenden CZE-UV/Vis Elektropherogramme werden nachfolgend dargestellt (Abbildung 3).

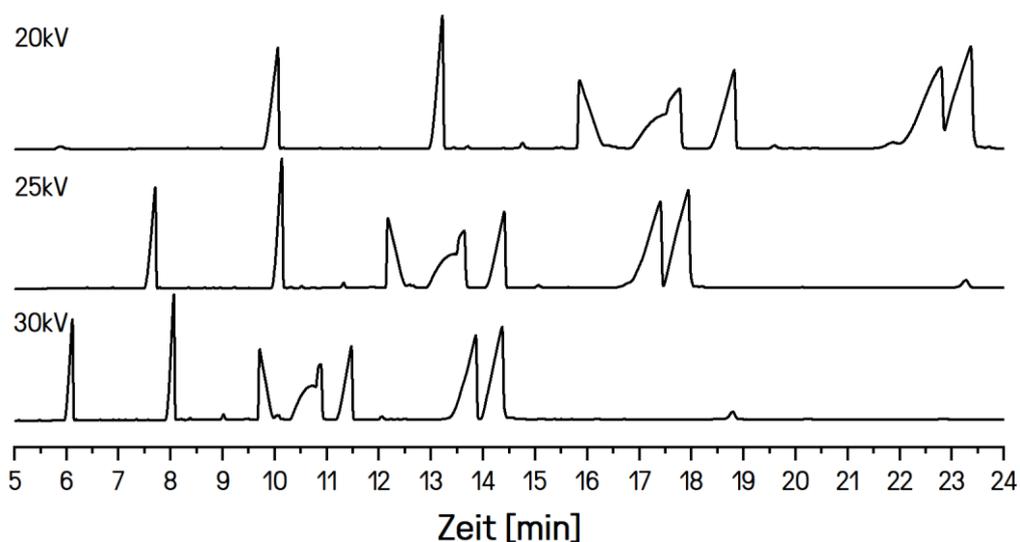


Abbildung 3: Variation der Kapillarspannung. Variierende Kapillarspannung von 20 kV, 25 kV und 30 kV. Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck.

Anhand der Elektropherogramme lässt sich erkennen, dass mit steigender Kapillarspannung die Migrationszeiten der Analyten und damit die notwendigen Analysenzeiten sinken. Die sieben Analyt Peaks sind bei allen Trennspannungen nahezu vollständig getrennt, d.h. die Selektivität wird scheinbar nur verhältnismäßig wenig durch die Variation beeinflusst. Die Peakformen sind ebenfalls miteinander vergleichbar, allerdings werden die Peaks mit steigender Migrationszeit breiter. Entsprechend muss der EOF maßgeblich durch die Variation der Trennspannung beeinflusst sein. Das elektrische Feld wirkt, wie auch auf die geladenen Analyten, auf die positiv geladenen Ionen des Hintergrundelektrolyten, die letztlich verantwortlich für das Auftreten des EOFs sind (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*). Da der EOF in diesem Setup einen in Richtung des Detektors gerichteten Fluss darstellt, der mit steigender Kapillarspannung zunimmt, verringern sich die Migrationszeiten der Analyten³⁴. Insgesamt stellt die Analyse mit einer Trennspannung von 30 kV den besten Kompromiss aus benötigter Analysenzeit und Selektivität dar. Entsprechend wurde für alle weiteren Messungen eine Kapillarspannung von 30 kV verwendet.

3.1.4 Variation der Kapillartemperatur

Abgesehen von den Einflussparametern Kapillardruck und Kapillarspannung, stellt die Kapillartemperatur eine weitere wichtige Kenngröße dar. Die Kapillartemperatur beeinflusst grundsätzlich die Leitfähigkeit des Hintergrundelektrolyten und dessen Viskosität, wodurch Selektivität und EOF modifiziert werden können³⁴. Entsprechend wurde der Einfluss der Kapillartemperatur variiert und die erhaltenen Elektropherogramme nachfolgenden dargestellt (Abbildung 4).

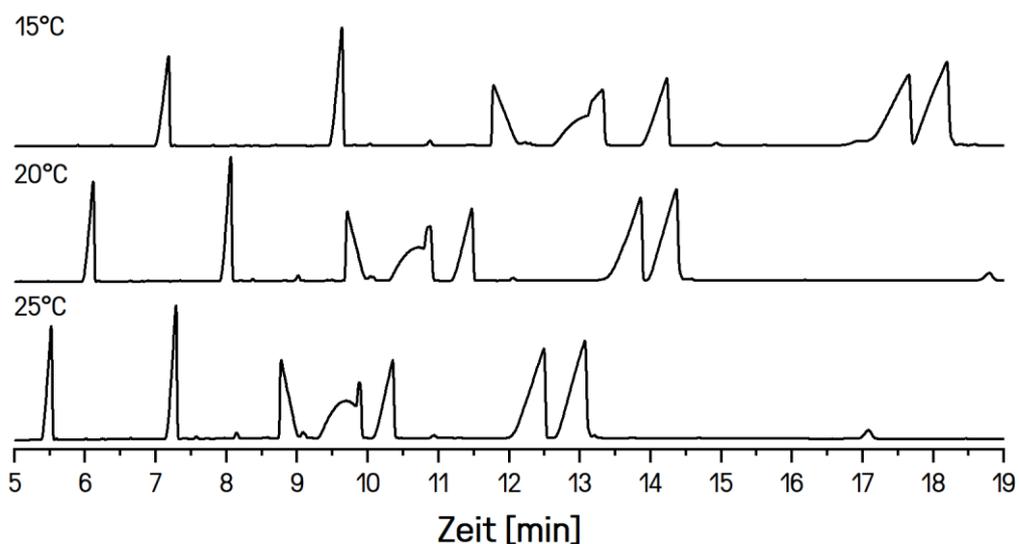


Abbildung 4: Variation der Kapillartemperatur. Variierende Kapillartemperatur von 15 °C, 20 °C und 25 °C. Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck.

Anhand der Elektropherogramme lässt sich erkennen, dass mit steigender Kapillartemperatur die Migrationszeiten der Analyten und damit die Analysenzeiten sinken. Die sieben Analyt Peaks sind bei allen verwendeten Kapillartemperaturen vollständig getrennt, d.h. die Selektivität wird scheinbar nur verhältnismäßig wenig durch die Variation beeinflusst. Die Peak Formen sind ebenfalls miteinander vergleichbar, allerdings werden die Peaks mit steigender Migrationszeit breiter. Diese Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denen bei der Variation der Trennungsspannung. Entsprechend muss hier der EOF maßgeblich durch die Variation der Kapillartemperatur beeinflusst sein. Eine höhere Temperatur und eine damit einhergehende Verringerung der Viskosität führt zu einer höheren Fließgeschwindigkeit des EOFs⁷⁴. Dies kann dazu führen, dass die Migrationszeit bei einer Temperaturänderung von 1 °C um ca. 2-3 % schwankt⁷⁴. Da der EOF in diesem Setup einen Fluss in Richtung des Detektors darstellt und die Analyten darin mitgetragen werden, verringert sich die Migrationszeit der Analyten mit steigender Temperatur. Die Messungen bei einer Kapillartemperatur von 20 °C und 25 °C sind hinsichtlich Selektivität und Analysenzeit ähnlich, lediglich die Messung bei einer Kapillartemperatur von 15 °C ist aufgrund der vergleichsweise hohen Analysenzeit und breiteren Peaks weniger effizient. Für die nachfolgenden Messungen wurde eine Kapillartemperatur von 20 °C für Vergleichszwecke beibehalten.

3.1.5 Variation der Pufferkonzentration und des pH-Wertes

Die Konzentration des Hintergrundelektrolyten und dessen pH-Wert können vielfältigen Einfluss auf eine kapillarelektrophoretische Trennung haben. Sowohl der EOF, die Analyten als auch die Kapillaroberfläche werden durch den verwendeten BGE und dessen pH-Wert direkt beeinflusst³⁴. Entsprechend ist eine theoretische Abschätzung des Effektes einer Variation dieser Parameter schwierig. Allerdings ging aus verschiedenen Publikationen hervor, dass eine Trennung der vorliegenden Analyten im leicht basischen pH-Wert Bereich die besten Ergebnisse erzielt^{41,49,63,64,75}. Grund dafür sind vor allem die leicht deprotonierbaren Phosphatgruppen der Nukleotide, die in Kombination mit den partiellen Ladungen der Purine und Pyrimidine eine gute Selektierungsmöglichkeit im basischen pH-Wert Bereich bieten^{63,75}. Daher wurden sowohl die Konzentration des BGE als auch der pH-Wert im neutralen bis schwach alkalischen Milieu unter Beachtung des nutzbaren Pufferbereichs (pH 6,2 bis pH 8,2) systematisch variiert. Für jede dieser Variationen wurde vor der Messung eine Konditionierung der Kapillare (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*) durchgeführt. Die erhaltenen Elektropherogramme bei einer Pufferkonzentration von 20 mM und pH-Werten von 7,0, 7,5 und 8,0 werden nachfolgend dargestellt (Abbildung 5).

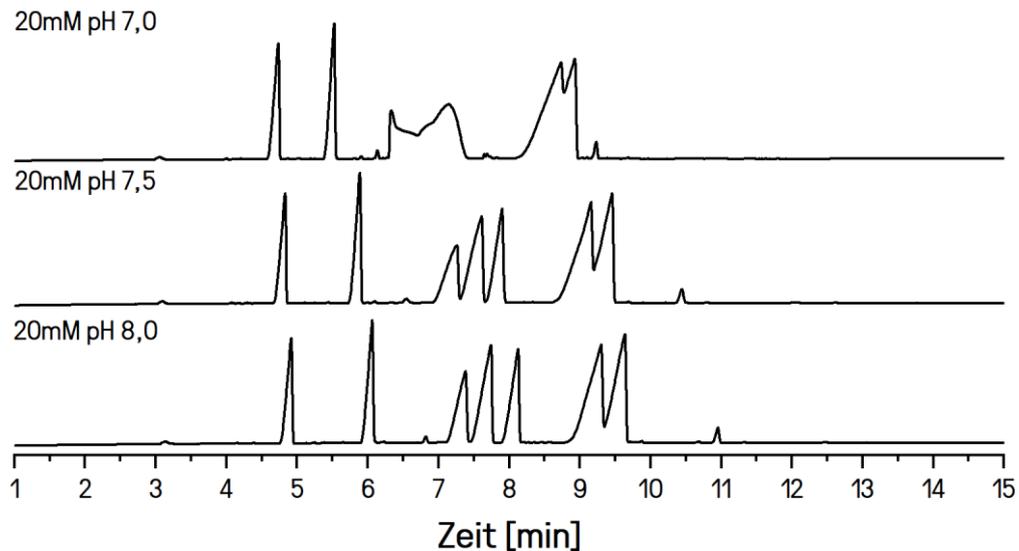


Abbildung 5: Variation der Pufferkonzentration und des pH-Werts. Variierender pH-Wert von 7,0, 7,5 und 8,0 bei einer Pufferkonzentration von 20 mM Na_2HPO_4 . Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck.

Bei einer Pufferkonzentration von 20 mM und pH-Werten im Bereich von 7,0 bis 8,0 werden Analysenzeiten von weniger als 10 min beobachtet. Allerdings wird bei keiner dieser Variationen eine Basislinientrennung der sieben Analytpeaks erreicht. Bei einem pH-Wert von 7,0 lassen sich fünf Analytpeaks erkennen, die teilweise deformiert und nicht getrennt sind. Bei pH-Werten von 7,5 und 8,0 lassen sich hingegen sieben, vergleichsweise symmetrische Analytpeaks erkennen. Allerdings erfolgt bei den letzten beiden Peaks keine Basislinientrennung. Anhand der Elektropherogramme lässt sich grundsätzlich erkennen, dass die Analysenzeiten im Vergleich zu dem zuvor verwendeten 50 mM Hintergrundelektrolyten (pH 8,0) deutlich geringer sind. Durch die geringere Pufferkonzentration wird die Flussgeschwindigkeit des EOFs in Richtung des Detektors erhöht^{34,54}, wodurch theoretisch kleinere Migrationszeiten erreicht werden (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*). Zudem nimmt die Fließgeschwindigkeit des EOFs mit steigendem pH-Wert zu^{34,53} und würde zu verringerten Migrationszeiten führen (siehe auch Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*). Interessanterweise lässt sich an dieser Stelle ein gegenläufiges Verhalten der Migrationszeiten unter dem Einfluss eines steigenden pH-Wertes feststellen. Möglicherweise verschiebt sich das Protonierungsgleichgewicht der Analyten zugunsten einer höheren Mobilität. Da die Analyten entgegen des EOFs migrieren, ergäben sich dadurch höhere Migrationszeiten. Danach müsste der Einfluss der pH-Wert Änderung auf die Analyten größer sein als der Einfluss der pH-Wert Änderung auf den EOF, da in Summe die Migrationszeiten steigen. Darüber hinaus würde ein verändertes Protonierungsgleichgewicht zu einer Änderung der Selektivität führen^{63,75}. Zum anderen werden die freien Silanol-Gruppen an der Oberfläche der Kapillarwand modifiziert, wodurch die Interaktion von Analyten und Kapillarwand zu

irregulären Peakformen führen kann³⁴. Dies kann entsprechend einen möglichen Grund für die deformierten Peaks bei einem pH-Wert von 7,0 darstellen. Zudem können ebenfalls schwierig abzuschätzende Elektrodisepersions-Effekte eine Ursache für die deformierten Peaks sein^{34,55,72}. Insgesamt hat die pH-Wert Änderung hin zu basischeren pH-Werten bei einer Konzentration des BGE von 20 mM einen positiven Einfluss auf die Trennung der Analyten. Eine Basislinientrennung konnte jedoch nicht erreicht werden.

Mit den bisherigen Variationen von Pufferkonzentration und pH-Wert konnte keine Basislinientrennung der sieben Analyt Peaks erzielt werden, daher wurden weitere dieser Variationen durchgeführt. Dazu wurde die Pufferkonzentration von 20 mM auf 35 mM erhöht und die pH-Werte 7,0, 7,5 und 8,0 eingestellt. Die erhaltenen Elektropherogramme bei Verwendung einer Pufferkonzentration von 35 mM und pH-Werten von 7,0, 7,5 und 8,0 werden nachfolgend dargestellt (Abbildung 6).

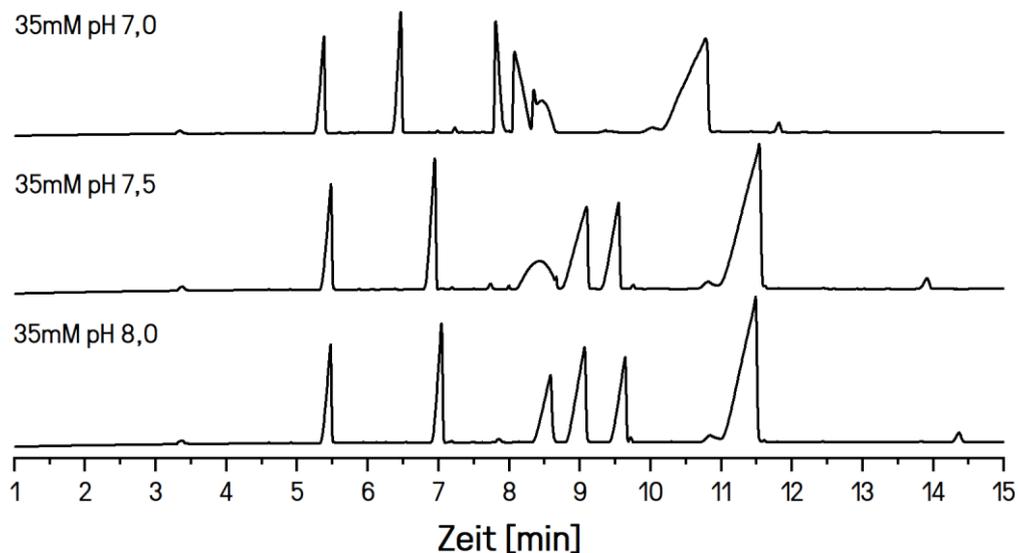


Abbildung 6: Variation der Pufferkonzentration und des pH-Werts. Variierender pH-Wert von 7,0, 7,5 und 8,0 bei einer Pufferkonzentration von 35 mM Na_2HPO_4 . Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck.

Bei einer Pufferkonzentration von 35 mM und pH-Werten im Bereich von 7,0 bis 8,0 werden Analysenzeiten von weniger als 12 min beobachtet. Allerdings wird bei keiner dieser Variationen eine Basislinientrennung der sieben Analytpeaks erreicht. Bei pH-Werten von 7,0 und 7,5 lassen sich sechs getrennte Analytpeaks erkennen, die teilweise deformiert, asymmetrisch und nicht getrennt sind. Bei einem pH-Wert von 8,0 lassen sich ebenfalls sechs Analytpeaks erkennen, die eine deutlich symmetrischere Peakform aufweisen. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse und aufgrund

der vergleichsweise überproportional großen Peakfläche des letzten Peaks lässt sich vermuten, dass es sich bei dem letzten Peak um eine Ko-Migration zweier Analyten handelt. Dies würde bedeuten, dass die Erhöhung der Pufferkonzentration von 20 mM auf 35 mM bei gleichem pH-Wert die Selektivität bei der Trennung der letzten beiden Analytpeaks verringert. Alle weiteren Beobachtungen und Ergebnisse entsprechen den bereits zuvor getätigten Aussagen zu den vorherigen Trennungen.

Mit den bisherigen Variationen von Pufferkonzentration und pH-Wert konnte keine Basislinientrennung der sieben Analytpeaks erzielt werden, daher wurden weitere dieser Variationen durchgeführt. Dazu wurde die Pufferkonzentration von 35 mM auf 50 mM erhöht und die pH-Werte 7,0, 7,5 und 8,0 eingestellt. Die erhaltenen Elektropherogramme bei Verwendung einer Pufferkonzentration von 50 mM und pH-Werten von 7,0, 7,5 und 8,0 werden nachfolgend dargestellt (Abbildung 7).

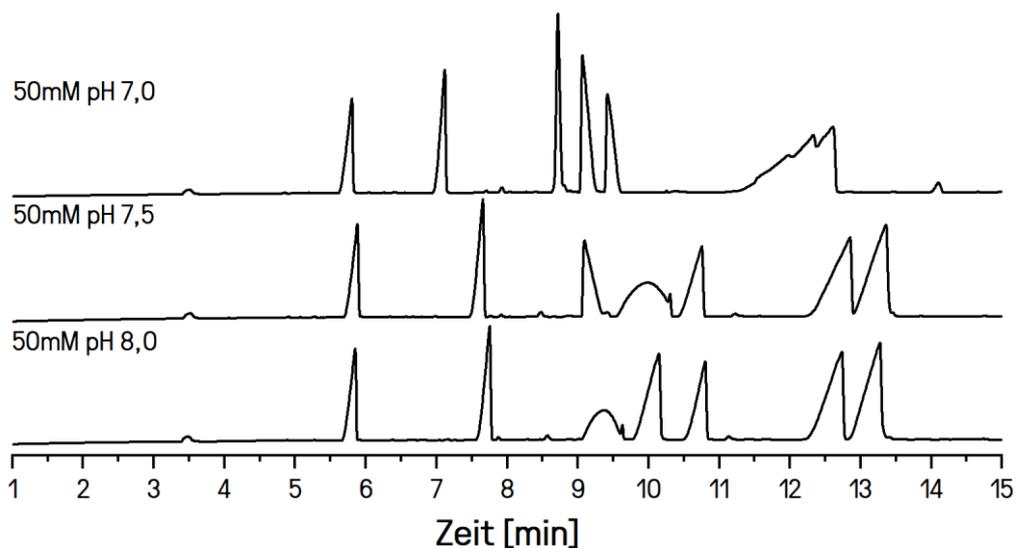


Abbildung 7: Variation der Pufferkonzentration und des pH-Werts. Variierender pH-Wert von 7,0, 7,5 und 8,0 bei einer Pufferkonzentration von 50 mM Na_2HPO_4 . Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck.

Bei einer Pufferkonzentration von 50 mM und pH-Werten im Bereich von 7,0 bis 8,0 werden Analysenzeiten von weniger als 14 min beobachtet. Bei einem pH-Wert von 7,0 lassen sich sechs sowohl symmetrische als auch asymmetrische Analytpeaks erkennen, die teilweise nicht getrennt sind. Bei pH-Werten von 7,5 und 8,0 lassen sich hingegen sieben sowohl symmetrische als auch asymmetrische Analytpeaks erkennen. Allerdings konnte mit Hilfe dieser Pufferkonzentration- und pH-Variationen eine Basislinientrennung aller sieben Analytpeaks erzielt werden. Bei genauerer Betrachtung der Elektropherogramme lässt sich feststellen, dass die Peaks bei einem pH-Wert von 8,0

am besten voneinander getrennt sind. Alle weiteren Beobachtungen und Ergebnisse entsprechen den bereits zuvor getätigten Aussagen zu den vorherigen Trennungen.

Werden alle Beobachtungen und Ergebnisse zur Variation der Pufferkonzentration und dessen pH-Wert in Betracht gezogen, lässt sich erkennen, dass eine Erhöhung der Konzentration des BGE zu einer höheren Migrationszeit der Analyten führt. Grund dafür ist die Verringerung der Flussgeschwindigkeit des EOFs^{34,54}. Zudem nimmt die Fließgeschwindigkeit des EOFs mit steigendem pH-Wert zu^{34,53}. Darüber hinaus führt eine Erhöhung des pH-Werts bei konstanter Pufferkonzentration zu einer besseren Selektivität bei der Trennung der Analyten. Dieser Effekt der Variation lässt sich vermutlich durch verschiedene, gleichzeitig beeinflusste Größen, wie das Protonierungsgleichgewicht der Analyten, der Beeinflussung der Kapillaroberfläche und der Elektrodispersion begründen. Die beste Trennung hinsichtlich Selektivität wurde bei einer Pufferkonzentration von 50 mM und einem pH-Wert von 8,0 erzielt. Zwar ist die benötigte Analysenzeit zur Trennung der sieben Analyten im Vergleich zu den anderen Trennbedingungen am längsten, jedoch wird eine vollständige Basislinientrennung erreicht. Zudem bietet die höhere Konzentration des Puffers eine höhere Pufferkapazität und damit bessere pH-Stabilität bei längeren Analysenzeiten oder bei mehrfacher Verwendung von Puffervials.

Die Startbedingungen zur Methodenentwicklung wurden hinsichtlich der Verwendung eines 50 mM BGE (pH 8,0) anstelle eines 50 mM BGE (pH 7,5) angepasst. Darüber hinaus lassen sich die Peakformen möglicherweise durch den Einsatz einer Kapillare geringeren Innendurchmessers, Optimierung der Injektionsparameter oder der Konditionierungsbedingungen verbessern. Diese Aspekte werden in den folgenden Kapiteln näher untersucht.

3.1.6 Empirische Methodenverbesserungen

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich neben den bereits beschriebenen Methodenoptimierungen weitere empirische Methodenverbesserungen die aufgrund diverser Analyseproblematiken auftraten. Diese Analyseproblematiken werden im Folgenden aufgearbeitet und dienen zur Vervollständigung der Methodenentwicklung.

3.1.6.1 Wechsel des internen Standards

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde zunächst FAD als interner Standard gewählt. FAD weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu den hier zu untersuchenden Nukleotiden und Coenzymen auf, unterscheidet sich spektral im UV/Vis-Bereich von den Analyten, lässt sich mittels CZE von den Analyten trennen, ist stabil und nicht Bestandteil der zu untersuchenden Proben. Eine weitere Eigenschaft, der ein interner Standard gerecht werden muss ist, dass dieser keine Interaktion mit Analyten aus der Probe eingeht. Bei der Validierung des internen Standards wurde jedoch festgestellt, dass es in einer Reinprobe von CoA zu einer zeitabhängigen Bildung eines weiteren Peaks in Gegenwart

von FAD kam. Da dem internen Standard in dieser Arbeit eine tragende Rolle zukommt (siehe 3.2.3 Präzision), wurde der Einfluss von FAD auf CoA genauer untersucht. Dazu wurden vier 1 mM CoA-Standards in Gelfiltrationspuffer (GEFI) angesetzt (siehe Kapitel 6.6 *Puffersysteme*), wobei zwei der vier CoA-Standards einer Inkubationszeit von 0 Tagen (Abbildung 8 A) bzw. einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT (Abbildung 8 B) ausgesetzt wurden. Die anderen zwei CoA-Standards wurden mit FAD versetzt und einer Inkubationszeit von 0 Tagen (Abbildung 8 C) bzw. einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT (Abbildung 8 D) ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Messung mithilfe der entwickelten CZE-UV/Vis Methode. Die erhaltenen CZE-UV/Vis Elektropherogramme sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (Abbildung 8 A-D).

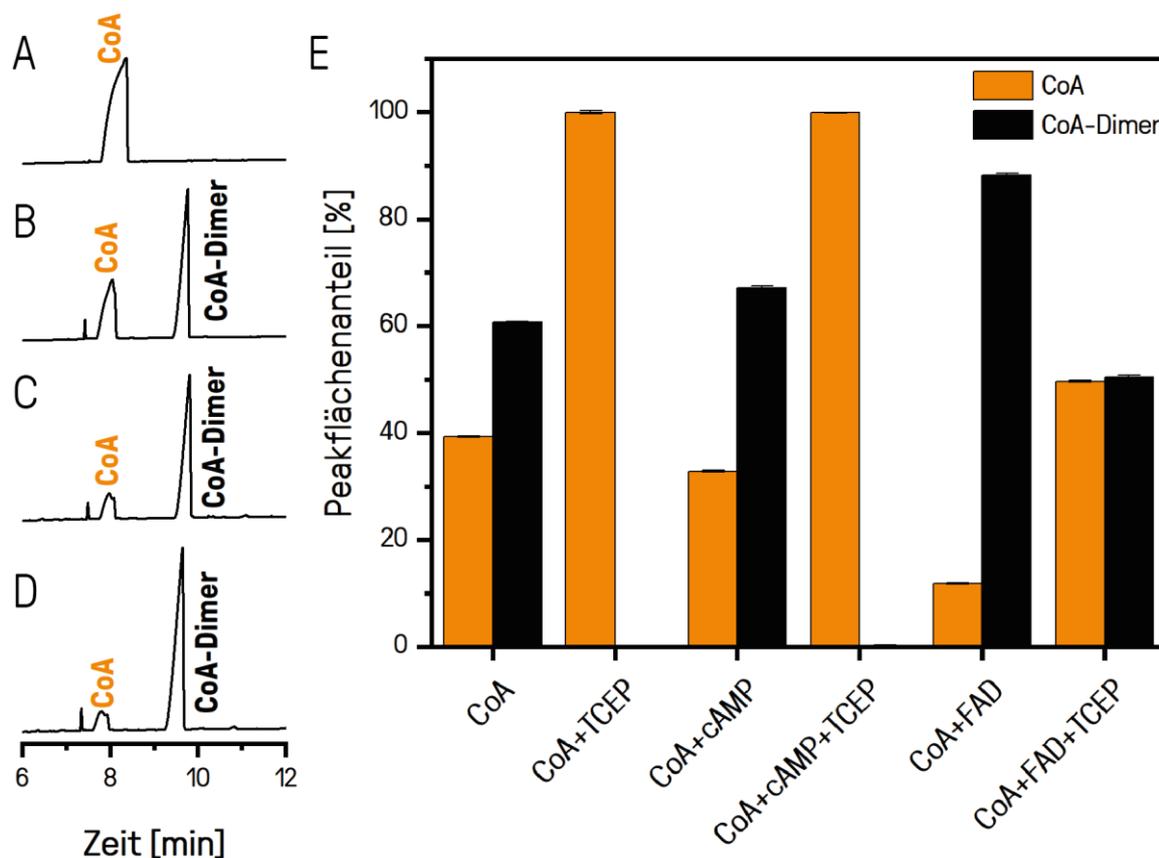


Abbildung 8: Untersuchungen zum internen Standard. A: CZE-UV/Vis Elektropherogramm von 1 mM CoA in GEFI nach einer Inkubationszeit von 0 Tagen. B: CZE-UV/Vis Elektropherogramm von 1 mM CoA in GEFI nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT. C: CZE-UV/Vis Elektropherogramm von 1 mM CoA in GEFI und in Gegenwart von FAD nach einer Inkubationszeit von 0 Tagen. D: CZE-UV/Vis Elektropherogramm von 1 mM CoA in GEFI und in Gegenwart von FAD nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen. E: Darstellung der Peakflächenanteile des Analyten bezogen auf die summierte Peakfläche von CoA und CoA-Dimer. 1 mM CoA ohne TCEP (CoA) und mit 1 mM TCEP (CoA+TCEP) nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen. 1 mM CoA in Gegenwart von 0,5 mM cAMP ohne TCEP (CoA+cAMP) und mit 1 mM TCEP (CoA+cAMP+TCEP) nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen. 1 mM CoA in Gegenwart von 0,5 mM FAD ohne TCEP (CoA+FAD) und mit 1 mM TCEP (CoA+FAD+TCEP) nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen. Alle Messungen wurden mit optimierten Startbedingungen zur Methodenentwicklung gemessen. Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck. Es wurde ein 50 mM Na_2HPO_4 Puffer (pH 8,0) verwendet.

Das CZE-UV/Vis Elektropherogramm zur Messung von CoA in GEFI nach einer Inkubationszeit von 0 Tagen (A) zeigt lediglich einen Peak, bei dem es sich um CoA handelt. Frisch angesetztes CoA in GEFI zeigt entsprechend keine messbare Veränderung seiner Zusammensetzung. Das CZE-UV/Vis Elektropherogramm zur Messung von CoA in GEFI nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen (B) hingegen zeigt zwei Peaks. Entsprechend muss sich die Zusammensetzung von CoA in GEFI über den Inkubationszeitraum hinweg verändert haben. Eine Literaturrecherche dazu ergab, dass zwei CoAs über deren freie Thiol-Gruppe über eine Disulfid-Verbindung zu einem CoA-Dimer oxidiert werden⁷⁶. Bei pH-Werten von größer als 8,0 wird die Stabilität von CoA durch erhöhten oxidativen Stress verringert⁷⁷. Bei dem zweiten Peak im Elektropherogramm handelt sich daher vermutlich um das CoA-Dimer (CoA-S-S-CoA). Das CoA wird scheinbar auch in Abwesenheit von FAD dimerisiert. Werden die CZE-UV/Vis Elektropherogramme von CoA in GEFI in Gegenwart von FAD nach einer Inkubationszeit von 0 bzw. 6 Tagen (C und D) betrachtet, lassen sich ebenfalls zwei Peaks erkennen. Bei diesen handelt es sich, wie zuvor, um CoA und CoA-Dimer. Der CoA-Dimer Peak ist in Gegenwart von FAD bei beiden Inkubationszeiten deutlich größer als der CoA Peak. Der Anteil vom CoA-Dimer Peak an der gesamten Peakfläche beider Analyten ist in Gegenwart von FAD bei beiden Inkubationszeiten deutlich größer als in Abwesenheit von FAD. Es lässt sich also sagen, dass die Oxidation von CoA zum CoA-Dimer in Gegenwart von FAD deutlich schneller abläuft, da nach beiden Inkubationszeiten größere Mengen an CoA-Dimer vorliegen als in Abwesenheit von FAD. Besonders deutlich zeigt dies der Vergleich der beiden Elektropherogramme zu den frisch angesetzten Proben nach Inkubationszeiten von 0 Tagen (A und C). In Abwesenheit von FAD lässt sich kein CoA-Dimer erkennen, in Gegenwart von FAD hingegen ist bereits ein Großteil des CoAs nach kurzer Zeit dimerisiert worden.

Nach dieser Erkenntnis wurden zwei Lösungsansätze zu dieser Problematik verfolgt. Es ist bekannt, dass die Oxidation von CoA durch Disulfid-Reduktionsmittel, wie 1,4-Dithiothreitol (DTT) und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), verhindert und rückgängig gemacht werden kann⁷⁶. Daher wurde zum einen versucht die Oxidation von CoA durch FAD durch Zugabe von TCEP zu verhindern. Zum anderen wurde nach einem alternativen internen Standard gesucht. Dabei stellte sich Adenosin-3.5-cyclophosphat (cAMP) als geeignet heraus, da es strukturell ähnlich zu den hier zu untersuchenden Nukleotiden und Coenzymen ist und sich mittels CZE von den Analyten trennen lässt⁶³. Beide Lösungsansätze, der Einsatz von TCEP als Reduktionsmittel und die Verwendung von cAMP als alternativen internen Standard, wurden in einem weiteren Experiment untersucht.

Dazu wurden sechs 1 mM CoA-Standards angesetzt, wobei zwei Standards keinen internen Standard, zwei Standards FAD als internen Standard und zwei CoA Standards cAMP als internen Standard enthielten. Um den Einfluss von TCEP zu bestimmen, wurde jeweils einer dieser Duplikate mit 1 mM TCEP versetzt. Alle Ansätze wurden einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT ausgesetzt, anschließend

in Form eines messtechnischen Triplikats mit CZE-UV/Vis analysiert und die Peakflächenanteile miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 E zusammengefasst. Wird CoA einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT ausgesetzt liegen etwa 40 % CoA und 60 % CoA-Dimer vor. Die gleiche Probe weist in Gegenwart von TCEP 100 % CoA und 0 % CoA-Dimer auf. Wird eine Probe mit CoA und cAMP einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT ausgesetzt liegen etwa 33 % CoA und 67 % CoA-Dimer, in Gegenwart von TCEP in der gleichen Probe 100 % CoA und 0 % CoA-Dimer vor. Wird einer CoA Probe FAD hinzugefügt und einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei RT ausgesetzt weist die Probe einen Anteil an CoA von 12 % und einen Anteil an CoA-Dimer von 88 % auf. Bei Anwesenheit von TCEP in der gleichen Probe werden gleiche Anteile an CoA und CoA-Dimer von jeweils 50 % bestimmt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ziehen. CoA wird während der Inkubationszeit zu CoA-Dimer umgewandelt. Diese Umsetzung wird durch Zugabe von cAMP geringfügig, durch FAD jedoch stark erhöht. Ob der beobachtete, geringfügig höhere Anteil an CoA-Dimer in Gegenwart von cAMP tatsächlich durch die Anwesenheit von cAMP herrührt und ob dies im statistischen Rahmen signifikant ist, lässt sich an dieser Stelle nicht eindeutig klären. Dazu hätten neben den messtechnischen Triplikaten zusätzlich Ansatz-Replikate durchgeführt werden müssen. Eine Literaturrecherche dazu ergab keine weiteren Hinweise. Allerdings lässt sich festhalten, dass der Einfluss von FAD auf die Dimerisierung von CoA aufgrund dessen Redox-Aktivität erwiesen ist und die bisherigen Ergebnisse bestätigt. Verschiedene Publikationen bestätigen, dass FAD als Cofaktor in verschiedensten Redox-Reaktionen fungieren kann⁷⁸⁻⁸¹. Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass die Zugabe von TCEP zu den Proben von CoA in An- und Abwesenheit von cAMP eine vollständige Reduktion des CoA-Dimers zu CoA ermöglicht. Somit wird die Bildung des CoA-Dimers durch TCEP verhindert bzw. rückgängig gemacht⁷⁶. Die Zugabe von TCEP in eine mit FAD versetzte CoA Probe ermöglicht hingegen keine vollständige Umsetzung des CoA-Dimers zu CoA. Möglicherweise würde eine Erhöhung der TCEP Konzentration ebenfalls eine vollständige Umsetzung des CoA-Dimers zu CoA trotz der Anwesenheit des FADs ermöglichen. Allerdings zeigt sich hier bereits, dass FAD als Oxidationsmittel auf das CoA wirkt und cAMP insgesamt betrachtet die bessere Alternative darstellt. Es ist den zu analysierenden Analyten strukturell ähnlicher als FAD, ist ebenfalls mittels CZE von den Analyten trennbar und weist eine deutlich geringere oder möglicherweise keine oxidative Eigenschaft auf. Daher wurde für alle weiteren Messungen cAMP als neuer interner Standard verwendet. Darüber hinaus wird TCEP allen Proben hinzugegeben, um eine Oxidation von CoA zu CoA-Dimer zu verhindern oder ggf. rückgängig zu machen und somit definierte CoA-Konzentrationen zu gewährleisten.

3.1.6.2 Anpassung von Kapillardimensionen und Injektionsparametern

Weitere Anpassungen der bisherigen CZE-UV/Vis Methode ergaben sich durch die Überlegung, Enzymreaktionen mit einer möglichst hohen Konzentration starten und analysieren zu wollen. Höhere Edukt-Konzentrationen in Enzymreaktionen ermöglichen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten zu Beginn der Reaktion bei gleicher Enzymkonzentration^{78,82,83}. Zusätzlich können Reaktionen über längere Zeiträume verfolgt und signifikante Produktmengen auch in mehrstufigen Enzymkaskaden bei geringen Enzymmengen erzielt werden, ohne in messtechnisch schlecht auflösbaren Konzentrationsbereichen zu arbeiten. In der Folge wurden die Edukt-Konzentrationen auf 1 mM festgelegt, was einer Verdopplung der Konzentration der bisher gemessenen Methoden-Standards von 0,5 mM entsprach. Da mit steigender Konzentration eines Analyten unter gleichen CZE Analysenbedingungen eine höhere Peakfläche und Peakbreite und damit geringere Auflösung erwartet wurde³⁴ (siehe auch Kapitel 2.1.8 *Trennleistung*), die Trennung einiger Analyten aber bereits kritisch war, wurde eine Kapillare geringeren Innendurchmessers von 50 μm anstatt 75 μm verwendet. Grundsätzlich gilt in Bezug auf die Auflösung, dass je kleiner der verwendete Innendurchmesser der Kapillare ist, desto besser ist die erzielte Trennung^{84,85}. Ein weiterer Grund für die Verwendung einer Kapillare geringeren Innendurchmessers war bedingt durch die hohe BGE Konzentration (50 mM Na_2HPO_4 pH 8,0) gemessene hohe Strom von ca. 200 μA . Der Gerätehersteller AB Sciex hat auf Nachfrage empfohlen, Trennungen bei Strömen von weniger als 100 μA durchzuführen (persönliche Kommunikation). Letztendlich wurde der Strom durch Anpassungen der Analysenbedingungen auf ca. 70 μA reduziert. Ein weiterer Vorteil, der sich durch die Reduzierung des Kapillarinndurchmessers ergibt, ist die Möglichkeit kleinere Probenvolumina zu injizieren. Beim Einsatz einer Kapillare mit geringerem Innendurchmesser steigt der Staudruck in der Kapillare, somit sinkt das injizierte Probenvolumen bei gleichem Injektionsdruck. Gerätetechnisch ist die hydrodynamische Injektion durch den applizierbaren Druck vor allem in niedrigen Druckbereichen allerdings limitiert. Ein Nachteil, der sich durch die Verwendung einer Kapillare geringeren Innendurchmessers ergibt ist jedoch die geringere Nachweisgrenze aufgrund der geringeren Schichtdicke bei der spektrometrischen Detektion.

Aufgrund der veränderten Kapillargeometrie wurde die Trennung der Analyten erneut validiert. Darüber hinaus wurde eine dreistufige Enzymkaskade (MatB, MatA und CitZ) mit 1 mM Edukt-Mix (die genaue Zusammensetzung der Reaktions-Mixe wird in Kapitel 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen* erläutert) durchgeführt und diese als Realprobe zur Validierung der Trennung verwendet. Somit wurde gewährleistet, dass die Trennung auch bei der Analyse von Realproben aus Enzymreaktionen effizient ist, da die Probenmatrix und die Konzentrationen der Analyten in der Regel nicht identisch zu den verwendeten Methoden-Standards sind. Anschließend wurden die

Injektionsparameter bei der Analyse der Realprobe variiert, wobei Injektionsdrücke von 0,3 bis 0,5 psi und Injektionszeiten von 5 bis 10 s verwendet wurden. Zusätzlich wurden die Injektionsparameter für die Injektion von Reinstwasser (*Sample Stacking*, siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion*) variiert. Die erhaltenen CZE-UV/Vis Elektropherogramme und eine Vergrößerung des unzureichend getrennten Peak-Paars zu den jeweiligen Variationen der Injektionsparameter sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 9).

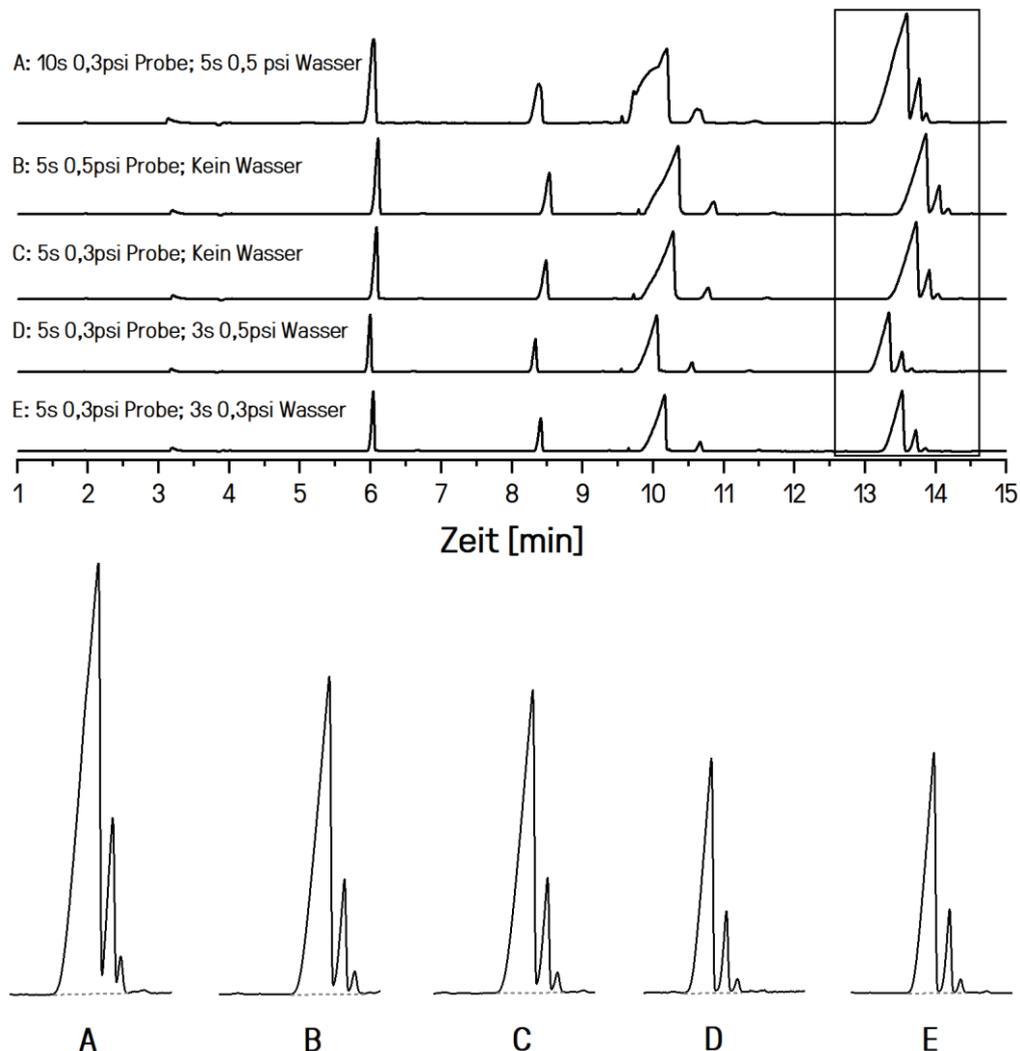


Abbildung 9: Anpassung der Injektionsparameter. Variierender Injektionsdruck bei der Proben- und Reinstwasser Injektion. Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck. Es wurde ein 50 mM Na_2HPO_4 Puffer (pH 8,0) verwendet. Der Kapillarinne Durchmesser beträgt 50 μm . Interner Standard: cAMP. Als Probe wurde ein Reaktions-Mix einer dreistufigen Enzymkaskade von MatB, MatA und CitZ verwendet (vgl. Kapitel 3.4.4).

Zunächst wurde die bisher optimierte CZE-UV/Vis Methode zur Validierung der Trennung einer Realprobe verwendet. Dabei wurde die Probe für 10 s bei 0,3 psi und Reinstwasser für 5 s bei 0,5 psi injiziert (A). Das erhaltene Elektropherogramm zeigt eine nahezu vollständige Basislinientrennung aller

Peaks und entspricht im Wesentlichen der bereits zuvor optimierten CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 3.1.1 bis 3.1.6). Bei genauerer Betrachtung lässt sich allerdings feststellen, dass die letzten beiden Peaks nicht mehr vollständig basisliniengetrennt sind. Als nächstes wurde das injizierte Probenvolumen reduziert. Dazu wurde die Injektionszeit von 10 s auf 5 s halbiert und Injektionsdrücke von 0,5 psi (B) und 0,3 psi (C) ohne anschließende Injektion von Reinstwasser getestet. Die erhaltenen Elektropherogramme sind vergleichbar miteinander, ebenso die Trennung der letzten beiden Peaks. Allerdings lässt sich im Vergleich zum ersten Elektropherogramm (A) erkennen, dass die Peaks kleiner und schmaler sind und die Trennung der letzten beiden Peaks besser ist. Da der Injektionsdruck von 0,3 psi und die Injektionszeit von 5 s bereits im Bereich des gerätetechnischen unteren Limits lag, wurde anschließend versucht durch eine zusätzliche Injektion von Reinstwasser (*Sample Stacking*, siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion*) die Trennung weiter zu verbessern. Dazu wurde die Probe für 5 s bei 0,3 psi und anschließend Reinstwasser für 3 s bei 0,5 psi (D) und 0,3 psi (E) injiziert. Die Peaks der erhaltenen Elektropherogramme sind erneut schmaler und schlanker und die Trennung der letzten beiden Peaks nochmals besser. Durch die beiden letzten Variationen der Injektionsparameter wurde eine vollständige Basislinientrennung erreicht. Zudem wurde die Peakform des dritten Peaks deutlich verbessert. Eine weitere Beobachtung, auf die im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird, ist die inkonstante Migrationszeit der Peaks bei der Analyse von Realproben (siehe Kapitel 3.1.6.3 *Erhöhung des Spüldrucks*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit sinkendem Injektionsvolumen bedingt durch eine Herabsetzung von Injektionsdruck und Injektionszeit die Peaks kleiner und schmaler werden. Dadurch ließ sich über die Anpassung der Injektionsparameter die Auflösung der letzten beiden Peaks verbessern und trotz der Erhöhung der Analyt Konzentrationen und trotz Verwendung einer Realprobe eine vollständige Basislinientrennung aller Peaks erreichen. Die Injektionsparameter werden entsprechend für alle weiteren Messungen auf 5 s bei 0,3 psi für die Probeninjektion und auf 3 s bei 0,3 psi für die Reinstwasser Injektion angepasst. Zu erwartende Nachteile ergeben sich jedoch vermutlich durch eine Verringerung des Injektionsvolumens und entsprechender Erhöhung der Nachweisgrenze der Methode. Zudem ist aufgrund der im gerätetechnischen Grenzbereich liegenden Injektionsparameter (Zeit, Druck) eine geringere Reproduzierbarkeit des injizierten Probenvolumens denkbar. Sowohl Nachweisgrenze (siehe Kapitel 3.2.5 *Detektionslimit*) als auch die Reproduzierbarkeit (siehe Kapitel 3.2.3 *Präzision*) der Injektion werden deshalb gesondert untersucht.

3.1.6.3 Erhöhung des Spüldrucks

Eine weitere Problematik, die sich bei der Analyse von Proben aus Enzymreaktionen ergab, war das Auftreten inkonstanter Migrationszeiten bei längeren Messserien. Grundsätzlich sind stabile Migrationszeiten eine wichtige Voraussetzung für eine solide Quantifizierung. In der Kapillarelektrophorese wandern die Analyten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Kapillare und entlang des Detektors⁴⁰. Verändert sich die effektive Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten, verändert sich seine Migrationszeit und die Präsenzzeit des Analyten am Detektor⁴⁰ (siehe auch Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*). Zusätzlich führt eine längere Verweilzeit des Analyten in der Kapillare aufgrund einer höheren Diffusionszeit und einer erhöhten Interaktion des Analyten mit der Kapillarwand zu diversen peakverbreiternden Effekten (siehe Kapitel 2.1.5 *Injektion* und 2.1.8 *Trennleistung*). Beides führt dazu, dass die Signalintensität und die bestimmte Peakfläche beeinflusst werden. Da die Peakfläche zur Quantifizierung herangezogen wird, wird die entsprechend darüber bestimmte Konzentration beeinflusst. In der Regel ergeben sich dadurch größere Unsicherheiten bei der Quantifizierung, die sich jedoch vermeiden lassen. Die Problematik der inkonstanten Migrationszeiten trat im Zuge der Idee auf, mit der entwickelten CZE-UV/Vis Methode zeitaufgelöste Enzymreaktionen analysieren zu wollen (siehe Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme* und folgende). Dazu sollten über einen Zeitraum von 15 h insgesamt 36 aufeinanderfolgende CZE-UV/Vis Analysen erfolgen, die den Verlauf einer Enzymreaktion abbilden. Bei der Durchführung erster zeitaufgelöster Enzymreaktionen wurde jedoch festgestellt, dass die Migrationszeiten nicht stabil sind, teils extreme Migrationszeitenverschiebungen auftraten oder Analysen vollständig fehlschlagen. Eine auszugweise Darstellung der Elektropherogramme zu den Messungen #18 bis #29 einer zeitaufgelösten Enzymreaktion von MatB (siehe Kapitel 3.4.1 *Reaktion von MatB*) zu dieser Problematik ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 10 A).



Abbildung 10: Einfluss des Spüldrucks bei der Konditionierung. Beispielhafte Darstellung von CZE-UV/Vis Elektropherogramme der Messungen #18 bis #29 einer zeitaufgelösten Enzymreaktion von MatB (siehe Kapitel 3.4.1). Verwendung eines Spüldrucks bei der Konditionierung von 20 psi und einer Spülzeit von 6 min (A). Verwendung eines Spüldrucks bei der Konditionierung von 60 psi und einer Spülzeit von 3 min (B). Fehlgeschlagene Analyse (*). Für weitere Methodeneinstellungen siehe Startbedingungen der Methodenentwicklung (Tabelle 2). Die Trennung erfolgte ohne Kapillardruck. Es wurde ein 50 mM Na_2HPO_4 Puffer (pH 8,0) verwendet. Der Kapillarinne Durchmesser beträgt 50 μm . Interner Standard: cAMP.

Von den dargestellten Elektropherogrammen dient Messung #18 zunächst als Referenz, da bei dieser eine vergleichsweise gute Trennung erfolgte. Werden ausgehend von Messung #18 alle weiteren Elektropherogramme betrachtet, fällt zunächst auf, dass die Migrationszeiten teils extreme Schwankungen aufweisen. Die Migrationszeitschwankungen führen dazu, dass die Analyten nicht mehr vollständig innerhalb der festgelegten Analysenzeit detektiert wurden. Neben den Migrationszeitschwankungen sind die Analysen #19, #23 und #28 vollständig fehlgeschlagen. Auffällig ist, dass nach den fehlgeschlagenen Analysen die Migrationszeitverschiebung besonders ausgeprägt ist. Diese Beobachtungen wurden nicht nur für diese eine exemplarische Enzymreaktion gemacht, sondern betraf auch alle weiteren durchgeführten zeitaufgelösten Reaktionen der Reaktionen von MatA und CitZ und Kombinationen aus diesen. Über mögliche Gründe kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Zum einen können inkonstante Migrationszeiten auf einen instabilen EOF hinweisen. Verändert sich dessen Fließgeschwindigkeit der Kapillare verändern sich die Migrationszeiten der Analyten (siehe Kapitel 2.1.6 *Elektroosmotischer Fluss*). In der hier genutzten Methode ist der EOF in Richtung des Detektors gerichtet, die Migration der Analyten entgegengesetzt zum Detektor. Werden die Migrationszeiten trotz konstanten elektrischen Feldes erhöht liegt die Vermutung nahe, dass die Fließgeschwindigkeit des EOFs verringert wurde. Es ist bekannt, dass unspezifisch an die Kapillaroberfläche gebundene Proteine den EOF unterdrücken können^{52,86,87}. Dieses Phänomen wird unter anderen auch zur Oberflächenmodifizierung von Silica Kapillaren mit BSA ausgenutzt⁸⁸. Durch CZE-LIF Analysen, die zu einem späteren Zeitpunkt besprochen werden, wurde herausgefunden, dass die hier genutzten Enzyme zumindest teilweise in die Kapillare injiziert werden (siehe Kapitel 3.4.6 *Nachweis der Enzyme mittels CZE-LIF*). Dies ist eine mögliche Bestätigung der Eingangsvermutung, dass der EOF durch die Gegenwart von Proteinen modifiziert wird und inkonstante Migrationszeiten verursacht. Zum anderen können inkonstante Migrationszeiten auch auf eine unzureichende Konditionierung der Kapillare hinweisen. Da die Analysen zu Beginn der Messreihen standardmäßig gut verliefen, liegt die Vermutung nahe, dass das Problem nicht bei der täglichen Konditionierung der Kapillare (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*), sondern bei der Konditionierung zwischen den Analysen zu suchen ist (siehe Kapitel 3.1.1 *Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Messmethode* Tabelle 2). Dabei wird die Kapillare vor jeder Injektion und Trennung für 6 min bei 20 psi mit BGE gespült. Um die Spülung der Kapillare zu intensivieren, wurde der Spüldruck von 20 psi auf 60 psi erhöht und erneut eine zeitaufgelöste Enzymreaktion durchgeführt. Die Migrationszeiten waren nach der Anpassung des Spüldrucks stabil. In einem weiteren Schritt konnte die Spülzeit von 6 min auf 3 min ohne eine Verringerung der Stabilität der Migrationszeiten reduziert werden. Die erhaltenen Elektropherogramme der Messungen #18 bis #29 bei Verwendung des erhöhten Spüldrucks von 60 psi wurden als direkter Vergleich zu der zeitaufgelösten Enzymreaktion bei Verwendung eines geringeren Spüldrucks gegenübergestellt

(Abbildung 10 B S.37). Eine Erhöhung des Spüldrucks von 20 psi auf 60 psi bei gleichzeitiger Verringerung der Spülzeit von 6 min auf 3 min lässt eine deutliche Verbesserung der Stabilität der Migrationszeiten erkennen. Die Migrationszeiten sind über die Messungen #18 bis #29 stabil. Eine genauere Evaluierung der Stabilität der Migrationszeiten erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Kapitel 3.2.3 *Präzision*). Auch an dieser Stelle lässt sich nur über die Ursache der verbesserten Stabilität der Migrationszeit spekulieren. Denkbar ist, dass die Kapillare durch den höheren Spüldruck von Rückständen beispielweise von unspezifisch an die Kapillaroberfläche gebundenen Proteinen befreit wird. Dadurch würde ein konstanter EOF erzeugt werden und die Migrationszeiten der Analyten stabil bleiben. Darüber hinaus konnte durch die Reduzierung der Spülzeit die Gesamtanalysenzeit um 3 min verringert werden. Für alle weiteren Messungen wurde entsprechend der Spüldruck von 20 psi auf 60 psi erhöht und die Spülzeit von 6 min auf 3 min verringert. Die entwickelte CZE-UV/Vis Methode wird nachfolgend nochmals zusammenfassend dargestellt und im Rahmen dieser Arbeit als Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) bezeichnet. Die nachfolgenden Tabellen und fassen dabei sowohl die Standard CZE-UV/Vis Methodeneinstellungen (Tabelle 4) als auch das Zeitprogramm der Standard CZE-UV/Vis Methode (Tabelle 5) zusammen.

Tabelle 4: Standard CZE-UV/Vis Methode.

Parameter	Methodeneinstellung
Konditionierung	3 min (60 psi) 50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Hintergrundelektrolyt	50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Trennungsspannung	30 kV
Kapillartemperatur	20 °C
Kapillardruck	-
Injektionszeit (Probe)	5 s
Injektionsdruck (Probe)	0,3 psi
Injektionszeit (Wasser)	3 s
Injektionsdruck (Wasser)	0,3 psi
Detektor	PDA-Detektor
Kapillare	Unbelegte Quarzglas Kapillare 60 cm (50 cm effektiv); 50 µm ID x 360 µm OD

Tabelle 5: Zeitprogramm der Standard CZE-UV/Vis Methode.

Aktion	Wert	Dauer	Zufluss Vial	Abfluss Vial
Spülen	60 psi	3 min	Hintergrundelektrolyt	Abfallgefäß
Probeninjektion	0,3 psi	5 sek	Probe	Abfallgefäß
Wasserinjektion	0,3 psi	3 sek	Reinstwasser	Abfallgefäß
Trennung	30 kV	18 min	Hintergrundelektrolyt	Hintergrundelektrolyt

3.2 Methodenvalidierung

Nach der erfolgreichen Entwicklung der Standard CZE-UV/Vis Methode folgt die Methodenvalidierung. Bei der Methodenvalidierung wird vor dem routinemäßigen Gebrauch einer Analysenmethode überprüft, ob die entwickelte analytische Messmethode für die beabsichtigte Anwendung geeignet ist⁸⁹. Der Methodenvalidierung kommt vor allem im Bereich der analytischen Prüflabore, beispielsweise in der Qualitätssicherung der pharmazeutischen Industrie, eine hohe Bedeutung zu. Schon früh wurden im Rahmen der Qualitätssicherung nationale und internationale Standards zur Validierung analytischer Methoden in Form von Leitlinien definiert. Diese Leitlinien werden unter anderem von der *Food and Drug Administration (FDA)*⁹⁰, der *European Medicines Agency (EMA)*⁸⁹, dem *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*⁹¹ oder dem *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)*⁹² auf Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse zusammengestellt und öffentlich zugänglich bereitgestellt. Auf nationaler Ebene werden beispielsweise durch das *Deutsche Institut für Normung (DIN)* weitere Standards in DIN-Vorschriften definiert⁹³. In der Regel werden darin Empfehlungen zur Bestimmung der Spezifität, Linearität, Genauigkeit, Präzision, Nachweisempfindlichkeit als auch der Robustheit einer analytischen Methode dargelegt. Auch die in dieser Arbeit entwickelte CZE-UV/Vis Methode wird nachfolgend auf Basis dieser Veröffentlichungen validiert. Allerdings erfolgt keine vollumfängliche Methodenvalidierung, vielmehr wird auf einige für den Rahmen dieser Arbeit wichtigen Validierungsaspekte eingegangen. Dabei steht vor allem die Anwendbarkeit der Methode im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung im Fokus.

3.2.1 Spezifität und Selektivität

Im Rahmen der Methodenvalidierung wird zunächst näher auf die Spezifität und Selektivität eingegangen. Dabei wird laut der ICH Q2 (R1) Richtlinie die Fähigkeit einer analytischen Methode untersucht einen Analyt (Spezifität) oder mehrere Analyten (Selektivität) in Gegenwart anderer Komponenten eindeutig zu bestimmen⁹¹.

Identifizierung der Analyten

Zur Identifikation der Analyten wurden die UV/Vis-Spektren der Analyten verglichen. Da sämtliche UV/Vis-Spektren der Analyten (siehe Kapitel 8 *Anhang*) augenscheinlich identisch sind konnte kein Abgleich der Spektren mit Referenz-Substanzen oder Spektren-Datenbanken erfolgen. Da anhand der UV/Vis-Spektren der verwendeten Analyten keine eindeutige Identifizierung der Analyten möglich war wurden die einzelnen Peaks mithilfe von Einzelstandards identifiziert. Dazu wurde ein Methoden-Standard bestehend aus den im UV/Vis Bereich detektierbaren Analyten AMP, ADP, ATP, CoA, AcCoA und MalCoA mit einer Konzentration von 1 mM in Gelfiltrationspuffer (GEFI; siehe Kapitel 6.6

Puffersysteme) hergestellt. Zusätzlich wurde cAMP als interner Standard mit einer Konzentration von 0,5 mM hinzugegeben. Darüber hinaus wurden die Analyten, der Probenpuffer (GEFI) als Blank und der interne Standard als Einzelstandards angesetzt. Anschließend wurden der Methoden-Standard und die Einzelstandards mit der Standard CZE-UV/Vis Methode gemessen (Abbildung 11). Die nicht im UV/Vis-Bereich oder mit der CZE-UV/Vis-Methode detektierbaren Analyten Natriummalonat, Oxaloesigsäure, Citrat und TCEP, die jedoch an den Enzymreaktionen beteiligt sein werden, werden an dieser Stelle nicht dargestellt.

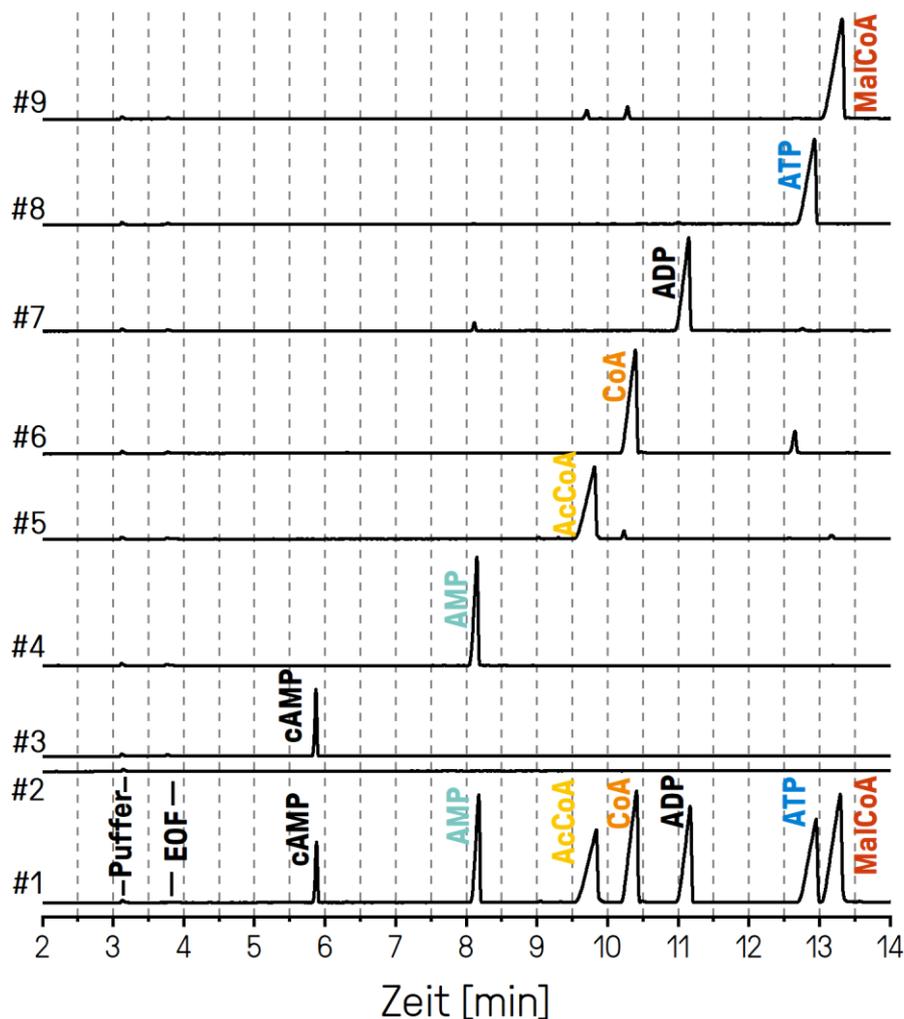


Abbildung 11: Methoden-Standard und Einzelstandards. Identifizierung der Analytpeaks im Elektropherogramm zur Analyse des Methoden-Standards durch die Überlagerung der Elektropherogramme zur Analyse der Einzelstandards. Methoden-Standard (0,5 mM cAMP, 1 mM alle weiteren Analyten) (#1), GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl) (#2), 0,5 mM cAMP (#3), 1 mM AMP (#4), 1 mM AcCoA (#5), 1 mM CoA (#6), 1 mM ADP (#7), 1 mM ATP (#8) und 1 mM MalCoA (#9). Die Messung erfolgte mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1).

Anhand der Elektropherogramme zeigt sich, dass alle sieben Peaks basisliniengetrennt vorliegen. Durch die Überlagerung der Elektropherogramme zu den Analysen der Einzelstandards und dem Elektropherogramm zur Analyse des Methoden-Standards und anschließenden Abgleich der Migrationszeiten lassen sich alle Peaks eindeutig identifizieren. Zusätzlich lassen sich anhand der Messung des Probenpuffers (GEFI) zwei weitere Peaks identifizieren. Zum einen wird ein Pufferpeak sichtbar, der vermutlich auf das bei unter 220 nm UV-absorbierende TRIS des GEFI zurückzuführen ist³⁴. Zum anderen wird ein schwaches Signal des EOFs sichtbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die entwickelte CZE-UV/Vis Methode hinsichtlich Spezifität und Selektivität aufgrund der vollständigen Trennung in der Lage ist die einzelnen Analyten in Gegenwart weiterer Komponenten zu bestimmen.

3.2.2 Genauigkeit

Die ICH Q2 (R1) Richtlinie⁹¹ empfiehlt zur Bestimmung der Genauigkeit die Analyse von zertifizierten Referenzstandards mit dem neu etablierten Analysenverfahren. Die Quantifizierungsergebnisse werden anschließend mit der bekannten Konzentration des Standards verglichen und auf potenzielle Abweichungen hin untersucht. Allerdings ist die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien oftmals kostspielig oder sind nicht kommerziell erhältlich. Im Falle nicht kommerziell erhältlicher Referenzmaterialien besteht nach ICH Topic Q7 Richtlinie⁹⁴ die Möglichkeit *in-house* Referenzstandards hoher Qualität herzustellen. In Anbetracht der Vielzahl der hier verwendeten Analyten und nach Abwägung der Kosten und Nutzen wurde auf die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien zunächst verzichtet. Um trotzdem eine möglichst hohe Genauigkeit gewährleisten zu können wurden die verwendeten Substanzen in hoher Reinheit verwendet. Darüber hinaus wurden alle hergestellten Lösungen durch Abgleich mit *in-house* hergestellten Kalibrierstandards bekannter Konzentration kontrolliert. Eine weitere Form der Selbstkontrolle fand im Rahmen der Bestimmung von Wiederfindungsraten bei der Analyse von Enzymreaktionen statt (siehe Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ*). Somit wurde für die sich in dieser Arbeit befindlichen forschungsorientierten *proof-of-concept* Phase ausreichende qualitätssichernde Maßnahmen getroffen. Bei einer späteren pharmazeutischen Anwendung müsste auf zertifizierte Referenzmaterialien zurückgegriffen werden.

3.2.3 Präzision

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Methodvalidierung stellt laut ICH Q2 (R1) Richtlinie⁹¹ die Präzision dar. Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt dabei die Übereinstimmung von Analyseergebnissen an gleichen Proben und ist entsprechend ein Maß für die Streuung von Analyseergebnissen. Die Streuung der Ergebnisse wird dabei als relative Standardabweichung (RSD %) angegeben. Die Präzision selbst wird untergliedert in Wiederholbarkeit, Intermediat Präzision und Reproduzierbarkeit⁹¹. Auf erstere wird im nachfolgenden näher eingegangen. Bei der Wiederholbarkeit handelt es sich um die Streuung der Analyseergebnisse bei wiederholter Messung derselben Probe. Dabei hängt die Streuung der Ergebnisse von Systemparametern wie der Injektion oder der Trennung ab. Die ICH Q2 (R1) Richtlinie empfiehlt zur Bestimmung der Wiederholbarkeit eine minimale Anzahl von sechs Analysen derselben Proben bei einer maximalen zu erwartenden Testkonzentration von 100 %⁹¹. Zur Bestimmung der Systempräzision wurde entsprechend ein Methoden-Standard bestehend aus internem Standard cAMP (0,5 mM) und den Analyten AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP und MalCoA (jeweils 1 mM) in GEFI angesetzt. Der Methoden-Standard wurde anschließend zehnfach mit der Standard CZE-UV/Vis Methode analysiert. Die erhaltenen Elektropherogramme werden nachfolgend dargestellt.

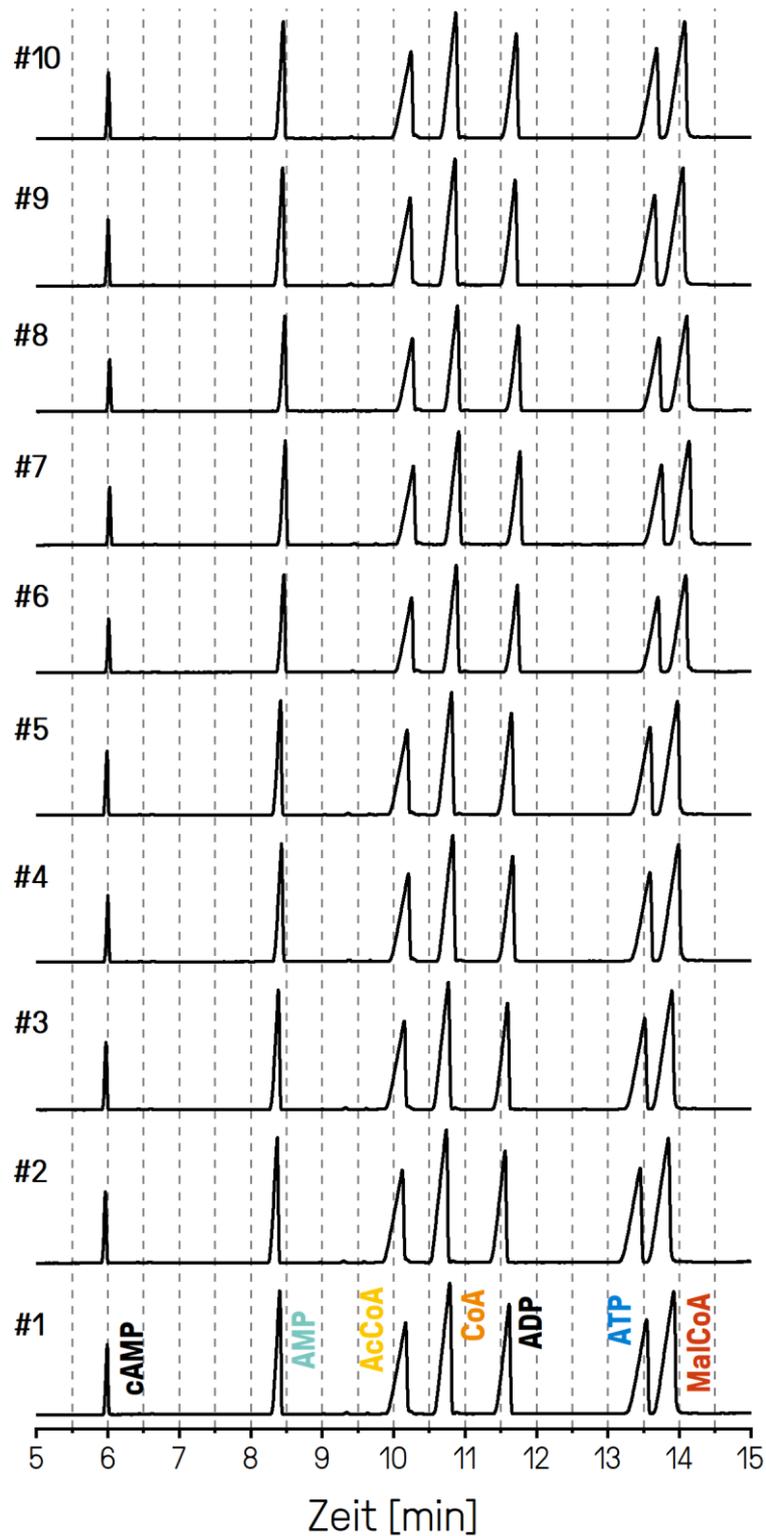


Abbildung 12: Untersuchung zur Präzision der CZE-UV/Vis Methode. Darstellung von zehn Wiederholmessungen eines Methoden-Standards bestehend aus internem Standard cAMP (0,5 mM) und den Analyten AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP und MalCoA (jeweils 1 mM) in GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl).

Die zehn Elektropherogramme zeigen augenscheinlich eine gute Wiederholbarkeit, lediglich kleine Schwankungen der Migrationszeiten und der Peakgrößen lassen sich erkennen. Anhand der Elektropherogramme wurden anschließend die Migrationszeiten und die Peakflächen hinsichtlich der Präzision untersucht, da beide Einfluss auf das Messergebnis nehmen (siehe Kapitel 3.1.6.3 *Erhöhung des Spüldrucks*). Sowohl für die Migrationszeiten der einzelnen Peaks als auch für die Peakflächen wurden relative Standardabweichungen berechnet. Darüber hinaus wurden gleichermaßen relative Standardabweichungen der zeitkorrigierten Peakflächen^{40,41} (siehe Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*) als auch auf den internen Standard cAMP normierte, zeitkorrigierte Peakflächen (siehe Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*) berechnet. Anhand der erhaltenen Mittelwerte wurde ein Grubbs-Ausreißertest durchgeführt (siehe Kapitel 8 *Anhang*), der die Mittelwerte der normierten, zeitkorrigierten Peakflächen einiger Analyten von Messung #1 als signifikanten Ausreißer identifizierte. Die Messung #1 wurde entsprechend von der Auswertung für sämtliche Berechnungen ausgeschlossen. Die erhaltenen relativen Standardabweichungen der verbliebenen neun Messungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Untersuchung zur Präzision der CZE-UV/Vis Methode. Zusammenfassung der bestimmten Werte zur relativen Standardabweichung der Migrationszeit (RSD t_{Mig}), relativen Standardabweichung der Peakfläche (RSD A), relativen Standardabweichung der zeitkorrigierten Peakfläche (RSD A_{Korr}) und relativen Standardabweichung der auf cAMP normierten und zeitkorrigierten Peakfläche (RSD A_{Norm, Korr}). Durchgeführte Wiederholmessungen: 10. Ausreißer nach Grubbs: 1. Zur Auswertung herangezogene Wiederholmessungen: 9 (siehe Kapitel 8 *Anhang*).

Analyt	RSD t_{Mig} [%]	RSD A [%]	RSD A _{Korr} [%]	RSD A _{Norm, Korr} [%]
AMP	0,5	14,3	14,7	0,3
ADP	0,6	14,2	14,6	0,2
ATP	0,7	14,3	14,8	0,3
AcCoA	0,5	14,0	14,3	0,3
CoA	0,5	13,3	13,9	0,7
MalCoA	0,7	14,0	14,5	0,2

Die erhaltenen relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten (RSD t_{Mig}) betragen zwischen 0,5 % und 0,7 %. Da sich keine Empfehlungen in den Leitlinien der FDA und EMEA finden ließen wurde in der Literatur nach Vergleichswerten gesucht. Eine kollaborative Studie von Wenz et al.⁹⁵ wies zwischen 11 verschiedenen Laboren eine relative Standardabweichung der absoluten Migrationszeit von 0,7 % für die CE-MS Analyse eines Peptidstandards auf. Allgemein scheinen relative Standardabweichungen der Migrationszeit von unter 2 % erreichbar^{34,45}. Die hier erhaltenen Werte entsprechen den Werten der Literatur und zeigen eine hohe Wiederholbarkeit. Die relativen

Standardabweichungen der Peakflächen (RSD A) betragen 13,3 % bis 14,3 %. Allgemein werden Akzeptanzkriterien für die RSD Werte separat für jede Art von Messmethode festgelegt, entsprechend schwierig ist die Einordnung der erhaltenen Werte. Eine Leitlinie zur Validierung chromatographischer Methoden des *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) empfiehlt beispielsweise RSD-Werte von $\leq 1\%$ ⁹⁶. Akzeptable RSD-Werte im Bereich von 1-2 % konnten ebenso durch weitere Literatur bestätigt werden ⁹⁷. Die hier erhaltenen RSD-Werte liegen deutlich über diesen Grenzwerten. Grund dafür ist vermutlich die sehr kurze und bei geringem Druck durchgeführte wenig reproduzierbare Injektion. Zur Verbesserung der RSD-Werte haben sich zwei Möglichkeiten in der CE bewährt. Zum einen die Verwendung von zeitkorrigierten Peakflächen und zum anderen die Normierung der Peakflächen auf einen internen Standard (siehe Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*). Die Nutzung zeitkorrigierter Peakflächen soll dazu dienen, die durch die Variation der Migrationszeit verursachte unterschiedliche Verweilzeit am Detektor und die damit einhergehenden Peakflächen-Variationen zu korrigieren, um die Präzision der analytischen Methode zu erhöhen. Die hier erhaltenen relativen Standardabweichungen der zeitkorrigierten Peakflächen (RSD A_{Korr}) sind mit 13,9 % bis 14,8 % vergleichbar mit den RSD-Werten der absoluten Peakflächen. In diesem Fall ist die Zeitkorrektur der Peakflächen nicht sehr effektiv, vermutlich aufgrund der ohnehin stabilen Migrationszeiten ⁴⁰. Allerdings sollten die zeitkorrigierten Peakflächen bei schwankenden Migrationszeiten in der Regel bessere Ergebnisse erzielen als die absoluten Peakflächen. Mit Hilfe der auf cAMP normierten und zeitkorrigierten Peakflächen (RSD A_{Norm, Korr}) wurden hingegen deutlich bessere RSD-Werte von ca. 0,3 % erzielt, womit die CDER Richtlinie erfüllt wurde. Der große Unterschied in den RSD-Werten lässt sich darin begründen, dass die Schwankungen des injizierten Probenvolumens durch die Normierung der Peakfläche der Analyten auf die Peakfläche des internen Standards cAMP zum Teil ausgeglichen werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sowohl die Migrationszeiten als auch die normierten und zeitkorrigierten Peakflächen eine hohe Präzision aufweisen. Entsprechend wurden bei der Auswertung aller weiteren Messungen auf einen internen Standard normierten und zeitkorrigierten Peakflächen genutzt.

3.2.4 Linearität, Arbeitsbereich und Kalibrierung

Die Linearität und der Arbeitsbereich sind zwei weitere wichtige Kenngrößen bei der Validierung einer analytischen Methode. Dabei wird die Linearität nach ICH Q2 (R1) Richtlinie⁹¹ als die Fähigkeit einer analytischen Methode beschrieben in einem bestimmten Bereich Messsignale eines Analyten zu erzeugen, die proportional zu dessen Konzentration sind. Der Nachweis erfolgt dabei unter anderem über die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (R) bzw. Bestimmtheitsmaße (R^2), einer Regressionsgeraden und dessen graphischer Darstellung. Der Arbeitsbereich definiert nach ICH Q2 (R1) Richtlinie⁹¹ den Konzentrationsbereich, in dem sich die Konzentration eines Analyten unter Berücksichtigung eines bestimmten Maßes an Präzision, Genauigkeit und Linearität bestimmen lässt. Da zur Quantifizierung der Analyten in dieser Arbeit eine externe Kalibrierung durchgeführt wird, die die wesentlichen Kriterien an Linearität und Arbeitsbereich abdecken, erfolgt eine gemeinsame Betrachtung dieser Aspekte im Rahmen der Kalibrierung und des Detektionslimits.

Auf Basis der Ergebnisse in Kapitel 3.2.3 *Präzision*, bei der sich die Verwendung von normierten und zeitkorrigierten Peakflächen als Methode der Wahl herausgestellt hat, erfolgte die Kalibrierung unter Verwendung eines internen Standards. Die ICH Q2 (R1) Richtlinie⁹¹ empfiehlt einen Arbeitsbereich von 70-130 % der zu verwendenden Testkonzentration. Die angestrebte maximale Analyt-Testkonzentration der zu charakterisierenden Enzym-Reaktionen beträgt etwa 1 mmol/L (100 %). In Anlehnung an die Empfehlung der ICH Q2 (R1) Richtlinie wurde der zu notwendige Arbeitsbereich auf 0,005 mmol/L (0,5 %) bis 1,5 mmol/L (150 %) festgelegt. Entsprechend wurden Kalibrier-Standards der Analyten AMP, ATP, AcCoA, CoA und MalCoA mit den Konzentrationen von 0,005 mM, 0,01 mM, 0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM und 1,5 mM hergestellt (siehe Kapitel 6.8.1 *Kalibrierung*). Zusätzlich wurde cAMP (0,5 mM) als interner Standard und die nicht detektierbaren Analyten OxAc (5 mM), TCEP (1 mM), NaMal (1 mM) und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl) als Probenmatrix in konstanter Konzentration hinzugegeben. Von jedem Kalibrier-Standard wurden anschließend fünf Wiederholmessungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) durchgeführt und die Peakflächenverhältnisse (normierte Peakfläche) von Analyten und internem Standard bestimmt. Die erhaltenen Peakflächenverhältnisse wurden daraufhin gegen die Konzentration des Kalibrier-Standards aufgetragen und die entsprechenden Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R^2) berechnet (siehe auch Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*). Die resultierenden Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße werden nachfolgend abgebildet.

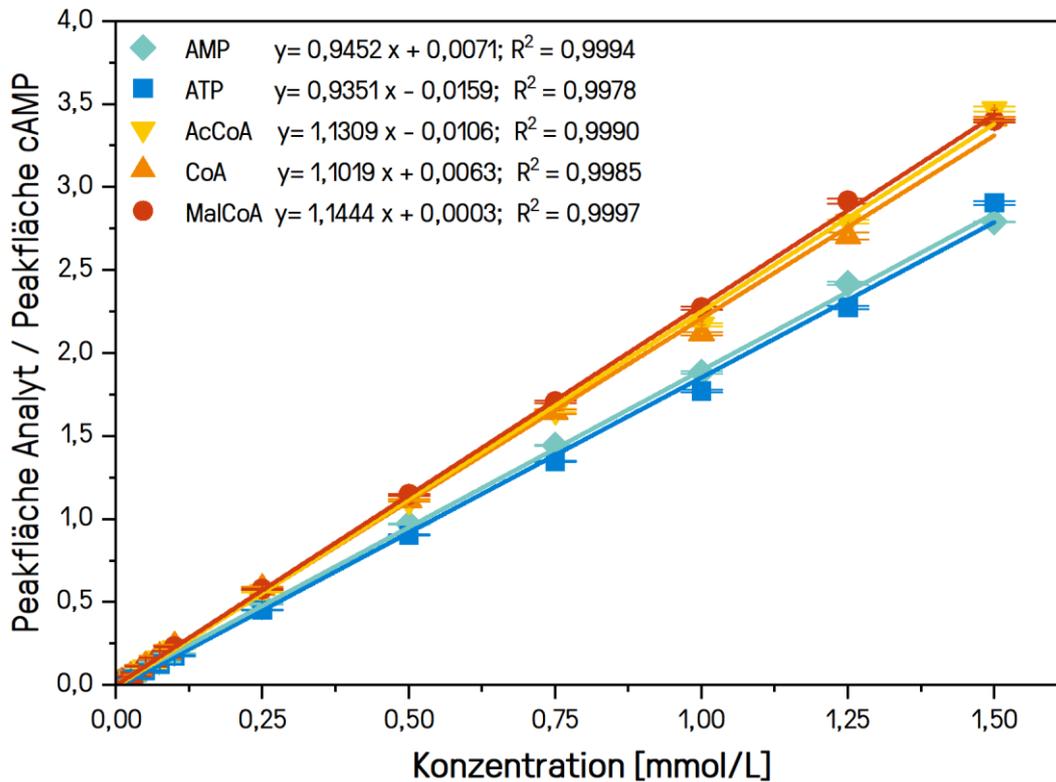


Abbildung 13: Externe Kalibrierung mit internem Standard. Darstellung von Konzentrationen und normierten und zeitkorrigierten Peakflächen (Peakflächenverhältnis Analyt zu internem Standard cAMP) und den daraus bestimmten Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R²) der Analyten AMP, ATP, AcCoA, CoA und MalCoA.

Bei Betrachtung der Kalibriergerade und Kalibrierfunktionen fällt auf, dass sich für alle Analyten ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakflächenverhältnis im gewählten Arbeitsbereich herstellen lässt. Zudem lässt sich erkennen, dass die Steigungen der Gruppen der Nukleotide AMP und ATP als auch der Cofaktoren AcCoA, CoA und MalCoA untereinander vergleichbar sind. Grund dafür ist ihre strukturelle Ähnlichkeit und dementsprechend auch das Vorhandensein gleicher Chromophore. Die Bestimmtheitsmaße zeugen zudem von einer hohen Anpassungsgüte aller Regressionsgeraden an die erhaltenen Wertepaare der Kalibrierung. Die ermittelte Präzision bei einer Testkonzentration von 1 mmol/L (100 %) beträgt im Mittel für alle Analyten 0,4 % (siehe dazu auch Kapitel 3.2.3 *Präzision*). Eine ausführliche Zusammenstellung der bestimmten Präzision für alle Konzentrationen und Analyten lassen sich im Anhang (siehe Kapitel 8 *Anhang*) einsehen. Damit ist die Präzision vergleichbar mit den bereits in Kapitel 3.2.3 *Präzision* bestimmten Werten und erfüllt ebenso das CDER Kriterium von RSD-Werten von $\leq 1\%$ ⁹⁶. Durch den Nachweis der Linearität im gewählten Arbeitsbereich konnten neben der Kalibrierung die Validierungsaspekte in Bezug auf Linearität und Arbeitsbereich untersucht und bestätigt werden. Die berechneten Kalibrierfunktionen wurden

anschließend zu Quantifizierungszwecken herangezogen und durch Messung eines Standards mit bekannter Konzentration vor jeder Messreihe auf ihre Gültigkeit hin überprüft.

3.2.5 Detektionslimit

Zur Bestimmung der Nachweis- (NG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenze (BG) einer instrumentellen Analysenmethode existieren nach ICH Q2 (R1) Richtlinie ⁹¹ im Wesentlichen drei Möglichkeiten. Dazu zählen die Bestimmung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses, die Leerwertmethode und die Kalibriergeradenmethode. In dieser Arbeit wurde die Kalibriergeradenmethode zur Bestimmung der Grenzen herangezogen, da diese statistisch gesicherte Ergebnisse nach DIN-Norm liefert. Eine genauere Beschreibung zur Bestimmung der NG, EG und BG lässt sich in der DIN-Norm 32645 ⁹³ des *Deutschen Instituts für Normung* (DIN) finden. In Anlehnung an die DIN 32645 wurden nachfolgend die entsprechenden Auswertungen getätigt. Dazu wurde zunächst zur Festlegung des Kalibrierbereichs die Nachweisgrenze über das Signal-zu-Rausch Verhältnis bei einer Wellenlänge von 210 nm mit ca. 3 µmol/L abgeschätzt. Die Norm schreibt vor, dass die Konzentration des größten Kalibrierstandards das Zehnfache der Nachweisgrenze nicht überschreiten darf. Entsprechend wurde der Kalibrierbereich zwischen 3 µmol/L und 30 µmol/L festgelegt und zehn Kalibrierstandards der Analyten AMP, ATP, AcCoA, CoA und MalCoA mit Konzentrationen von 3 µmol/L, 6 µmol/L, 9 µmol/L, 12 µmol/L, 15 µmol/L, 18 µmol/L, 21 µmol/L, 24 µmol/L, 27 µmol/L und 30 µmol/L angesetzt (siehe Kapitel 6.8.2 *Detektionslimit*). Zusätzlich wurde cAMP (0,5 mM) als interner Standard und die nicht detektierbaren Analyten OxAc (5 mM), TCEP (1 mM), NaMal (1 mM) und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl) als Probenmatrix in konstanter Konzentration hinzugegeben und mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert. Dabei wurden von jedem Kalibrierstandard fünf Wiederholmessungen durchgeführt, die normierten Peakflächen gegen die Konzentration aufgetragen und Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R^2) bestimmt. Zusätzlich wurden zu den nachfolgend abgebildeten Regressionsgeraden die Konfidenzbänder mit einem Konfidenzniveau von 95 % abgebildet.

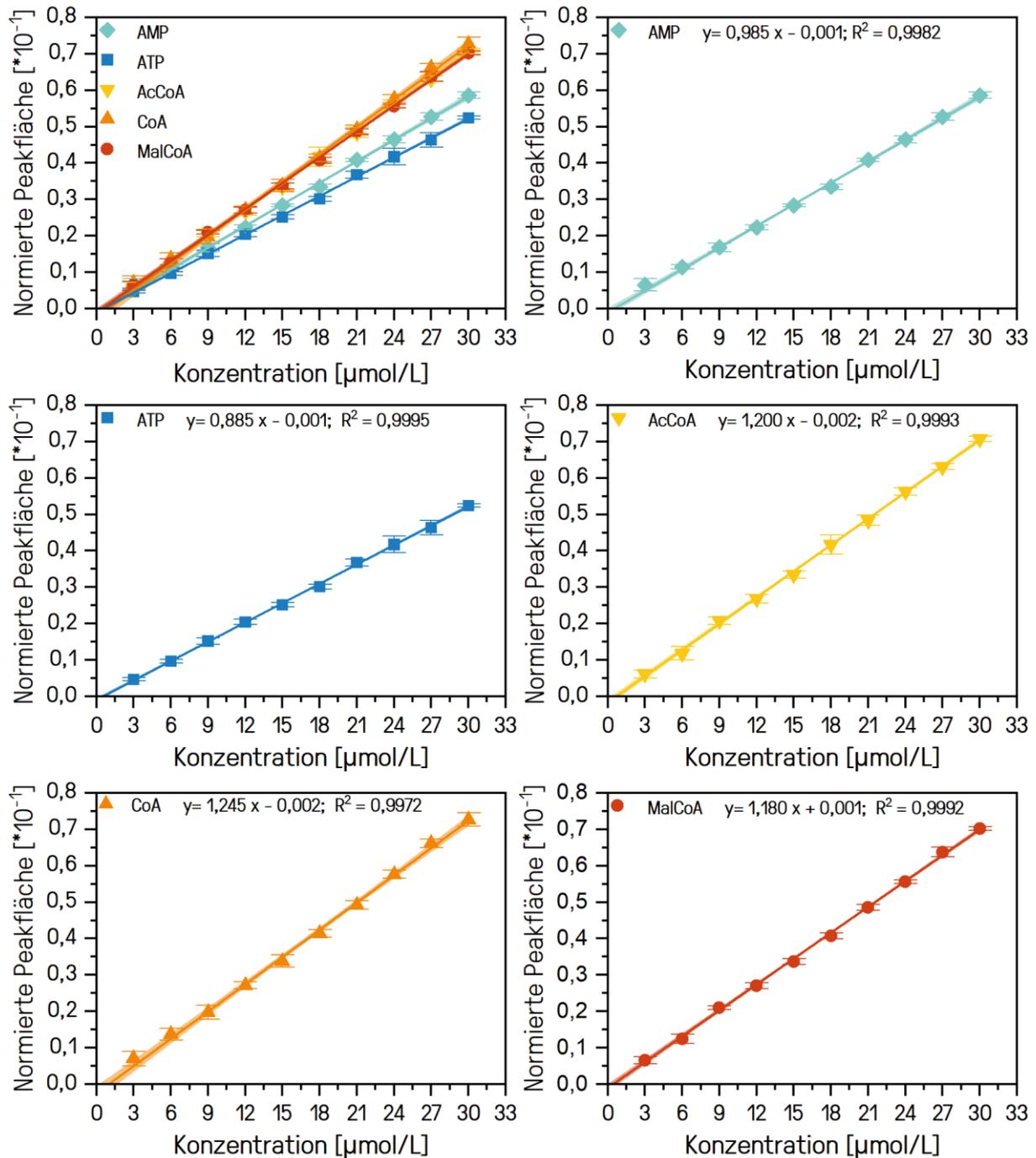


Abbildung 14: Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645⁹³. Bestimmung der NG, EG und BG mit Hilfe der Kalibriergeradenmethode nach der DIN 32645. Darstellung der Regressionsgeraden inklusive der Konfidenzbänder mit einem Konfidenzniveau von 95 % (farbig transparente Fläche), Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R^2). Darstellung von Konzentrationen und normierten und zeitkorrigierten Peakflächen (Peakflächenverhältnis Analyt zu internem Standard cAMP).

Bei Betrachtung der Kalibriergeraden und Kalibrierfunktionen fällt auf, dass sich für alle Analyten ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakflächenverhältnis im gewählten Arbeitsbereich herstellen lässt. Zudem lässt sich erkennen, dass die Steigungen der Gruppen der

Nukleotide AMP und ATP als auch der Cofaktoren AcCoA, CoA und MalCoA untereinander vergleichbar sind. Grund dafür ist ihre strukturelle Ähnlichkeit und dementsprechend auch das Vorhandensein gleicher Chromophore. Die Bestimmtheitsmaße zeugen zudem von einer hohen Anpassungsgüte aller Regressionsgeraden an die erhaltenen Wertepaare der Kalibrierung. Weiterhin lassen die sehr engen Vertrauensbänder auf eine hohe analytische Präzision schließen, wodurch eine geringe Unsicherheit bei der Bestimmung der NG, EG und BG erreicht wird.

Vor der weiteren Auswertung nach DIN 32645 wurden die Datensätze auf Ausreißer mittels F-Test und auf Linearität mittels F-Test nach MANDEL überprüft. Es wurden keine Ausreißer gefunden und Linearität war gegeben (siehe Tabelle 7, siehe auch Kapitel 8 *Anhang*). Anschließend wurde auf Basis der DIN 32645 die NG, EG, BG und die Verfahrensstandardabweichung ($s_{x,o}$) bei einer Anzahl an Messungen pro Wertepaar (n) von fünf, einer Ergebnisunsicherheit von 33,3 % und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bestimmt. Die berechneten Werte wurden in nachfolgender Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 7: Bestimmung wichtiger Kenngrößen zur Kalibriergerademethode nach DIN 32645 ⁹³. Bestimmte Werte der Nachweis- (NG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenze (BG) und der Verfahrensstandardabweichung ($s_{x,o}$). Ergebnisse zur Prüfung auf Ausreißer mittels F-Test und Linearität mittels F-Test nach MANDEL. Anzahl der Messungen pro Wertepaar (n): 5. Ergebnisunsicherheit: 33,3 %. Irrtumswahrscheinlichkeit: 5 %.

Analyt	NG [$\mu\text{mol/L}$]	EG [$\mu\text{mol/L}$]	BG [$\mu\text{mol/L}$]	$s_{x,o}$ [$\mu\text{mol/L}$]	Ausreißer	Linearität
AMP	0,551	1,102	1,922	0,363	Nein	Ja
ATP	0,371	0,742	1,321	0,244	Nein	Ja
AcCoA	0,401	0,803	1,424	0,264	Nein	Ja
CoA	0,673	1,347	2,318	0,444	Nein	Ja
MalCoA	0,420	0,840	1,487	0,277	Nein	Ja

Die NG, EG und BG für die Bestimmung der Analyten AMP, ATP, AcCoA, CoA und MalCoA in der beschriebenen Probenmatrix betragen ca. 0,5 $\mu\text{mol/L}$, 1,0 $\mu\text{mol/L}$ und 1,5 $\mu\text{mol/L}$. Die bestimmten Grenzen liegen dabei in der gleichen Größenordnung von publizierten Ergebnissen ^{98,99}. Die berechneten Verfahrensstandardabweichungen betragen ca. 0,3 $\mu\text{mol/L}$. Die Verfahrensstandardabweichung gilt dabei als Gütemaß für die Streuung, also der Präzision einer Analysenmethode ¹⁰⁰. Wie bereits zuvor in Kapitel 3.2.3 *Präzision* näher untersucht, wird auch hier nochmals die hohe Präzision der Messmethode durch die geringen Verfahrensstandardabweichungen bestätigt.

Insgesamt konnte die entwickelte Standard CZE-UV/Vis Methode hinsichtlich Spezifität, Selektivität, Genauigkeit, Präzision, Linearität, Arbeitsbereich und Detektionslimit erfolgreich validiert werden. Dabei konnte in allen untersuchten qualitätssichernden Aspekten gezeigt werden, dass die entwickelte Standard CZE-UV/Vis Methode für den routinemäßigen Gebrauch geeignet ist. Entsprechend werden alle weiteren Analyten in dieser Arbeit auf Basis der Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt.

3.3 Stabilität der Reaktanden

Vor den Charakterisierungen der Enzymreaktionen wurden zunächst die Reaktanden der Enzymreaktionen auf ihre Stabilität hin untersucht. Die Kenntnis über die Stabilität der Reaktanden ist bei der Charakterisierung von Enzymreaktionen von größer Bedeutung, da sie sowohl Einfluss auf die Quantifizierung der Reaktanden als auch direkten Einfluss auf die Kinetik von Enzymreaktionen nehmen. Durch eine vorhandene Instabilität eines Reaktanden verändern sich dessen Konzentrationen während der Enzymreaktion ohne die Gegenwart eines Enzyms. In der Folge kann der Anteil der durch die Enzymreaktion bewirkten Konzentrationsänderung nicht eindeutig identifiziert werden. Darüber hinaus verändert sich ebenfalls die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion mit der Konzentration des Substrates^{78,82,83}. Um eine möglichst exakte Bestimmung der Stabilität der Reaktanden zu ermöglichen ist es wichtig, sowohl die Stabilitätsmessungen als auch die enzymatischen Reaktionen unter den gleichen Bedingungen durchzuführen. Entsprechend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität der mittels CZE-UV/Vis nachweisbaren Reaktanden im folgenden Kapitel dargestellt.

3.3.1 Coenzyme A

Einer der Reaktanden, der bei den enzymatischen Reaktionen eingesetzt wird, ist Coenzym A (CoA). Strukturell setzt sich CoA aus einem Nukleotid (Adenosindiphosphat, ADP), einem Vitamin (Pantothersäure, Vitamin B5) und einer Aminosäure (Cystein) zusammen. Es ist bekannt, dass CoA nicht stabil ist^{101–103} und über die freie Thiol-Gruppe des Cystein-Rests zu einem CoA-Disulfid (CoA-S-S-CoA) oxidiert werden kann⁷⁶. Besonders bei pH-Werten ≥ 8 wird diese Umsetzung durch erhöhten oxidativen Stress begünstigt^{101–103}. Eine Möglichkeit zur Vermeidung der Bildung eines CoA-Disulfids ist die Zugabe eines reduzierenden Reagenzes. Dazu zählt neben 1,4-Dithiothreitol (DTT) auch das hier verwendete Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)^{76,104–106}. Ergänzend zu den Untersuchungen zur Stabilität von CoA bei der Evaluierung des internen Standards (siehe Kapitel 3.1.6.1 *Wechsel des internen Standards*) werden im Folgenden zeitaufgelöste Messungen mit Hilfe der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) durchgeführt. Dies soll eine exakte Bestimmung der Kinetik zur Umsetzung des CoAs zum CoA-Disulfid im gleichen Zeitrahmen der später folgenden enzymatischen Reaktionen ermöglichen. Grundsätzlich werden

zeitaufgelöste Reaktionen mit einem Umfang von 38 Messungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode im Abstand von ca. 24,5 min und einer resultierenden Gesamtzeit von ca. 15 h bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt (siehe Kapitel 6.9.7 *Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen*). Die Zusammensetzung des Edukt-Mixes entspricht ebenso dem der Enzymreaktionen. Der standardmäßige Edukt-Mix (siehe Kapitel 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen*) besteht dabei, wenn nicht anderweitig angegeben, aus einem der drei 1 mM Cofaktoren (CoA, MalCoA oder AcCoA), 0,5 mM cAMP, 1 mM ATP, 1 mM NaMal, 5 mM OxAc, 1 mM TCEP und GEFI. Nachfolgend sind entsprechend die zur Stabilitätsbestimmung von CoA erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Reaktionen in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM TCEP dargestellt. Aufgrund der Co-Migration von ATP und dem CoA-Disulfid wurde ATP nicht zum Edukt-Mix hinzugegeben. Zudem werden bei den zeitaufgelösten Messungen auf den internen Standard normierte, zeitkorrigierte Peakflächen und keine Konzentrationen aufgrund des nicht kalibrier- und quantifizierbaren CoA-Dimers dargestellt.

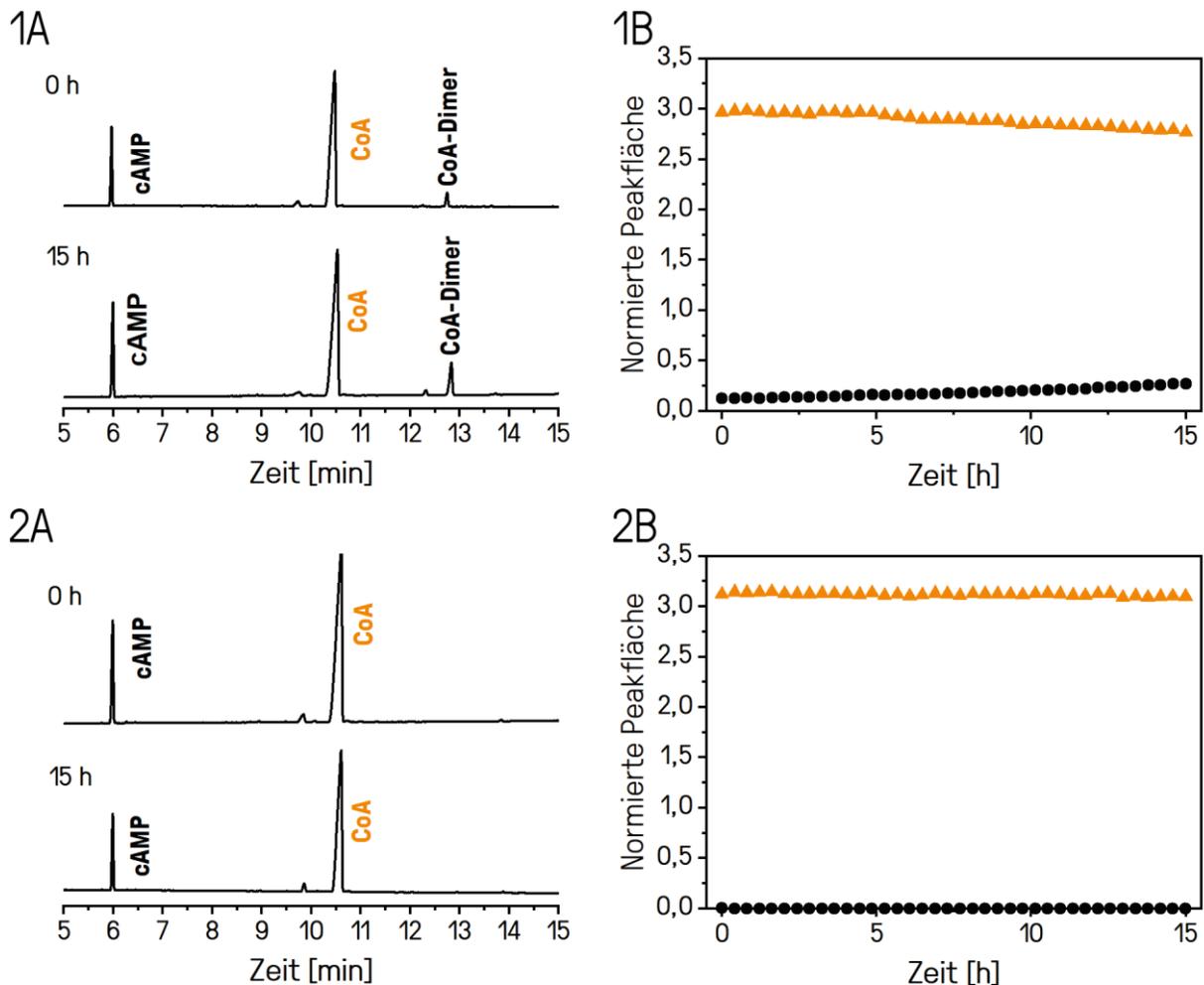


Abbildung 15: Stabilität von CoA. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h und zeitaufgelöste Messung (Kapitel 6.9.7) in Abwesenheit (1A, 1B) und Anwesenheit (2A, 2B) von 1 mM TCEP von CoA (▲) und CoA-Dimer (●) in der standardmäßigen Reaktions-Referenz. Der standardmäßige Edukt-Mix (Kapitel 6.9.3) enthielt kein ATP. Darstellung von Konzentrationen und normierten und zeitkorrigierten Peakflächen (Peakflächenverhältnis Analyt zu internem Standard cAMP).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h zur Stabilitätsmessung von CoA in Abwesenheit von TCEP (1A) zeigen neben dem CoA-Peak einen CoA-Dimer-Peak, der nach 15 h größer ist als bei 0 h. Die Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der normierten Peakfläche von CoA und eine kontinuierliche Zunahme der normierten Peakfläche von CoA-Dimer erkennen. Insgesamt beträgt die Abnahme von CoA über den gesamten Zeitraum ca. 6 %. Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h zur Stabilitätsmessung von CoA in Anwesenheit von TCEP (2A) zeigen neben dem CoA-Peak sowohl nach 0 h als auch nach 15 h keinen CoA-Dimer-Peak. Die Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Reaktion (2B) bestätigt. Dabei lässt sich keine Abnahme von CoA und kein CoA-Dimer nachweisen. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Zugabe von 1 mM TCEP die Bildung von CoA-Dimer über einen Zeitraum von 15 h bei einer Temperatur von 25 °C im Standard Reaktions-Mix ohne Enzyme (hier: ohne ATP) effektiv verhindert und die Stabilität von CoA somit gewährleistet ist.

3.3.2 Malonyl-Coenzym A

Ein weiterer Reaktand, der bei den enzymatischen Reaktionen eingesetzt wird, ist Malonyl-Coenzym A (MalCoA). Strukturell handelt es sich bei MalCoA um ein mit Malonsäure verestertes CoA-Derivat. Es ist bekannt, dass sich MalCoA hydrolytisch zu CoA und AcCoA zersetzt¹⁰⁷. Zur Untersuchung der Stabilität von MalCoA im hier verwendeten schwach basischen Milieu (pH 8,0) werden im Folgenden zeitaufgelöste Messungen (siehe Kapitel 6.9.7 *Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen*) mit Hilfe der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt. Dies soll eine exakte Bestimmung der Kinetik zur Umsetzung von MalCoA zu CoA und AcCoA im gleichen Zeitrahmen der später folgenden enzymatischen Reaktionen ermöglichen. Nachfolgend sind entsprechend die zur Stabilitätsbestimmung von MalCoA erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Messungen dargestellt.

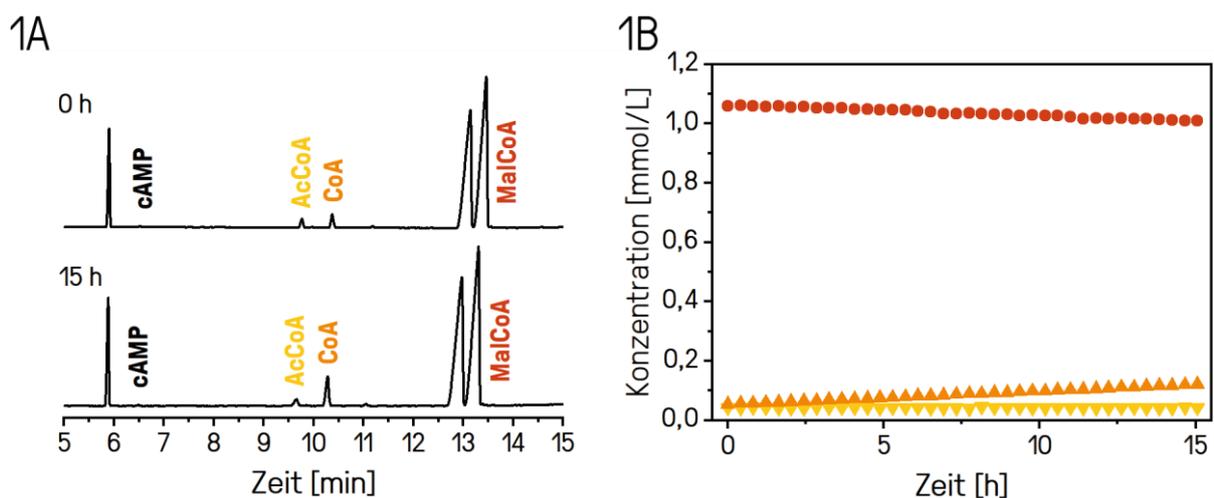


Abbildung 16: Stabilität von MalCoA. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) und zeitaufgelöste Messung (Kapitel 6.9.7) von CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼) (1B) in der standardmäßigen Reaktions-Referenz.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h zur Stabilitätsmessung von MalCoA (1A) zeigen neben dem MalCoA-Peak einen CoA- und AcCoA-Peak, wobei nach 15 h nur der CoA-Peak größer ist als bei 0 h. Die Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der MalCoA Konzentration und eine kontinuierliche Zunahme der CoA Konzentration erkennen. Die Konzentration von AcCoA hingegen bleibt über den gesamten Zeitraum konstant. Insgesamt beträgt die Abnahme von MalCoA über den gesamten Zeitraum ca. 5 %. Eine äquivalente Konzentrationszunahme lässt sich bei CoA feststellen. Weiterhin lässt sich vermuten, dass abgesehen von CoA ebenfalls äquimolare Mengen an Malonat entstehen¹⁰⁷. Das postulierte

Degradationsprodukt AcCoA konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Spekulieren ließe sich, dass das durch Zerfall von MalCoA entstandene AcCoA selbst schneller zu CoA abbaut als es gebildet wird und sich somit nicht erfassen lässt.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass MalCoA über einen Zeitraum von 15 h bei einer Temperatur von 25 °C im Standard Reaktions-Mix ohne Enzyme zu einem signifikanten Anteil von 5 % in CoA zerfällt, jedoch kein Zerfall von MalCoA in AcCoA beobachtet wird. Allerdings scheint in Gegenwart von MalCoA im Edukt-Mix bereits ein geringer Anteil von AcCoA vorzuliegen. Der Zersetzung von MalCoA zu CoA lässt sich unter den definierten Reaktionsbedingungen nicht vermeiden. Um dennoch den Einfluss der Hydrolyse von MalCoA zu CoA während der später folgenden enzymatischen Reaktionen abschätzen zu können, werden zu Beginn und zu Ende jeder zeitaufgelösten Reaktion eine Reaktions-Referenz (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) gemessen. Die Reaktions-Referenz ist abgesehen von der Abwesenheit der Enzyme identisch zum Reaktions-Mix und wird ebenso identisch behandelt.

3.3.3 Acetyl-Coenzym A

Ein weiterer Cofaktor, der bei den enzymatischen Reaktionen eingesetzt wird, ist Acetyl-Coenzym A (AcCoA). Strukturell handelt es sich bei AcCoA um ein mit Essigsäure verestertes CoA-Derivat. Es ist bekannt, dass sich AcCoA hydrolytisch zersetzt^{108,109}. AcCoA ist im neutralen bis schwach sauren Milieu stabil, zersetzt sich jedoch in stark sauren und basischen Lösungen. Zur Untersuchung der Stabilität von AcCoA im hier verwendeten schwach basischen Milieu (pH 8,0) werden im Folgenden zeitaufgelöste Messungen (siehe Kapitel 6.9.7 *Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen*) mit Hilfe der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt. Dies soll eine exakte Bestimmung der Kinetik zur Zersetzung von AcCoA im gleichen Zeitrahmen der später folgenden enzymatischen Reaktionen ermöglichen. Nachfolgend sind entsprechend die zur Stabilitätsbestimmung von AcCoA erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Messungen dargestellt.

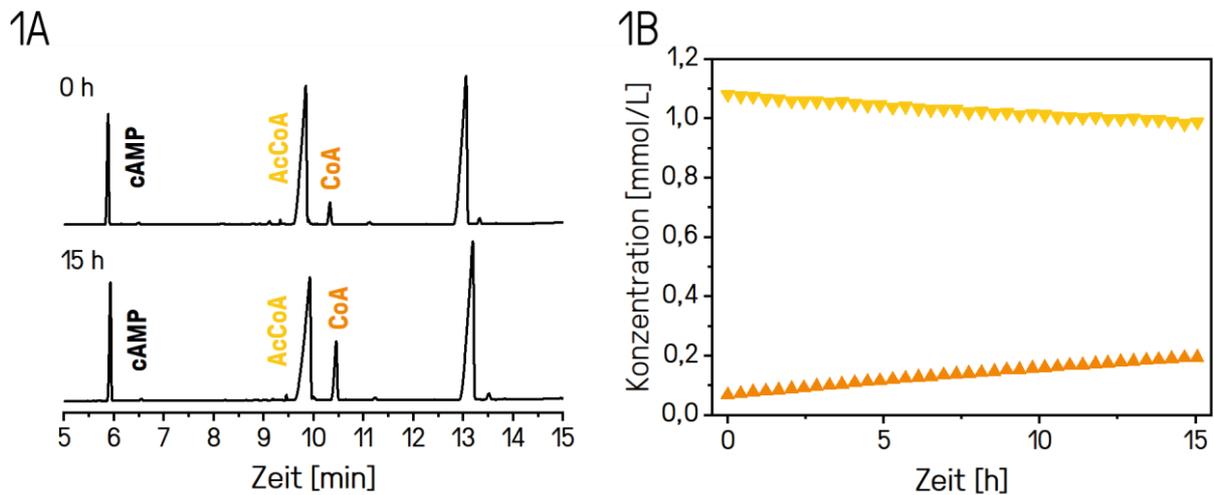


Abbildung 17: Stabilität von AcCoA. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) und zeitaufgelöste Messung (Kapitel 6.9.7) von CoA (▲) und AcCoA (▼) (1B) in der standardmäßigen Reaktions-Referenz.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h zur Stabilitätsmessung von AcCoA (1A) zeigen neben dem AcCoA-Peak einen CoA-Peak, wobei nach 15 h der CoA-Peak größer ist als bei 0 h. Die Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der AcCoA Konzentration und eine kontinuierliche Zunahme der CoA Konzentration erkennen. Die Konzentration von AcCoA hingegen bleibt über den gesamten Zeitraum konstant. Insgesamt beträgt die Abnahme von AcCoA über den gesamten Zeitraum ca. 9 %. Eine äquivalente Konzentrationszunahme lässt sich bei CoA feststellen. Weiterhin lässt sich vermuten, dass abgesehen von CoA ebenfalls eine äquimolare Menge an Acetat entsteht ²⁶.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass AcCoA über einen Zeitraum von 15 h bei einer Temperatur von 25 °C im Standard Reaktions-Mix ohne Enzyme zu einem signifikanten Anteil von 9 % in CoA zerfällt. Allerdings scheint in Gegenwart von AcCoA im Edukt-Mix bereits ein geringer Anteil von CoA vorzuliegen. Der Zersetzung von AcCoA zu CoA lässt sich unter den definierten Reaktionsbedingungen nicht vermeiden. Um dennoch den Einfluss der Hydrolyse von AcCoA zu CoA während der später folgenden enzymatischen Reaktionen abschätzen zu können, wird zu Beginn und zu Ende jeder zeitaufgelösten Reaktion eine Reaktions-Referenz (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) gemessen. Die Referenz ist abgesehen von der Abwesenheit der Enzyme identisch zum Reaktions-Mix und wird ebenso identisch behandelt.

3.3.4 Adenosintriphosphat

Der letzte zu untersuchende Reaktand, der bei den enzymatischen Reaktionen eingesetzt wird, ist Adenosintriphosphat (ATP). Strukturell handelt es sich dabei um ein Nukleotid bestehend aus Adenin, einem Zucker (Ribose) und drei Phosphatresten. Es ist bekannt, dass sich ATP hydrolytisch zu ADP, AMP und anorganischen Phosphaten zersetzt¹¹⁰⁻¹¹². Zur Untersuchung der Stabilität von ATP im hier verwendeten schwach basischen Milieu (pH 8,0) werden im Folgenden zeitaufgelöste Messungen (siehe Kapitel 6.9.7 *Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen*) mit Hilfe der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt. Dies soll eine exakte Bestimmung der Kinetik zur Zersetzung von ATP im gleichen Zeitrahmen der später folgenden enzymatischen Reaktionen ermöglichen. Nachfolgend sind entsprechend die zur Stabilitätsbestimmung von ATP erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Messungen dargestellt.

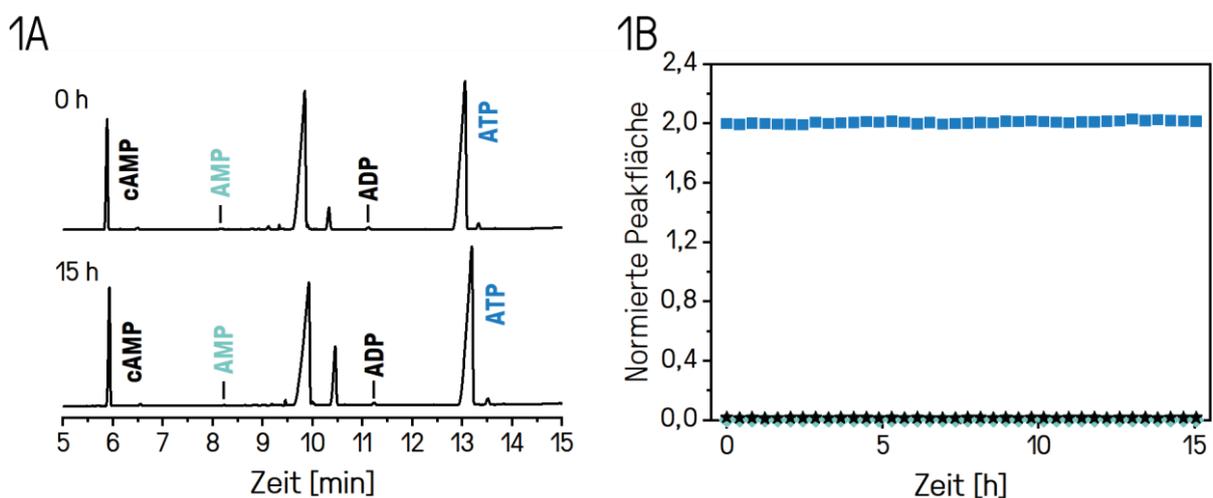


Abbildung 18: Stabilität von ATP. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) und zeitaufgelöste Messung (Kapitel 6.9.7) von AMP (◆), ADP (★) und ATP (■) (1B) in der standardmäßigen Reaktions-Referenz ohne Enzyme. Darstellung von normierten und zeitkorrigierten Peakflächen (Peakflächenverhältnis Analyt zu internem Standard cAMP).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h zur Stabilitätsmessung von ATP (1A) zeigen neben dem ATP-Peak einen ADP- und AMP-Peak, wobei nach 15 h keiner der Peaks kleiner oder größer ist als bei 0 h. Die Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich keine Abnahme der ATP Konzentration oder Zunahme der ADP- oder AMP Konzentration erkennen. Die Konzentration von ATP bleibt über den gesamten Zeitraum konstant.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass ATP über einen Zeitraum von 15 h bei einer Temperatur von 25 °C im Standard Reaktions-Mix ohne Enzyme nicht zerfällt. Allerdings scheinen in Gegenwart von ATP im Edukt-Mix bereits geringe Anteile von ADP und AMP vorzuliegen. Um dennoch den Einfluss potenziell auftretender Hydrolyse von ATP zu ADP und AMP während der später folgenden enzymatischen Reaktionen nachverfolgen zu können, wird zu Beginn und zu Ende jeder zeitaufgelösten Reaktion eine Reaktions-Referenz (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) gemessen. Die Referenz ist abgesehen von der Abwesenheit der Enzyme identisch zum Reaktions-Mix und wird ebenso identisch behandelt.

3.4 Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme

Die in dieser Arbeit herzustellenden Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA, den so genannten *building blocks*, werden auf Basis enzymatisch katalysierter zellfreier Reaktionen produziert. Die verwendeten Enzyme Malonyl-CoA Synthetase Y3K-deGFP MatB (MalCoA Synthese), Malonyl-CoA Decarboxylase Y3K-mRuby MatA (AcCoA Synthese) und Citratsynthase Y3K-eBFP CitZ (CoA Recycling/Citrat Produktion) wurden freundlicherweise im Rahmen des Leibniz-Research-Clusters (LRC) Projekts von Dr. Sandra Hoefgen und Dr. Vito Valiante vom Leibniz-Institut für Naturstoff Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI) (Jena, Deutschland) bereitgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit werden die vollständigen Enzym-Namen zur besseren Lesbarkeit mit MatB, MatA und CitZ abgekürzt. Da die Eigenschaften und die Nutzbarkeit der Enzyme bislang nicht näher untersucht wurden, wird im folgenden Kapitel schwerpunktmäßig auf die Charakterisierung der Enzyme und ihrer Reaktionen eingegangen. Besonderes Augenmerk gilt dabei der Nutzbarkeit, der Spezifität und der Kinetik der Enzymreaktionen von MatB, MatA und CitZ. Konkret werden dabei wie in den vorherigen Kapiteln zeitaufgelöste Messungen an Enzym-Reaktionen mit Hilfe der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt. Mit dieser sollen Erkenntnisse über die Kinetik der enzymatischen Reaktionen gewonnen werden, die eine spätere kinetische Modellierung eines solchen enzymtechnologischen Prozesses ermöglichen soll. Dabei kann vor allem die Wirtschaftlichkeit solcher Reaktionssysteme evaluiert und in seiner Auslegung hinsichtlich der Reaktionsbedingungen verbessert werden. Darüber hinaus lassen sich während der Enzym-Reaktionen auftretende Problematiken wie Reaktionsungleichgewichte, Substratlimitierungen oder zeitabhängige Bildung Nebenprodukten besser auflösen und gegebenenfalls Anpassungen durchführen. Die Verwendung von kapillarelektrophoretisch zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen konnte bereits mehrfach in geringeren Umfängen hinsichtlich simultaner Auflösung von Multienzymreaktionen, Automatisierungsgrad der Messmethode, Größe und Zyklisierungsfähigkeit des enzymatischen Reaktionssystems erfolgreich demonstriert werden^{98,113–115}. Drei Review Artikel sind aufgrund ihrer herausragenden Relevanz und ihres Umfangs dabei von besonderer Bedeutung^{58,59,116}. Daher werden in den folgenden Kapiteln

zunächst die Reaktionen der einzelnen Enzyme, anschließend enzymatische Reaktionskaskaden untersucht und der Mehrwert im Hinblick auf die neuartige Methodik zur Charakterisierung von Enzymreaktionen evaluiert.

Der standardmäßige Edukt-Mix (siehe Kapitel 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen*) besteht dabei, wenn nicht anderweitig angegeben, aus einem der drei etwa 1 mM Cofaktoren CoA, MalCoA oder AcCoA, 0,5 mM cAMP, 1 mM ATP, 1 mM NaMal, 5 mM OxAc, 1 mM TCEP und GEFI, wobei die Konzentrationen durch Zugabe der Enzyme im Reaktions-Mix (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) final erreicht werden. Die erhaltenen Enzyme liegen präparationsbedingt in aus 20 mM TRIS und 150 mM NaCl bestehenden Gelfiltrationspuffer (GEFI) bei pH 8,0 vor. Da sich der Gelfiltrationspuffer als Standardpuffer der Enzyme bewährt hat, wurde dieser ebenfalls als Reaktionspuffer für die enzymatischen Reaktionen verwendet. Durch eine Reihe von Vorversuchen wurden zudem die nutzbaren Konzentrationen der Enzyme abgeschätzt, wobei Materialaufwand hinsichtlich der Enzymmenge und messtechnischer Auflösbarkeit des Umsatzes der Reaktionen bei einer Reaktionszeit von 15 h bei 25 °C gegeneinander abgewägt wurden. Dabei wurde eine Standard-Konzentration für MatB von 0,0125 mg/mL, für MatA von 0,00125 mg/mL und für CitZ von 0,0125 mg/mL festgelegt (siehe Kapitel 6.9.2 *Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen*). Der Kompromiss aus langen Reaktionszeiten und geringen Enzymmengen ermöglicht dabei eine gute Zeitauflösung der Reaktionen mit Hilfe der Standard CZE-UV/Vis Methode bei gleichzeitig geringen Enzymeinsatz. Eine spätere Neuskalierung der Reaktionen hinsichtlich Enzym-Konzentration und Reaktionszeit unter Einbezug der gewonnenen Erkenntnisse dieser Untersuchungen wird dadurch deutlich erleichtert. Unter den genannten Bedingungen wurden zeitaufgelöste Enzymreaktionen (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) durchgeführt und im Folgenden dargestellt.

3.4.1 Reaktion von MatB

Zunächst wurde das Enzym Malonyl-CoA Synthetase MatB untersucht. MatB katalysiert die Bildung von Malonyl-Coenzym A (MalCoA) ausgehend von Natrium Malonat (NaMal) und Coenzym A (CoA) unter der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) und freiem Phosphat (P) ²²⁻²⁴. Nachfolgend sind entsprechend die für die Reaktion von MatB erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen dargestellt.

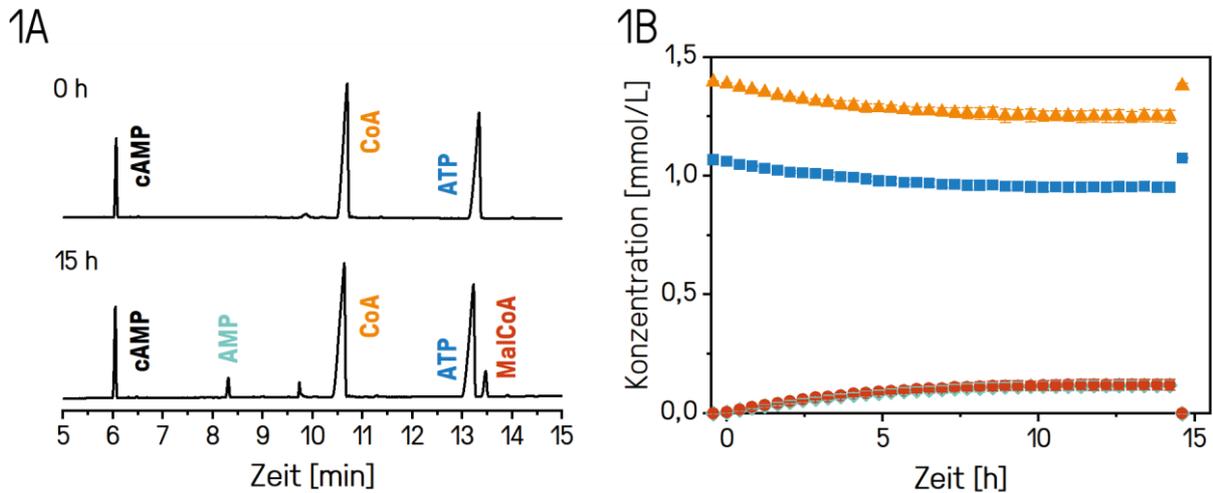


Abbildung 19: Enzym-Reaktion von MatB. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) zur zeitaufgelösten Enzym-Reaktion (Kapitel 6.9.5) von MatB (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion erfolgte als Triplikat. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲) und MalCoA (●).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von MatB (1A) zeigen neben den zwei Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzlich zwei Produkt-Peaks von MalCoA und AMP am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche, äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine kontinuierliche, äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration erkennen. Die Abnahme der CoA- und ATP Konzentration lässt sich im Rahmen der Fehlergenauigkeit in der Zunahme der AMP und MalCoA Konzentration wiederfinden. Insgesamt beträgt der erzielte Umsatz von CoA zu MalCoA über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix ca. 10 %. Zudem lässt sich vermuten, dass abgesehen von CoA und ATP ebenfalls NaMal verbraucht und neben MalCoA und AMP auch freies Phosphat freigesetzt wurde. Weiterhin kann kein Nebenprodukt mit der Standard CZE-UV/Vis Methode nachgewiesen werden. Ein potenzielles und literaturbekanntes Nebenprodukt stellt Malonyl-AMP dar, welches als Intermediat bei der enzymatischen MalCoA Synthese entsteht^{23,117}. Ob tatsächlich kein Malonyl-AMP vorhanden ist, lässt sich nicht endgültig klären. Denkbar wären z.B. weitere Analysen mittels CE-MS zur Aufklärung dieses Sachverhaltes. Gegen das Vorhandensein sprechen allerdings die Stoffmengenbilanzen der Reaktion, die hier im Rahmen der Fehlergenauigkeit ausgeglichen sind. Entsprechend scheint die Spezifität von MatB zur Katalyse der Reaktion von CoA zu MalCoA unter der Hydrolyse von ATP zu AMP hoch zu sein. Gleiches gilt für die Nutzbarkeit von MatB zur Produktion von MalCoA, wenn auch die Umsätze in dem vorliegenden Fall gering sind. Die Umsatzraten von MatB lassen sich zu einem späteren Zeitpunkt durch Erhöhung der Temperatur, Optimierung des Puffers, des pH-Wertes und der Enzym-Konzentration verbessern. Darüber hinaus folgt die Abschätzung der Aktivität der Enzyme gesondert

in dieser Arbeit (siehe 3.6.2 Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme). Eine Problematik, die sich allerdings aus den geringen Umsätzen ergibt ist, dass die Frage nach einer möglichen AMP/ATP-konkurrierenden Produkthemmung²³ unbeantwortet bleibt. Anhand der zeitaufgelösten Enzym-Reaktion lässt sich ein Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Reaktion erkennen, obwohl die Edukte im Überschuss vorliegen. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Produkthemmung darstellen, welche die Reaktionsgeschwindigkeit reduzieren und vollständige Umsätze vermeiden würden. Dies wäre ein Nachteil im Rahmen einer technischen Anwendung zur Produktion von MalCoA mit Hilfe von MatB. Eine Möglichkeit eine Produkthemmung zu umgehen, ist der Abbau des hemmenden Produktes^{78,82,83,118}. Dies könnte beispielsweise die kontinuierliche Abtrennung der Produkte AMP und MalCoA mittels Free-Flow-Elektrophorese (FFE) (siehe Kapitel 5.2 *Präparative Reinigung von enzymatischen Reaktionsmatrices mittels FFE*) in einem Durchflusssystem oder durch das Enzym Malonyl-CoA Decarboxylase MatA bei der Produktion von AcCoA ermöglicht werden (siehe Kapitel 3.4.2 *Reaktion von MatA*).

3.4.2 Reaktion von MatA

Das zweite zu untersuchende Enzym ist die Malonyl-CoA Decarboxylase MatA. MatA katalysiert die Bildung von Acetyl-Coenzym A (AcCoA) ausgehend von MalCoA durch Abspaltung von Kohlendioxid (CO₂)²⁵. MatA kann entsprechend das von MatB produzierte MalCoA zur Produktion von AcCoA nutzen. Nachfolgend sind entsprechend die für die Reaktion von MatA erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen dargestellt.

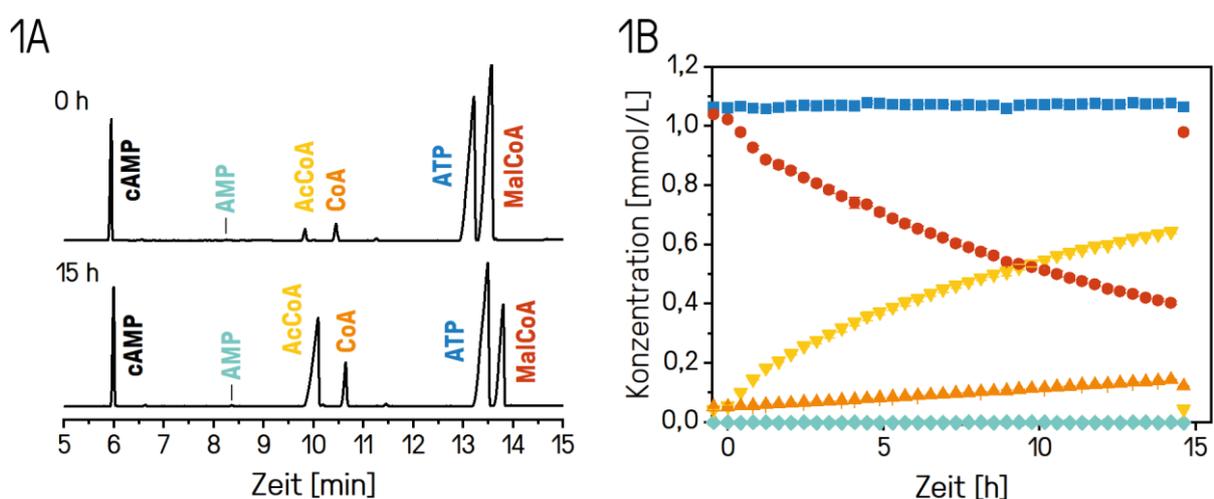


Abbildung 20: Enzym-Reaktion von MatA. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) zur zeitaufgelösten Enzym-Reaktion (Kapitel 6.9.5) von MatA (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion erfolgte als Triplikat. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von MatA (1A) zeigen neben dem Edukt-Peak von MalCoA zu Beginn der Reaktion zusätzlich einen Produkt-Peak von AcCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der MalCoA Konzentration und eine kontinuierliche Zunahme der AcCoA Konzentration erkennen. Die Abnahme der MalCoA Konzentration lässt sich im Rahmen der Fehlergenauigkeit in der Zunahme der AcCoA und Hydrolyse bedingt in der CoA Konzentration wiederfinden. Insgesamt beträgt der erzielte Umsatz von MalCoA zu AcCoA über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix ca. 60 %. Zudem lassen sich das im Reaktions-Mix befindliche ATP und die aus den Stammlösungen von ATP und MalCoA stammenden Verunreinigungen AMP, AcCoA und CoA (siehe Kapitel 3.3 *Stabilität der Reaktanden*) nachweisen. Zudem ist die Konzentration von ATP und AMP entsprechend den Erwartungen über den gesamten Reaktions-Zeitraum konstant (siehe Kapitel 3.3.4 *Adenosintriphosphat*). Darüber hinaus lässt sich anhand der Elektropherogramme erkennen, dass die Peakfläche von CoA zum Ende der Reaktion größer ist als zu Beginn der Reaktion. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der CoA Konzentration. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse zur Stabilität von MalCoA und AcCoA (siehe Kapitel 3.3 *Stabilität der Reaktanden*) kann davon ausgegangen werden, dass CoA durch den hydrolytischen Zerfall von MalCoA und AcCoA entstanden ist. Zudem lässt sich vermuten, dass abgesehen von AcCoA auch Kohlendioxid durch die Reaktion freigesetzt wurde. Weiterhin kann kein Nebenprodukt mit der Standard CZE-UV/Vis Methode nachgewiesen werden. Entsprechend scheint die Spezifität von MatA zur Katalyse der Reaktion von MalCoA zu AcCoA unter der Abspaltung von Kohlendioxid hoch zu sein. Gleiches gilt für die Nutzbarkeit von MatA zur Produktion von MalCoA. Die Umsätze von MatA sind um ein sechsfaches höher als die Umsätze von MatB, obwohl die Konzentration von MatA nur ein Zehntel der Konzentration von MatB entspricht. MatA scheint im Vergleich zu MatB eine höhere Aktivität zu zeigen. Die Abschätzung der Aktivität der Enzyme folgt gesondert in dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.6.2 *Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme*). Da keine Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten und die Umsätze bei vergleichsweise niedriger Enzym-Konzentration hoch sind kann von einer hohen Spezifität und Nutzbarkeit ausgegangen werden. Ähnlich zu den Ergebnissen zur Charakterisierung von MatB lässt sich die Frage nach einer möglichen Produkthemmung an dieser Stelle nicht aufklären. Anhand der zeitaufgelösten Enzym-Reaktion lässt sich ein Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Reaktion erkennen. Es ist jedoch nicht ersichtlich, ob dies an der statistisch betrachtet geringeren Verfügbarkeit an Edukt liegt oder an einer Hemmung des Enzyms. Es ist nicht ersichtlich, ob eine vollständige Umsetzung möglich ist oder ob die Reaktion vorzeitig stagniert. Günstig ist jedoch, dass Kohlendioxid als eines der Produkte durch die umgebene Lösung aufgenommen bzw. darüber an die Umgebungsluft abgegeben werden kann und damit das Gleichgewicht der Reaktion zur Produktseite verschoben werden könnte. Grundsätzlich wäre eine Produkthemmung ein Nachteil im

Rahmen der technischen Anwendung zur Produktion von AcCoA mit Hilfe von MatA. Eine Möglichkeit eine Produkthemmung zu umgehen, ist der Abbau des hemmenden Produktes. Dies könnte beispielsweise durch die kontinuierliche Abtrennung des Produktes AcCoA mittels Free-Flow-Elektrophorese (FFE) (siehe Kapitel 5.2 *Präparative Reinigung von enzymatischen Reaktionsmatrices mittels FFE*) in einem Durchflusssystem, durch die weitere enzymatische Umsetzung von AcCoA zu potenziellen Polyketiden oder durch das Enzym Citratsynthase CitZ bei der Produktion von CoA und Citrat ermöglicht werden.

3.4.3 Reaktion von CitZ

Das letzte zu untersuchende Enzym ist die Citrat-Synthase CitZ. CitZ katalysiert die Bildung von CoA und Citrat ausgehend von AcCoA und Oxalessigsäure ²⁶. CitZ kann entsprechend das von MatA produzierte AcCoA zur Produktion von CoA und Citrat nutzen. Nachfolgend sind entsprechend die für die Reaktion von CitZ erhaltenen Elektropherogramme und zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen dargestellt.

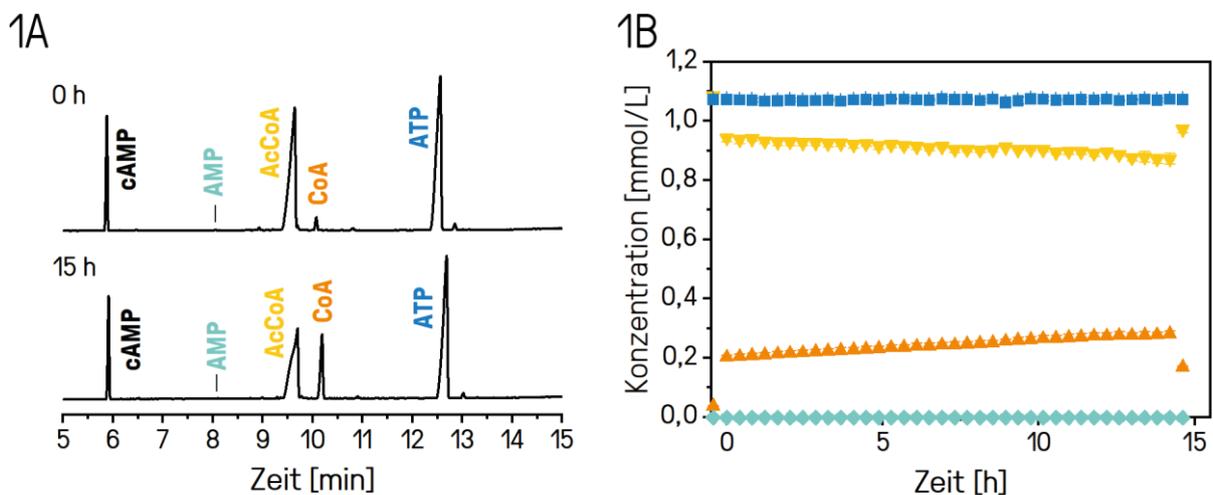


Abbildung 21: Enzym-Reaktion von CitZ. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) zur zeitaufgelösten Enzym-Reaktion (Kapitel 6.9.5) von CitZ (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion erfolgte als Triplikat. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von CitZ (1A) zeigen neben dem Edukt-Peak von AcCoA zu Beginn der Reaktion einen vergrößerten Produkt-Peak von CoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich zunächst eine sprunghafte Abnahme von AcCoA und Zunahme von CoA, gefolgt von einer langsamen kontinuierlichen Abnahme der AcCoA Konzentration und einer langsamen kontinuierlichen

Zunahme der CoA Konzentration erkennen. Insgesamt beträgt der erzielte Umsatz von AcCoA zu CoA über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix ca. 20 %. Zudem lassen sich das im Reaktions-Mix befindliche ATP und die aus den Stammlösungen von ATP und AcCoA stammenden Verunreinigungen AMP und CoA (siehe Kapitel 3.3 *Stabilität der Reaktanden*) nachweisen. Die Konzentration von ATP und AMP ist entsprechend den Erwartungen über den gesamten Reaktions-Zeitraum konstant (siehe Kapitel 3.3.4 *Adenosinriphosphat*). Auffällig an dieser Stelle ist allerdings der zunächst sprunghafte Abfall der AcCoA Konzentration und der gleichermaßen sprunghafte Anstieg der CoA Konzentration. Es wird vermutet, dass der sprunghafte Anstieg auf die Reaktion von CitZ und der langsame kontinuierliche Anstieg auf die Hydrolyse von AcCoA zurückzuführen ist. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse zur Stabilität von AcCoA (siehe Kapitel 3.3.3 *Acetyl-Coenzym A*) kann davon ausgegangen werden, dass CoA durch den hydrolytischen Zerfall von AcCoA entstanden ist. Allerdings ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht aufklären, warum die Reaktion von CitZ nach dem sprunghaften Anstieg scheinbar stagniert ist. Zum einen könnte CitZ durch das Produkt CoA oder Citrat gehemmt oder für die Reaktion notwendige Edukte aufgebraucht sein. Da jedoch nachweislich ausreichend AcCoA vorhanden ist liegt die Vermutung nahe, dass eine Problematik hinsichtlich der Oxalessigsäure Konzentration vorliegt. Eine Klärung dieser Problematik erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ*). Zudem lässt sich vermuten, dass abgesehen von CoA auch eine äquimolare Menge an Citrat durch die Reaktion freigesetzt wurde²⁶. Weiterhin kann kein Nebenprodukt mit der Standard CZE-UV/Vis Methode nachgewiesen werden. Entsprechend scheint die Spezifität von CitZ zur Katalyse der Reaktion von AcCoA und Oxalessigsäure zu CoA und Citrat hoch zu sein. Die Nutzbarkeit von CitZ zur Produktion von CoA und Citrat muss weitreichender untersucht werden, da nicht abschließend geklärt ist, inwieweit mit Hilfe von CitZ hohe Umsätze erzielt werden können. Der beobachtete sprunghafte Anstieg und Abfall von AcCoA und CoA gibt jedoch einen ersten Hinweis auf eine hohe Aktivität von CitZ. Die Abschätzung der Aktivität der Enzyme folgt gesondert dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.6.2 *Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme*). Ein Vergleich der Umsätze zu den Enzymen MatB und MatA lässt sich aufgrund der beschriebenen Problematik der scheinbar plötzlich stagnierenden Reaktion nicht durchführen. Die Aufklärung der Problematik erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ*). Ähnlich zu den Untersuchungen von MatB und MatA lässt sich die Frage nach einer möglichen Produkthemmung an dieser Stelle nicht aufklären. Es ist nicht ersichtlich, ob eine vollständige Umsetzung möglich ist oder ob die Reaktion vorzeitig stagniert. Grundsätzlich wäre eine Produkthemmung ein Nachteil im Rahmen der technischen Anwendung zur Produktion von CoA und Citrat mit Hilfe von CitZ. Eine Möglichkeit eine Produkthemmung zu umgehen, ist der Abbau des hemmenden Produktes. Dies könnte beispielsweise durch die kontinuierliche Abtrennung der Produkte CoA und Citrat mittels Free-Flow-Elektrophorese (FFE) (siehe Kapitel 5.2 *Präparative Reinigung von enzymatischen Reaktionsmatrices*

mittels FFE) in einem Durchflusssystem oder durch die weitere enzymatische Umsetzung dieser Produkte ermöglicht werden.

3.4.4 Reaktion von MatB/MatA/CitZ

Ziel dieser Arbeit ist es, ein enzymatisches zellfreies Reaktionssystem auf der Basis eines Recyclings von CoA zur Produktion von Polyketid-Grundbausteinen und Polyketiden aufzubauen. Unerlässlich zur Erreichung dieses Zieles ist neben der zuvor nachgewiesenen Spezifität und Nutzbarkeit der Enzyme MatB, MatA und CitZ zur katalytischen Produktion von MalCoA, AcCoA, CoA und Citrat die Möglichkeit zur Durchführung flexibler, kaskadierter Enzym-Reaktionen. Die Flexibilität des Reaktions-Systems ist vor allem deshalb wichtig, um je nach gewünschten Zielmolekül, seien es Polyketid-Grundbausteine oder darauf aufbauende Polyketide, in der Lage zu sein das Reaktions-System mit geringem Aufwand anpassen zu können. Eine Möglichkeit zur Untersuchung und Demonstration dieser Flexibilität und Nutzbarkeit des Reaktions-Systems ist es, die Enzyme MatB, MatA und CitZ gleichzeitig in einem Reaktions-Ansatz einzubringen und eine zyklische, enzymatische Reaktionskaskade zu etablieren bei dem jeweils nur einer der drei Cofaktoren CoA, MalCoA oder AcCoA hinzugegeben wird. Dadurch werden im Idealfall gleich mehrere Potenziale eines solchen Reaktions-Systems aufgezeigt: 1. Das Reaktions-System ist insofern flexibel, dass es sich an jedem Schritt modifizieren lässt. 2. Das Reaktions-System ermöglicht neben der hochspezifischen Produktion eines Zielmoleküls auch 3. ein ressourcenschonendes und kosteneffektives Recycling des kostenintensiven Ausgangsstoffes CoA. Entsprechend wurden zeitaufgelöste Enzym-Reaktionen mit MatB, MatA und CitZ in drei verschiedenen Reaktions-Mixen mit jeweils einem der drei Cofaktoren CoA, MalCoA oder AcCoA durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

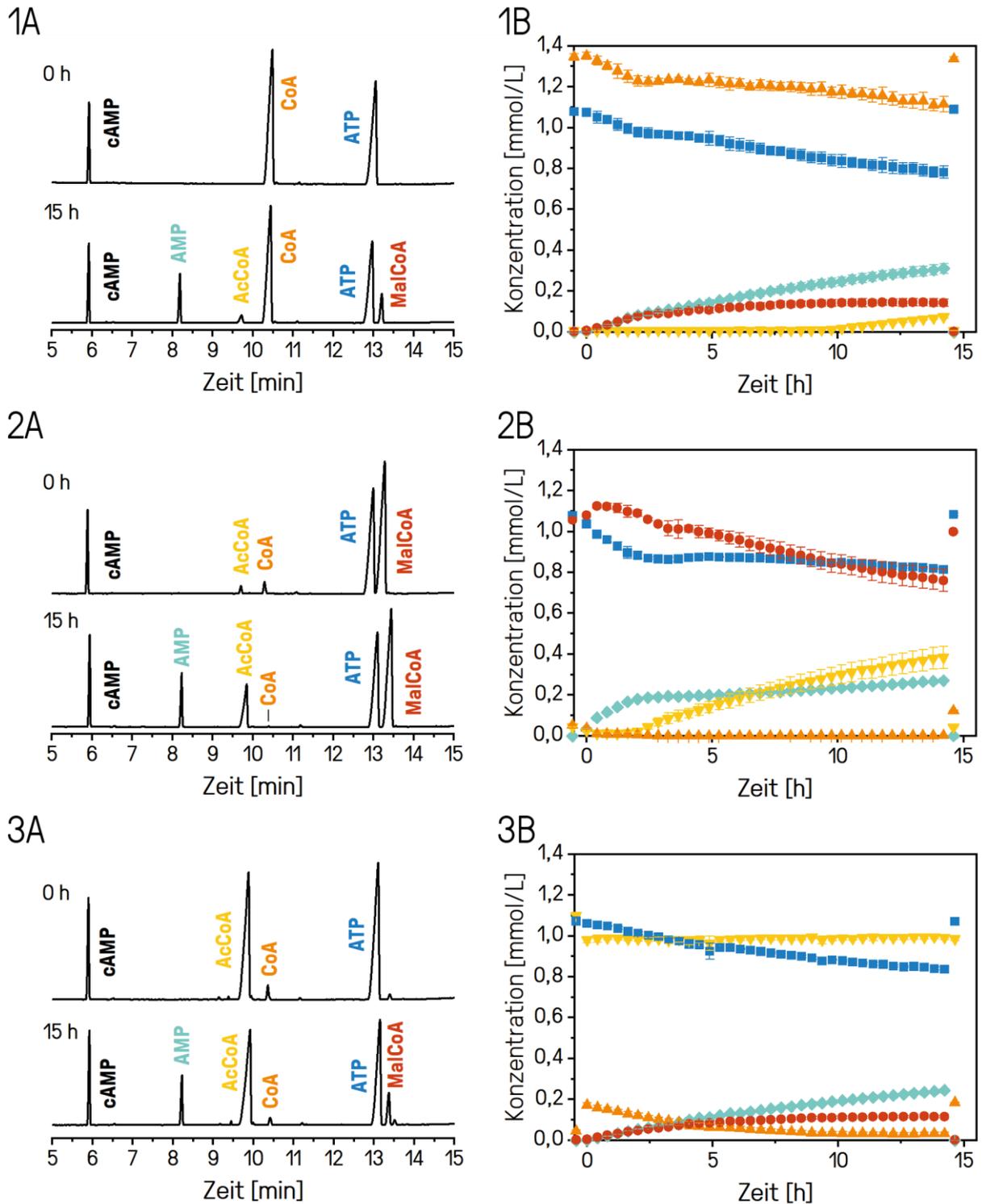


Abbildung 22: Enzym-Reaktionen von MatB/MatA/CitZ. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A, 2A, 3A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen (Kapitel 6.9.5) von MatB/MatA/CitZ mit den Cofaktoren CoA (1B), MalCoA (2B) und AcCoA (3B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen erfolgten als Triplikate. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ mit dem Cofaktor CoA (1A) zeigen neben den Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP, MalCoA und AcCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration erkennen. Ab einer Reaktionszeit von ca. 2,5 h divergieren die Konzentrationsverläufe sowohl von CoA und ATP als auch von AMP und MalCoA. Zudem ist die Konzentration von AcCoA zunächst konstant, steigt jedoch ab einer Reaktionszeit von 10 h instantan an. Die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion erfolgt anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktion bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP von 29 % erreicht. Erklären lassen sich die Beobachtungen damit, dass zunächst hauptsächlich MatB die Reaktion von CoA und ATP zu MalCoA und AMP katalysiert. Mit steigender MalCoA Konzentration erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus von MalCoA durch MatA. Entsprechend wird AMP kontinuierlich aufgebaut, während ein Teil des produzierten MalCoA durch MatA abgebaut wird. Entsprechend lassen sich die divergierenden Konzentrationsverläufe erklären. Allerdings lässt sich eine Konzentrationszunahme von AcCoA erst ab einer Reaktionszeit von 10 h feststellen. Möglicherweise werden bereits geringste Mengen an AcCoA sofort durch CitZ zu CoA umgesetzt. Der anschließende Anstieg der AcCoA Konzentration kann zwei Ursachen haben. Entweder ist die Umsetzung von MalCoA zu AcCoA durch MatA schneller als der Abbau von AcCoA zu CoA durch CitZ oder die Reaktion von AcCoA zu CoA durch CitZ stoppt, wie es bereits bei den zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen zu CitZ beobachtet wurde. Anhand der nicht-äquimolaren Abnahme der Konzentration von CoA und ATP lässt sich zudem das Recycling von CoA erkennen. Es wird weniger CoA verbraucht als ATP, obwohl die Reaktion äquimolar verläuft. Grund dafür ist, dass bei der von CitZ katalysierten Umsetzung von AcCoA recyceltes CoA entsteht. Entsprechend lässt sich bei der enzymatischen Reaktion von MatB/MatA/CitZ bei Zugabe von CoA ein zyklisches Reaktions-System nachweisen.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ mit dem Cofaktor MalCoA (2A) zeigen neben den Edukt-Peaks von MalCoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP, CoA und AcCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (2B) bestätigt. Dabei lässt sich nach einem kurzen Anstieg eine kontinuierliche Abnahme der MalCoA Konzentration und nach etwa 2,5 h eine kontinuierliche Zunahme der AcCoA Konzentration erkennen. Die zu Beginn der Reaktion vorliegende CoA Konzentration sinkt zügig und verbleibt anschließend im niedrigen Konzentrationsbereich. Die Konzentration von ATP sinkt und die Konzentration von AMP steigt innerhalb der ersten 2,5 h zunächst

zügig an. Beide Konzentrationsverläufe flachen anschließend ab. Dabei verhalten sich die Konzentrationsverläufe von ATP und AMP exakt gegenläufig. Die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion erfolgt anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktion bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP von 25 % erreicht. Erklären lassen sich die Beobachtungen damit, dass MatB zunächst vorhandenes CoA abbaut und MalCoA produziert, wodurch die Konzentration von MalCoA kurzzeitig ansteigt. MatA setzt vorhandenes MalCoA zu AcCoA um, welches scheinbar von CitZ und MatB erneut zügig zu MalCoA umgesetzt werden. Wie auch zuvor bei der Verwendung des Cofaktors CoA beobachtet, akkumuliert AcCoA ab einer Reaktionszeit von 2,5 h. Dies ist der gleiche Zeitpunkt, bei dem der zunächst zügig ansteigende Konzentrationsverlauf von AMP deutlich abflacht. In diesem Fall scheint es, als würde kein CoA mehr von CitZ produziert werden, welches MatB wiederum als Substrat nutzen kann. MatB setzt in diesem Fall scheinbar ausschließlich das durch die Hydrolyse von MalCoA und AcCoA entstehende CoA unter Verbrauch und Bildung von ATP und AMP um. Entsprechend scheint der Zyklus nahezu zum Erliegen zu kommen. Auch bei der enzymatischen Reaktion von MatB/MatA/CitZ bei Zugabe von MalCoA lässt sich ein zyklisches Reaktions-System nachweisen, welches scheinbar durch CoA bedingt durch eine stagnierende Umsetzung von AcCoA zu CoA durch CitZ limitiert ist.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ mit dem Cofaktor AcCoA (3A) zeigen neben den Edukt-Peaks von AcCoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP, CoA und MalCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (3B) bestätigt. Dabei lässt sich zunächst eine sprunghafte Abnahme der AcCoA Konzentration und eine sprunghafte Zunahme der CoA Konzentration erkennen. Anschließend ist die Konzentration von AcCoA konstant, wohingegen die Konzentration von CoA kontinuierlich sinkt. Die Konzentration von ATP sinkt und die Konzentration von AMP steigt kontinuierlich. Die Konzentrationsverläufe von AMP und MalCoA steigen zunächst äquimolar an, divergieren jedoch nach einer Reaktionszeit von ca. 2,5 h. Die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion erfolgt anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktion bezogen auf Reaktion von ATP zu AMP von 23 % erreicht. Die hier gemachten Beobachtungen entsprechen den bereits zuvor gewonnenen Erkenntnissen. CitZ setzt innerhalb der ersten Minuten ca. 10 % des vorliegenden AcCoA zu CoA um. Entsprechend steigt die Konzentration von CoA gleichermaßen sprunghaft an. Anschließend wird das vorhandene CoA in Gegenwart von ATP durch MatB zu MalCoA und AMP umgesetzt. Der zunächst äquimolare Anstieg der AMP und MalCoA Konzentration wird durch das Umsetzen von MalCoA zu AcCoA durch MatA gestört. Insgesamt scheint auch hier der Zyklus durch die CoA Konzentration aufgrund des geringen Umsatzes von AcCoA zu CoA durch CitZ limitiert.

Den höchsten Gesamtumsatz bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP wird bei der Verwendung des Cofaktors CoA (29 %) erzielt. Dies entspricht aufgrund der höchsten für die Reaktion von MatB notwendigen CoA Konzentration zu Beginn der Reaktion den Erwartungen. Die Umsätze bei der Verwendung des Cofaktors MalCoA (25 %) und AcCoA (23 %) sind aufgrund der limitierten CoA Konzentration geringer.

Da die zyklische Reaktion für das Recycling von CoA einen hohen Stellenwert hinsichtlich ökonomischer Faktoren besitzt, wurde die Standard CZE-UV/Vis Methode nochmals konkret in Bezug zur Genauigkeit der Erfassung der zyklischen Reaktion validiert. Dazu wurden die Wiederfindungsraten der Substanz-Klassen bestehend aus AMP/ATP als auch aus CoA/MalCoA/AcCoA für jeden bestimmten Reaktionszeitpunkt berechnet. Dazu wurden die Konzentrationen der Einzelsubstanzen bestimmt, für die jeweiligen Klassen aufsummiert und auf die Summenkonzentration der jeweiligen Klasse der ersten Referenz Messung (100 %) normiert. Die erhaltenen Wiederfindungsraten über die gesamte Reaktionszeit von 15 h bei 25 °C der Substanz-Klassen AMP/ATP und CoA/MalCoA/AcCoA für die zuvor mit MatB/MatA/CitZ unter Verwendung einer der drei Cofaktoren CoA, MalCoA oder AcCoA durchgeführten Reaktionen sind nachfolgend dargestellt.

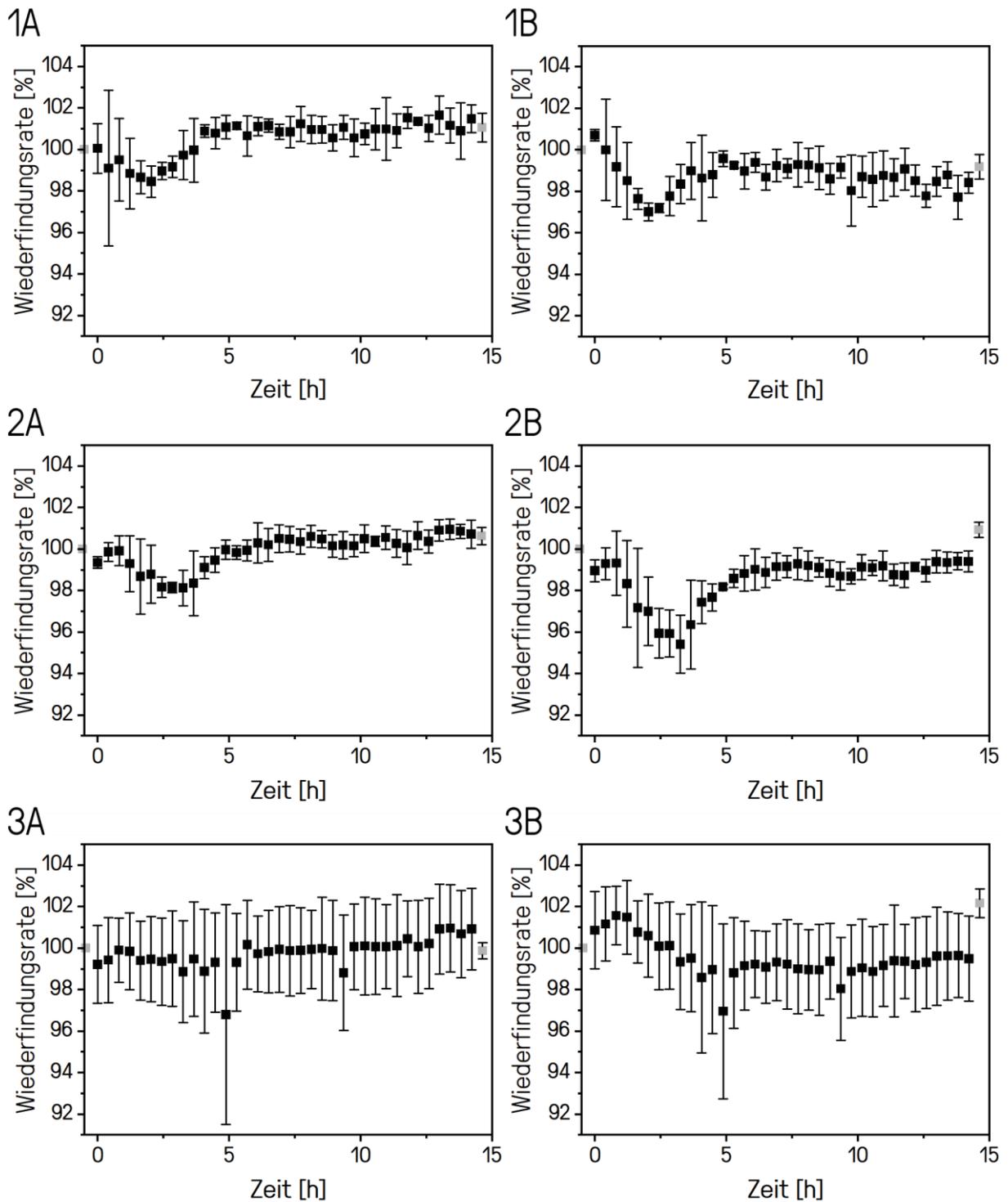


Abbildung 23: Wiederfindungsraten der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von MatB/MatA/CitZ. Zu jeder Messung wurde die Konzentrationen der Einzelsubstanzen bestimmt, für die jeweiligen Klassen aufsummiert und auf die Summenkonzentration der jeweiligen Klasse der ersten Referenz Messung (100 %) normiert. Darstellung der Wiederfindungsraten der Substanz-Klasse AMP/ATP bei der Durchführung der Reaktion mit dem Cofaktor CoA (1A), MalCoA (2A) und AcCoA (3A). Darstellung der Wiederfindungsraten der Substanz-Klasse CoA/MalCoA/AcCoA bei der Durchführung der Reaktion mit dem Cofaktor CoA (1B), MalCoA (2B) und AcCoA (3B). Alle Messungen wurden als Triplikat durchgeführt und Mittelwerte und Standardabweichungen der Wiederfindungsraten für jeden Messzeitpunkt bestimmt. Die Gesamtwiederfindungsraten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von MatB/MatA/CitZ mit den Cofaktoren CoA, MalCoA und AcCoA zeigen sich insgesamt vergleichbare zeitliche Verläufe. Dabei werden in der Regel Wiederfindungsraten von ca. 98-102 % über den gesamten Zeitraum der Enzym-Reaktionen beobachtet. Bei vier von den sechs zeitlichen Verläufen der Wiederfindungsraten (1A, 1B, 2A, 2B) lassen sich zu Beginn der Reaktion auffällige Schwankungen feststellen. Dabei weichen die Wiederfindungsraten über einige Messzeitpunkte um einige Prozentpunkte vom Richtwert ab und stellen sich anschließend erneut etwa auf den Richtwert zu Beginn der Reaktion ein. Gründe dafür können sowohl messtechnische als auch reaktionsbedingte Ursachen sein. Allerdings korrelieren keine messtechnischen Einflüsse wie starke Schwankungen der Injektionsmenge oder der Migrationszeiten mit den hier getätigten Beobachtungen. Eine denkbare reaktionsbedingte Erklärung findet sich bei Vergleich der enzymatischen Reaktionen (Abbildung 22 S.67) und der Wiederfindungsraten. Zu Beginn der Reaktion ist die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen und die Schwankung der Wiederfindungsraten am größten. Möglicherweise stellen sich aufgrund der höheren Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Reaktion lokale Konzentrationsunterschiede ein. Bei der Verwendung des Cofaktors AcCoA tritt dieses Phänomen deutlich weniger ausgeprägt auf. Die zeitaufgelöste Reaktion zeigt zu Beginn eine sprunghafte Abnahme der AcCoA Konzentration. Möglicherweise wird der Effekt der schwankenden Wiederfindungsraten zu Beginn deshalb nicht zeitlich aufgelöst. Insgesamt lässt sich jedoch keine vollständig schlüssige Erklärung dieses Phänomens finden. Entsprechend müssten weitere Versuche zur Klärung dieser Fragestellung durchgeführt werden. Dennoch lassen sich über den gesamten Zeitraum der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen hohe Wiederfindungsraten beobachten. Besonders deutlich wird dies bei der Berechnung der Gesamtwiederfindungsraten der einzelnen Reaktionen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Gesamtwiederfindungsraten der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von MatB/MatA/CitZ. Die Konzentrationen der Einzelsubstanzen jedes Zeitpunktes wurden bestimmt, für die jeweiligen Klassen AMP/ATP und CoA/MalCoA/AcCoA aufsummiert und auf die Summenkonzentration der jeweiligen Klasse der ersten Referenz Messung (100 %) normiert. Alle Messungen wurden als Triplikat durchgeführt und Mittelwerte und Standardabweichungen der Wiederfindungsraten für jeden Messzeitpunkt bestimmt. Anschließend wurde für jede zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (Messung 2 bis 37, ohne zweite Referenz) der Mittelwert und die Standardabweichung aller Wiederfindungsraten berechnet.

Cofaktor	Wiederfindungsrate CoA/MalCoA/AcCoA [%]	Wiederfindungsraten AMP/ATP [%]
CoA	98,7 ± 0,7	100,5 ± 0,9
MalCoA	98,5 ± 1,1	99,9 ± 0,8
AcCoA	99,5 ± 0,9	99,8 ± 0,7

Die Mittelwerte (98,5 bis 100,5 %) und Standardabweichungen (0,7 bis 1,1 %) der Gesamtwiederfindungsraten schwanken dabei um den Richtwert von 100 %. Typische Grenzen für Wiederfindungsraten bei der Validierung von analytischen Methoden zur Analyse von pharmazeutischen Wirkstoffen betragen 98-102 % und 95-105% ¹¹⁹. Die erzielten Ergebnisse zeigen eine hohe Genauigkeit bei der Bestimmung der Wiederfindung der Substanz-Klassen von AMP/ATP und CoA/MalCoA/AcCoA in zyklischen enzymatischen Reaktionen.

Insgesamt zeigt sich, dass das enzymatische zellfreie Reaktionssystem auf der Basis eines Recyclings von CoA zur Produktion von Citrat, Polyketid-Grundbausteinen und auch potenziell von Polyketiden dienen kann. Das zyklische Reaktions-System lässt sich flexibel von den drei Cofaktoren CoA, MalCoA oder AcCoA starten. Entsprechend realistisch scheint es zu sein das Reaktions-System aufbauend auf MalCoA oder AcCoA durch eine Polyketid-Synthase zu ergänzen und mittels enzymbasierter Reaktionen eine hochspezifische Produktion von Polyketid-Grundbausteinen und Polyketiden zu ermöglichen. Gleichmaßen vielversprechend ist die Möglichkeit zum Recycling des kostenintensivsten Eduktes CoA in einem kontinuierlich betriebenen Reaktions-System. Abgesehen von den zufrieden stellenden Ergebnissen der zyklischen Enzymreaktionen entsprechen auch die Wiederfindungsraten im Rahmen der Methodvalidierung den notwendigen Kriterien, wenngleich auch einige Fragenstellungen unbeantwortet blieben.

Eine dieser offenen Fragestellungen ist das scheinbare frühzeitige Stoppen der durch CitZ katalysierten Enzym-Reaktion. Spekuliert wurde unter anderem, dass eines der Substrate von CitZ limitiert ist und die Enzym-Reaktion dadurch gestört ist. Da AcCoA allerdings direkt nachgewiesen werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass Oxalessigsäure limitiert ist. Ein Ansatz zur Lösung dieser Problematik war es die Reaktion von MatB/MatA/CitZ unter Zugabe des Cofaktors CoA (Abbildung 22 S.67 1A, 1B) zu wiederholen und bei Anstieg der AcCoA Konzentration nach einer Reaktionszeit von 10 h erneut Oxalessigsäure zur Reaktion hinzuzufügen. Für den Fall, dass die durch CitZ katalysierte Reaktion aufgrund von Substrat-Mangels stagniert, sollte nach erneuter Zugabe von Oxalessigsäure das vorhandene AcCoA erneut abgebaut werden. Entsprechend wurde die Reaktion wiederholt und nach einer Reaktionszeit von 14 h erneut die gleiche Menge an Oxalessigsäure, die bereits im Edukt-Mix vorhanden war, hinzugefügt. Die erhaltene zeitaufgelöste Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ unter Zugabe des Cofaktors CoA ist nachfolgend abgebildet.

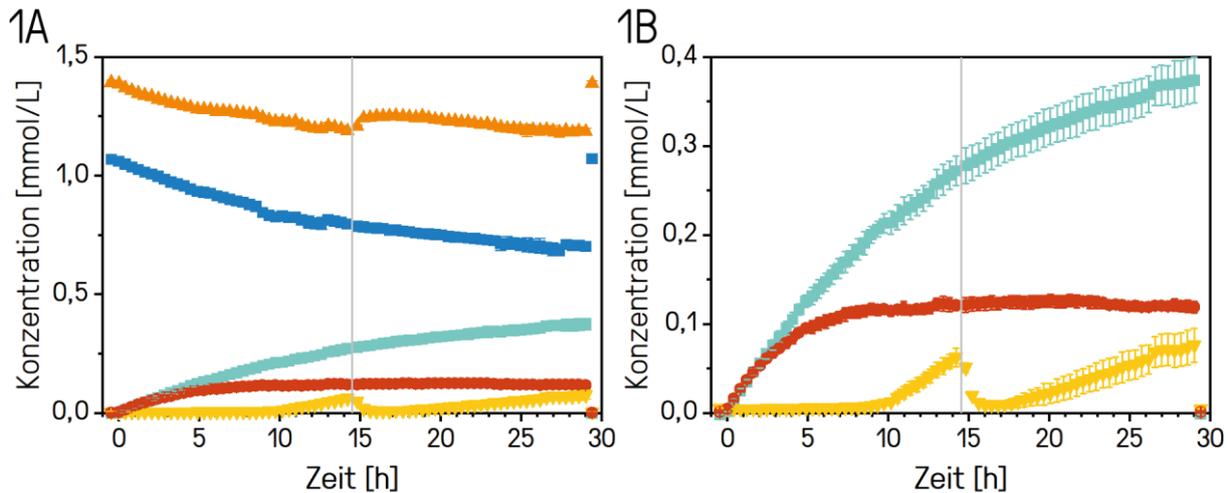


Abbildung 24: Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ. Darstellung der zeitaufgelösten Enzym-Reaktion (Kapitel 6.9.5) von MatB/MatA/CitZ mit den Cofaktor CoA aller Reaktanden (1A) und der Produkte (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Erneute Zugabe von Oxalacetat nach 14 h (graue Markierung). Die zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen erfolgten als Triplikat. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Ergänzend zu den bereits zuvor erzielten Ergebnissen lässt sich erkennen, dass das AcCoA nach der Zugabe von Oxalacetat nach einer Reaktionszeit von ca. 14 h trotz der zuvor stetigen Akkumulation wieder vollständig abgebaut wird. Gleichzeitig steigt die Konzentration von CoA äquimolar mit der Abnahme der Konzentration von AcCoA an. Ab einer Reaktionszeit von ca. 17 h beginnt erneut die Akkumulation von AcCoA. Die Konzentrationsverläufe von AMP, ATP und CoA zeigen nach der Zugabe von Oxalacetat keine Änderung ihrer Verläufe. Es zeigt sich, dass die Umsetzung von AcCoA zu CoA durch die Zugabe von Oxalacetat erneut stattfindet. Entsprechend kann nachgewiesen werden, dass die CitZ Reaktion durch die Konzentration von Oxalacetat limitiert ist. Dies ist vor allem deswegen überraschend, da in der Enzym-Reaktion standardmäßig mit einem Überschuss an Oxalacetat gearbeitet wird. Eine Literaturrecherche ergab, dass Oxalacetat in Lösung instabil ist¹²⁰. Nach fünf Stunden sind noch ca. 20 % Oxalacetat bei Lagerung in destilliertem Wasser und ca. 70 % Oxalacetat bei Lagerung in TRIS Puffer vorhanden¹²¹. Unklar ist dennoch, ob CitZ sämtliche Oxalacetat umgesetzt hat oder durch Hemmungseffekte nur ein gewisser Anteil von Oxalacetat umgesetzt werden kann. Möglicherweise ist ein großer Teil der Oxalacetat bereits während der Probenvorbereitung, der Lagerung und der Enzym-Reaktion zersetzt worden. Darüber hinaus wurden HPLC-MS Messungen durchgeführt, die neben dem Nachweis von Citrat ebenfalls einen hohen Grad an Zersetzung der Oxalacetat in der MatB/MatA/CitZ Reaktion unter Verwendung des Cofaktors CoA von 15 h bei 25 °C im Reaktions-Mix nachweist (siehe Kapitel 8 *Anhang*).

Im Anschluss an diese neuen Erkenntnisse wurde die Oxalessigsäure-Stammlösung neu angesetzt, dabei direkt in GEFI (20 mM TRIS, 150 mM NaCl) Puffer gelöst und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde die Enzym-Reaktion mit CitZ (siehe Kapitel 3.4.3 *Reaktion von CitZ*) mit der neu angesetzten Oxalessigsäure wiederholt. Es wurde ein vollständiger Umsatz von AcCoA innerhalb von 2,5 h erzielt (siehe Kapitel 8 *Anhang*). Entsprechend scheint die durch CitZ katalysierte Reaktion nicht durch ihre Produkte gehemmt zu sein und die stagnierende Reaktion durch die Oxalessigsäure Limitierung begründet zu sein. Da auch bei hohen Umsätzen keine Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten und die Umsätze bei vergleichsweise niedriger Enzym-Konzentration hoch sind kann von einer hohen Spezifität und Nutzbarkeit ausgegangen werden. Im Vergleich zu MatB scheint CitZ zudem eine deutlich höhere Aktivität aufzuweisen. Ein Vergleich der erzielten Umsätze in den Reaktionen von MatA und CitZ ist aufgrund der unterschiedlichen Enzym-Konzentrationen an dieser Stelle nicht sinnvoll möglich. Der direkte Vergleich erfolgt im Rahmen der Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme (siehe Kapitel 3.6.2 *Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme*). Dennoch entsprechen diese Beobachtungen den Erwartungen, da MatB (drei Substrate: NaMal, ATP, CoA) im Vergleich zu MatA (ein Substrat: MalCoA) und CitZ (zwei Substrate: Oxalessigsäure, AcCoA) die höchste Anzahl an der Reaktion beteiligten Substraten aufweist.

Insgesamt konnten aufgrund der umfangreichen kapillarelektrophoretisch zeitaufgelösten Messungen an den Enzym-Reaktionen einige neue Erkenntnisse gewonnen werden. Dazu zählen vor allem die bestätigte Nutzbarkeit und Spezifität aber auch die Kinetik der Reaktionen der einzelnen Enzyme MatB, MatA und CitZ und der Enzymkaskade von MatB/MatA/CitZ. Darüber hinaus konnten Reaktionsungleichgewichte, die durch vorliegende Substratlimitierungen (z.B. CoA, Oxalessigsäure) eintraten, identifiziert, optimiert und Umsätze dadurch gesteigert werden. Zudem konnte nochmals die Zuverlässigkeit der entwickelten Standard CZE-UV/Vis zur automatisierten Messung von Enzym-Reaktionen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte anhand der zeitaufgelösten Messungen an den Enzym-Reaktionen gezeigt werden, dass die Messmethode auch in der Anwendung an Realproben messtechnisch als auch applikativ einfach, präzise, spezifisch, selektiv, wiederholbar und automatisierbar bei hoher Trennleistung, minimalen Probeneinsatz und verzichtbarer Probenvorbereitung ist. Damit konnte ein wesentlicher Mehrwert gegenüber bislang kommerziell erhältlicher^{29–33} und publizierter Assays^{122–129} zur Verfolgung von Reaktanden aus den Enzym-Reaktionen von MatB, MatA und CitZ erzielt werden. Bei Verwendung dieser Assays ist oftmals eine umfangreiche manuelle Probenvorbereitung notwendig, wobei die Probe in der Regel durch weitere Reagenzien modifiziert wird. Zudem kann die Quantifizierung von Analyten durch komplexe Probenmatrices gestört und oftmals keine simultane Bestimmung von mehreren Analyten erfolgen. Für jeden zu quantifizierenden Analyten ein separater Assay durchgeführt werden und ein deutlich

höherer Zeitaufwand betrieben werden. Zudem sind einige dieser Assays nicht kompatibel mit dem hier präsentierten zyklischen Reaktionssystem. In Bezug auf bereits bestehende kapillarelektrophoretische Methoden zur Analyse von Enzym-Reaktionen konnte ein höherer Automatisierungsgrad und eine simultane Auflösung von Multienzymreaktionen in einem Reaktionssystem, dass in Größe und Zyklisierungsfähigkeit in dieser Form noch nicht untersucht wurde, erfolgreich demonstriert werden.

3.4.5 Stabilität der Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich neben der Durchführung und Analyse enzymatischer Reaktionen ebenfalls intensiv mit der Handhabung von Enzymen beschäftigt. Dazu zählten unter anderen das Einfrieren und Auftauen, die Lagerung, das Ansetzen und die Verwendung von Enzym-Aliquoten zur Erzielung hoher Reproduzier- und Vergleichbarkeiten der enzymatischen Reaktionen. Eine umfassende Darstellung der Ergebnisse zur Handhabung der Enzyme erfolgt in dieser Arbeit nicht, da hier der Fokus auf der Enzymanalytik und den Bau eines miniaturisierten Reaktors gelegt wurde. Jedoch lassen sich die jeweils gewählten Vorgehensweisen im Kapitel 6 *Material und Methoden* nachlesen.

Ein sehr wichtiger Aspekt auf den hier dennoch ausführlicher eingegangen wird ist die Stabilität der Enzyme hinsichtlich der Einfrier- und Auftauvorgänge. Die Standardvorgehensweise beim Einfrieren und Auftauen von Enzym-Aliquoten war es, die Enzym-Aliquote nach dem Ansetzen sofort in flüssigen Stickstoff einzufrieren, bei -80 °C zu lagern und nach Bedarf bei 37 °C zügig bis auf RT aufzutauen. Es ist bekannt, dass Enzyme durch Einfrier- und Auftauzyklen an Aktivität verlieren und Proteine beschädigt werden können¹³⁰⁻¹³². Einflussfaktoren sind beispielsweise die Anzahl und Geschwindigkeit der Einfrier- und Auftauvorgänge, die Enzymkonzentration und das Medium. Im Folgenden wird deshalb näher auf die Thematik der Einfrier- und Auftauvorgänge eingegangen, da diese neben dem Verständnis der Thematik auch das Potenzial zur Optimierung der Enzym-Reaktionen hinsichtlich einer Erhöhung der zu erzielenden Umsätze und der Reproduzierbarkeit darstellt.

Bei den Untersuchungen zur Enzymaktivität unter dem Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen sollte untersucht werden, inwieweit das Einfrieren in flüssigen Stickstoff und das anschließende Auftauen Einfluss auf die Enzymaktivität von MatB, MatA und CitZ haben. Zunächst wird jeweils ein bislang ungenutztes MatB, MatA und CitZ Enzym-Aliquot aufgetaut. Die Enzym-Aliquote wurden anschließend zu jeweils einem Stamm-Aliquot verdünnt und dieses wiederum in jeweils fünf Aliquote aufgeteilt. Anschließend wurden die Aliquote einer Anzahl von null bis vier Einfrier- und Auftauzyklen ausgesetzt. Dabei bedeutet ein Einfrier- und Auftauzyklus das Einfrieren des Aliquots in flüssigen Stickstoff und zügiges Auftauen bei 37 °C . Im Anschluss wurden ggf. weitere Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden mit jedem Aliquot drei Enzymreaktionen für 15 h bei 25 °C durchgeführt. Die

Reaktionen wurden mit Säure gestoppt (siehe Kapitel 3.6.1 *Stoppen enzymatischer Reaktionen*) und mit der Standard CE-UV/Vis Methode im Triplikat gemessen. Insgesamt wurden drei biologische Replikate der Enzymreaktionen und drei messtechnische Replikate durchgeführt. Die genaue Durchführung inklusive eines Schemas und die genauen Reaktions-Bedingungen lassen sich in Kapitel 6.10.5 *Untersuchungen zur Enzymaktivität* nachlesen. Die für die einzelnen Enzyme erzielten Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

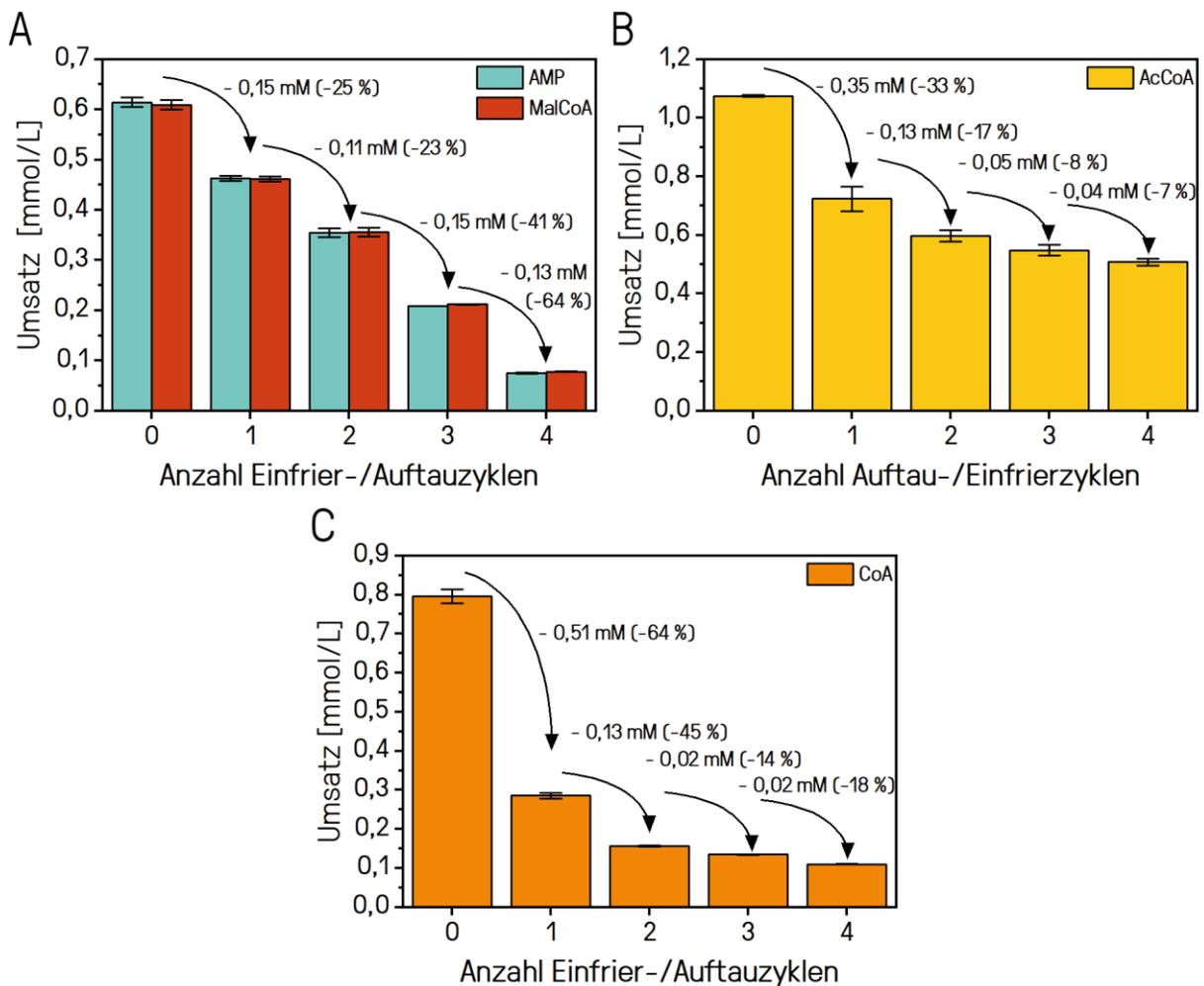


Abbildung 25: Untersuchung zur Stabilität der Enzyme. Darstellung der Ergebnisse zu den Reaktionen von MatB (A), MatA (B) und CitZ (C) mit null bis vier Einfrier- und Auftauzyklen des Enzyms in flüssigen Stickstoff. Für die entsprechenden Reaktionen werden die Konzentrationen der jeweils entstandenen Produkte abgebildet. Es wurden jeweils ein biologisches und ein messtechnisches Triplikat durchgeführt. Für die genaue Durchführung sei auf Kapitel 6.10.5 verwiesen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität von MatB (A) lässt sich erkennen, dass Umsätze im Bereich von ca. 0,05 mmol/L bis 0,6 mmol/L erreicht wurden. Dabei ist der Mittelwert des Umsatzes der beiden Produkte AMP und MalCoA bei der durch MatB katalysierten Reaktion nahezu identisch bei gleichzeitig geringen Standardabweichungen. Der erzielte Umsatz verringert sich absolut betrachtet im Bereich von 0,11 mmol/L bis zu 0,15 mmol/L und relativ betrachtet im Bereich von 23 % bis zu 64 % mit jedem Einfrier- und Auftauzyklus. Absolut betrachtet sinkt der Umsatz gleichmäßig mit jedem Zyklus. Relativ betrachtet steigt der Umsatzverlust mit jedem Zyklus.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität von MatA (B) lässt sich erkennen, dass Umsätze im Bereich von ca. 0,5 mmol/L bis 1,1 mmol/L erreicht wurden. Der erzielte Umsatz verringert sich absolut betrachtet im Bereich von 0,04 mmol/L bis zu 0,35 mmol/L und relativ betrachtet im Bereich von 7 % bis zu 33 % mit jedem Einfrier- und Auftauzyklus. Absolut betrachtet und relativ betrachtet sinkt der Umsatz mit jedem Zyklus. Der Umsatz sinkt durch den ersten Einfrier- und Auftauzyklus dabei deutlich stärker als bei den nachfolgenden Einfrier- und Auftauzyklen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass der Umsatz bei einer Anzahl von null Einfrier- und Auftauzyklen vollständiger Umsetzung entspricht.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität von CitZ (C) lässt sich erkennen, dass Umsätze im Bereich von ca. 0,1 mmol/L bis 0,8 mmol/L erreicht wurden. Der erzielte Umsatz verringert sich absolut betrachtet im Bereich von 0,02 mmol/L bis zu 0,51 mmol/L und relativ betrachtet im Bereich von 14 % bis zu 64 % mit jedem Einfrier- und Auftauzyklus. Absolut und relativ betrachtet sinkt der Umsatz tendenziell mit jedem Zyklus. Der Umsatz sinkt dabei durch den ersten Einfrier- und Auftauzyklus sprunghaft ab. Die weiteren Umsatzverluste bei den folgenden Einfrier- und Auftauzyklen sind weitaus geringer.

Insgesamt zeigt sich, dass durch die Einfrier- und Auftauzyklen teils erhebliche Umsatzeinbrüche zu verzeichnen sind. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass Proteine durch Einfrier- und Auftauzyklen denaturieren und Enzyme an Aktivität verlieren können. Dabei ist vor allem die durch Eiskristalle induzierte teilweise Entfaltung von Proteinen ein Problem¹³⁰. Durch den Einsatz von flüssigem Stickstoff zum Schockfrostern von Proteinaliquoten kann verhindert werden, dass sich entsprechende Eiskristalle bilden und Proteine geschädigt werden. Darüber hinaus können Kälteschutzmittel (z.B. Glycerin) hinzugefügt werden, die die Bildung von Eiskristallen verhindern¹³³, allerdings können diese ebenso negativen Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen. Zudem wäre das Kälteschutzmittel permanenter Teil der Reaktionslösung, dessen Einfluss unbekannt wäre. Daher wurde sich gegen die Verwendung eines stabilisierenden Reagenzes entschieden. Eine weitere Möglichkeit, um eine möglichst geringe Inaktivierung an Enzymen zu gewährleisten, ist die

Verwendung von hohen Enzym-Konzentrationen¹³⁰. Die hier zur Untersuchung verwendeten Enzyme wurden bereits in der höchsten verfügbaren Konzentration (1 mg/mL) eingesetzt. So scheint es, dass die hier vorliegenden Enzyme trotzdem teilweise durch die Einfrier- und Auftauzyklen inaktiviert werden. Unklar ist allerdings, warum die Umsatzeinbußen der Enzyme MatB, MatA und CitZ sehr unterschiedlich sind. Vor allem der erste Einfrier- und Auftauzyklus von CitZ führt zu einem enormen Umsatzeinbruch. Denkbar wäre, dass das Maß der Schädigung des Proteins individuell von seiner jeweiligen Struktur abhängt. Die Lagerung scheint nicht das Problem zu sein, da die Enzyme mindestens ein Jahr bei -80 °C lagerungsfähig sind ohne Degradationsprodukte aufzuweisen (persönliche Kommunikation unveröffentlichter Daten mit Dr. Sandra Hoefgen und Dr. Vito Valiante vom Leibniz-Institut für Naturstoff Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Deutschland). Nichtsdestotrotz konnte anhand der Untersuchung zur Stabilität der Enzyme MatB, MatA und CitZ ein wichtiger Einflussfaktor hinsichtlich der Aktivität der Enzyme identifiziert werden, der sich durch weitere Untersuchungen zu den Einfrier- und Auftaubedingungen optimieren ließe. Als eine Konsequenz dieser Ergebnisse wurde die Handhabung der Enzyme dahingehend optimiert, dass in allen nachfolgenden Versuchen Enzyme verwendet wurden, die einen Einfrier- und Auftauzyklus weniger aufzuweisen haben als die bisher verwendeten. Somit ist eine Erhöhung der Aktivität und damit eine Erhöhung der Umsätze zu erwarten.

Entsprechend dieser Erwartung wurde die Reaktion von MatB/MatA/CitZ mit dem Co-Faktor CoA wiederholt, wobei die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen der Enzyme MatB, MatA und CitZ um einen Zyklus reduziert wurde. Die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

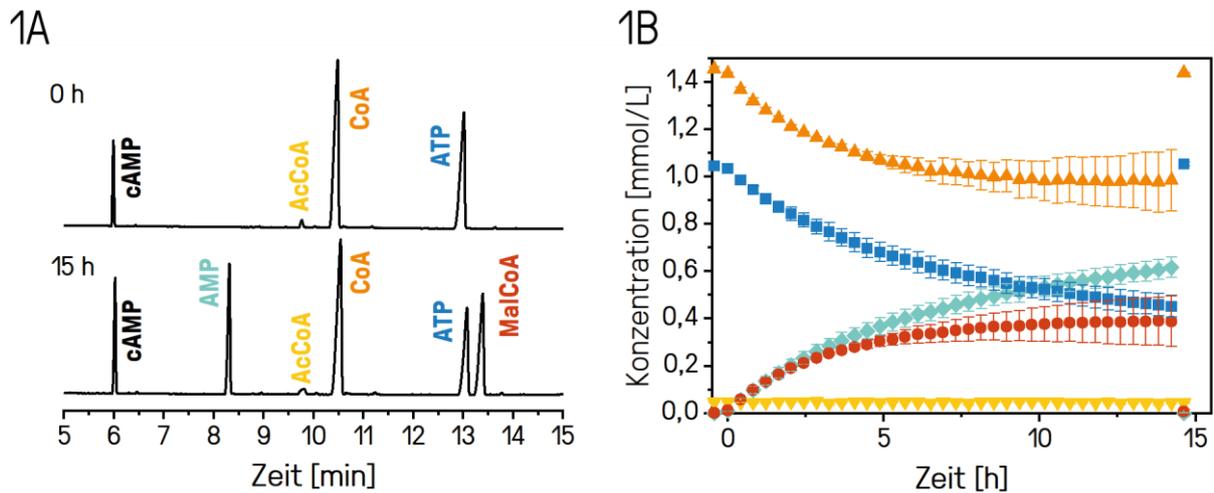


Abbildung 26: Enzym-Reaktion von MatB/MatA/CitZ nach optimierter Probenvorbereitung. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen (Kapitel 6.9.5) von MatB/MatA/CitZ mit dem Cofaktor CoA (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion erfolgte als Triplikat. Anmerkung: Die verwendeten Enzyme wurden einem Einfrier- und Auftauzyklus weniger ausgesetzt als die Enzyme in den zuvor verwendeten Reaktionen in den hier vorangegangenen Kapiteln. Ein Dank gilt an dieser Stelle Dr. Ute Münchberg (ISAS e.V.) für ihre Hilfe bei der Durchführung der Messung. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Ergänzend zu den bereits zuvor beschriebenen Beobachtungen (siehe Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ*) wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktion bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP von 59 % erreicht. Damit konnte der Umsatz durch die Reduzierung der Einfrier- und Auftauzyklen um einen Zyklus eine deutliche Umsatzsteigerung von ca. 30 % erzielt werden. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Umsatzsteigerung höher ist als bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Stabilität von MatB (siehe *Abbildung 25*) zu erwarten gewesen wäre. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen für alle drei an der zyklischen Enzymreaktion beteiligten Enzyme reduziert und damit deren Aktivität erhöht wurde, wodurch die Umsatzgeschwindigkeit des zyklischen Systems überproportional stark angestiegen ist.

Insgesamt ließ sich der Umsatz der zyklischen Enzymreaktion mit MatB/MatA/CitZ durch eine Reduzierung der Einfrier- und Auftauzyklen um einen Zyklus bei der Probenvorbereitung in etwa verdoppeln.

3.4.6 Nachweis der Enzyme mittels CZE-LIF

Eine weitere Fragestellung, die sich bei der Durchführung und Messung von Enzymreaktionen ergab, war, ob die verwendeten Enzyme neben den Analyten ebenfalls injiziert werden und sich nachweisen lassen. Grundsätzlich sollte mit der Thematik geklärt werden, ob die verwendeten Enzyme aufgrund einer Interaktion (z.B. Adsorption) mit der Gefäßwand im Reaktions-Mix verbleiben oder bei der Probennahme entnommen werden. Dies hat insofern einen Einfluss, als das einer Probennahme in das Reaktionssystem eingegriffen, Probenvolumen entnommen und die Enzym- und Reaktanden-Konzentration möglicherweise verändert wird. Verbleiben die Enzyme vollständig im Reaktionsgefäß, wenn gleichzeitig Reaktions-Mix entnommen wird, steigt die Enzym-Konzentration, während die Konzentration der Reaktanden sinkt. Dieser Einfluss steigt mit sinkenden Reaktionsvolumen bzw. steigendem Injektionsvolumen. Ein solcher Einfluss würde sich bei der direkten Probennahme bei der Injektion während einer CZE-UV/Vis Messung aber auch bei allen anderen nicht automatisierten Enzymreaktionen ergeben. Da sich die Enzyme aufgrund ihrer geringen Stoffmenge nicht im UV/Vis-Bereich bei der für Proteine charakteristischen Wellenlänge von 280 nm¹³⁴ nachweisen ließen, wurde eine CZE-LIF Methode zur Detektion entwickelt. Für die CZE-LIF Methoden wurden im Wesentlichen alle Parameter der CZE-UV/Vis Methode übernommen, abgesehen von dem verwendeten Detektor und den entsprechenden Detektoreinstellungen (siehe Kapitel 6.7.2 *Standard CZE-LIF Methode*). Der verwendete Laserinduzierte-Fluoreszenz Detektor (LIF) ist dabei um Größenordnungen sensitiver als der PDA-Detektor (siehe Kapitel 2.1.10 *Detektion*). Zudem eignet sich der LIF-Detektor aufgrund der mit Fluoreszenz-Tags markierten Enzyme potenziell zu dessen Detektion. Darüber hinaus lassen sich beide Methoden und die jeweiligen Migrationszeiten der Enzyme und Analyten aufgrund der identischen Trennbedingungen direkt miteinander vergleichen.

Für die CZE-LIF Analyse wurden die Enzyme MatB, MatA und CitZ entsprechend ihrer bei den Enzymreaktionen standardmäßig verwendeten Konzentration von 0,0125 mg/mL, 0,00125 mg/mL und 0,0125 mg/mL in GEFI angesetzt und gemessen. Die resultierenden CZE-LIF Elektropherogramme sind nachfolgend dargestellt.

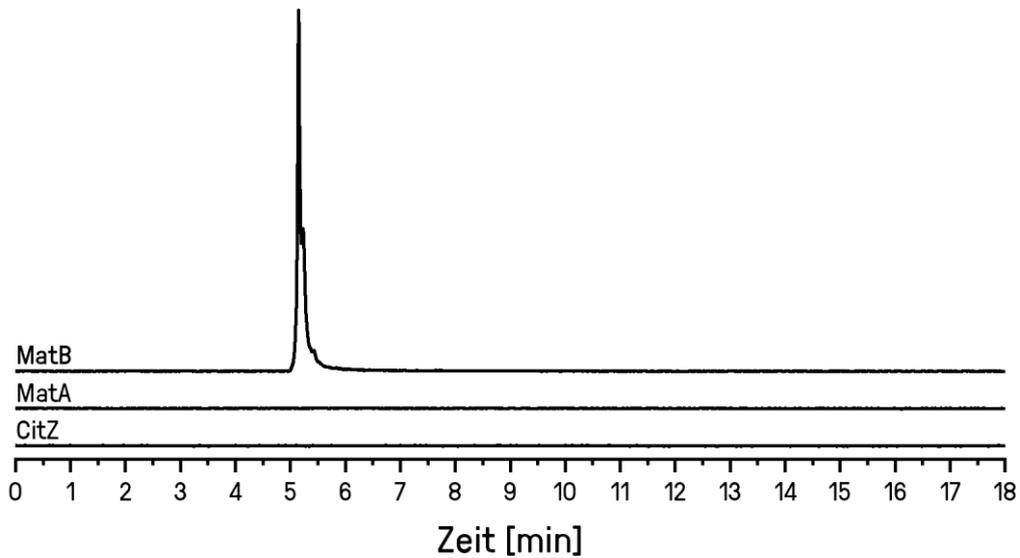


Abbildung 27: CZE-LIF Analyse der Enzyme. CZE-LIF Elektropherogramme zur Analyse der Enzyme Y3K-deGFP MatB (λ_{Ex} : 488 nm; λ_{Em} : 510 nm)¹³⁵, Y3K-mRuby MatA (λ_{Ex} : 558 nm; λ_{Em} : 601 nm)¹³⁵ und Y3K-eBFP CitZ (λ_{Ex} : 380 nm; λ_{Em} : 440 nm)¹³⁶. λ_{Ex} : Extinktionswellenlänge. λ_{Em} : Emissionswellenlänge. Anregungswellenlänge des Lasers: 488 nm. Emissionswellenlänge des Detektors: 520 nm. Die angegebenen Wellenlängen stellen Näherungen dar.

Anhand der drei CZE-UV/Vis Elektropherogramme zur Analyse von MatB, MatA und CitZ lässt sich lediglich im Elektropherogramm zur Analyse von MatB ein Peak erkennen. Der Peak weist eine Migrationszeit von etwa fünf Minuten auf. Sowohl Anregungs- als auch Emissionswellenlänge der LIF-Detektoreinheit und des GFP-Fluoreszenz-Tags befinden sich in einem zum Nachweis kompatiblen Bereich. Aufgrund der hohen Spezifität der LIF-Messung handelt es sich bei dem Peak daher eindeutig um das mit GFP markierte MatB. Die Anregungs- als auch Emissionswellenlänge der LIF-Detektoreinheit scheinen sich hingegen nicht für den Nachweis von MatB und CitZ zu eignen. Die Anregungswellenlänge der LIF-Detektoreinheit scheint nicht geeignet, um die Fluoreszenz-Tags mRuby und eBFP zu einer detektierbaren Fluoreszenz anzuregen oder die Emissionswellenlänge der Analyten ist unterhalb der detektierbaren Wellenlänge des Detektors.

Daher lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass MatB nachweislich in die Kapillare injiziert wird. Die Konzentration von MatB im Reaktions-Mix ist vermutlich nur geringfügig, möglicherweise sogar gar nicht durch die Injektion beeinflusst. Final lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass das nachgewiesene MatB nur den Anteil des sich frei in Lösung befindlichen MatB darstellt. In Bezug auf MatA und CitZ lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob diese ebenfalls in die Kapillare injiziert werden. Für weitere über dieses Projekt hinausreichende Forschungsarbeiten würde CE-MS eine alternative Nachweismethode der markierten Proteine darstellen.

3.5 Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der Reaktionen der nativen Enzyme MatB, MatA und CitZ sowohl in Form von Einzelenzymreaktionen als auch von Mehrenzymbreaktionen in einem zyklischen Reaktionssystem erfolgte die Charakterisierung der Reaktionen der immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ. Grundsätzlich stellt die Immobilisierung der Enzyme hinsichtlich ökonomischer Faktoren als auch der Nutzbarkeit auf dem Entwicklungsweg zur industriellen Anwendung einen entscheidenden Schritt dar¹³⁷. Die Verwendung immobilisierter Enzyme im Rahmen nachhaltiger, biokatalytischer Prozesse ermöglicht die Wiederverwendung von kostenintensiven Enzymen und macht eine Abtrennung von sich frei in Lösung befindenden nativen Enzymen im hergestellten Produkt obsolet. Darüber hinaus ist der Gewinn an Flexibilität des Reaktionssystems von Bedeutung, da immobilisierte Enzyme flexibel ausgetauscht und kombiniert werden können. Außerdem kann die Immobilisierung die Stabilität von Enzymen gegenüber organischen Lösungsmitteln und höheren Temperaturen verbessern¹³⁷. Mit der Vielzahl an Vorteilen bei der Verwendung immobilisierter Enzyme gehen auch einige Nachteile gegenüber nativen Enzymen wie verringerte Aktivitäten und Reaktionsraten immobilisierter Enzyme und zusätzliche Kosten für Trägermaterialien einher. Zudem stellen die Trägermaterialien zusätzliche Kontaminationsquellen des Reaktionssystems dar und müssen darüber hinaus aufwendig entsorgt werden¹³⁷.

Als Konsequenz wird jeder Produktionsprozess hinsichtlich seiner Wirtschaftlichkeit bei der Verwendung von immobilisierten Enzymen evaluiert¹³⁷. Entscheidende Kostenpunkte dabei sind die nativen Enzyme, die Trägermaterialien der Enzyme und dessen Regenerierung, notwendige Weiterverarbeitungsschritte der Reaktionsmischung, die Reaktoren und die Entsorgung von immobilisierten Enzymen. Dennoch ist die Verwendung immobilisierter Enzyme im Großindustriellen Maßstab immer attraktiver geworden. Beispiele für eine erfolgreiche Verwendung immobilisierter Enzyme zur Produktion von Wirkstoffen in der pharmazeutischen Industrie ist die Herstellung von Odanacatib (Osteoporose)¹³⁸, Sofosbuvir (Hepatitis C)¹³⁹, Sitagliptin (Diabetes Typ 2)¹⁴⁰ und β -Lactam Antibiotika (bakterielle Infektionen)¹⁴¹.

Bei der Immobilisierung von Enzymen an Trägermaterialien werden verschiedene Konzepte verfolgt. Dazu zählen das Einbetten, Vernetzen, Adsorbieren, das kovalente und affine Binden von Enzymen an Trägermaterialien²⁰. Entscheidend ist, dass die Aktivität des Enzyms nicht maßgeblich durch die Immobilisierung beeinträchtigt wird und eine stabile Bindung zwischen Trägermaterial und Enzym hergestellt wird. Daher ist vor allem die kovalente Bindung von Enzymen an Trägermaterialien eine der etabliertesten Methoden, die jedoch auch mit großem Entwicklungsaufwand verbunden ist. Da es nicht die Aufgabe dieser Arbeit war eine kovalente Immobilisierung der Enzyme MatB, MatA und CitZ an ein Trägermaterial zu ermöglichen, sondern Vielmehr die Nutzbarkeit der hergestellten Enzyme in

einer technischen Anwendung durch Ausnutzung adäquater Analytik zu demonstrieren, wurde auf die Etablierung einer solchen verzichtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine bereits bekannte Immobilisierungsstrategie zurückgegriffen, dessen Nutzung für den Zweck dieser Arbeit vielversprechend war. Konkret wurden die mittels Polyhistidin-Tag versehenen Enzyme MatB, MatA und CitZ über einen Chelatkomplex an magnetische Ni-NTA-Beads gebunden^{142,143}. Die Verwendung der Ni-NTA Beads ist insofern vorteilhaft, dass die immobilisierten Enzyme sowohl über magnetische als auch über siebtechnische Methoden vom Reaktions-Mix separiert werden können. Dadurch ergibt sich eine größere Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten der auf den Beads immobilisierten Enzyme.

3.5.1 Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ

Das nachfolgende Kapitel dient der Untersuchung zur Nutzbarkeit der Immobilisierung der Enzyme MatB, MatA und CitZ auf magnetischen Ni-NTA Beads. Dazu wurden zunächst zeitaufgelöste Enzym-Reaktionen der immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ zur Abschätzung der nach der Immobilisierung vorhandenen Aktivität durchgeführt. Dabei waren sowohl die Konzentration der Enzyme als auch die Reaktions-Bedingungen (siehe Kapitel 6.9.6 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen* und 6.11 *Immobilisierung von Enzymen*) identisch zu den im vorherigen Kapitel durchgeführten Reaktionen. Zur Vermeidung einer potenziellen messtechnischen Störung durch eine Injektion von Beads in die CE-Kapillare wurde das Proben Vial mit einem Magneten zur Zurückhaltung der magnetischen Beads bestückt. Zu berücksichtigen ist darüber hinaus, dass aufgrund der zuvor beschriebenen Verringerung der Einfrier- und Auftauzyklen die Enzyme eine höhere Aktivität aufweisen als zuvor (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollte der Einfluss der Immobilisierung auf die Aktivität der Enzyme untersucht werden. Aufgrund des hohen Maßes an Überschneidung dieses und der vorherigen Kapitel in Bezug auf die erzielten Ergebnisse, werden im Folgenden vorzugsweise neue und dem Verständnis dienenden Erkenntnisse beschrieben. Zur Ergänzung der hier erzielten Ergebnisse sei auf Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme* verwiesen.

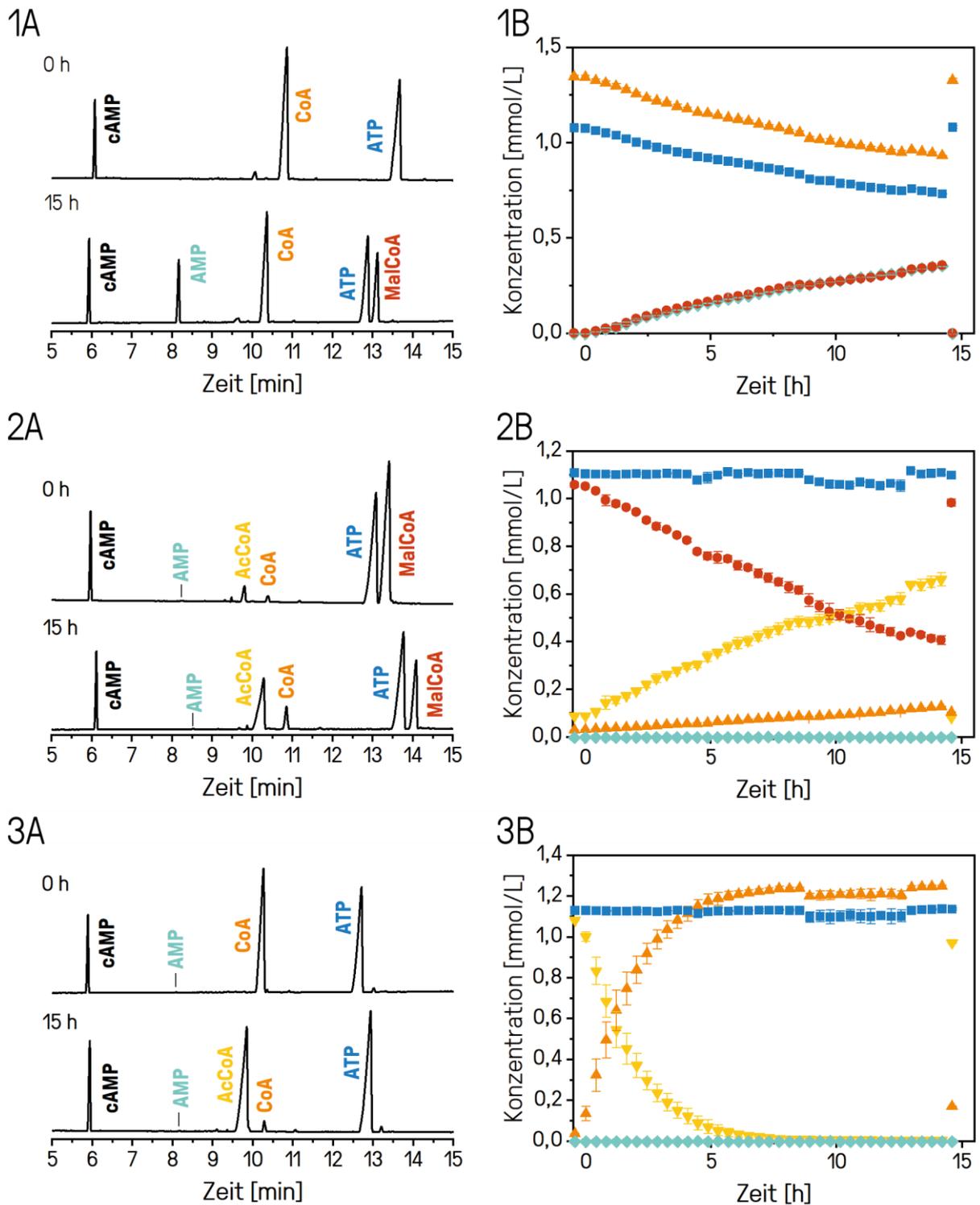


Abbildung 28: Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB, MatA und CitZ. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A, 2A, 3A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB (1B), MatA (2B) und CitZ (3B) (siehe Kapitel 6.9.6) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen erfolgten als Triplikate. Es wurde jeweils die gleiche Immobilisierungscharge bei jeweiliger Neuansetzung des Reaktions-Mixes verwendet. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von immobilisierten MatB (1A) zeigen neben den zwei Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzlich zwei Produkt-Peaks von MalCoA und AMP am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche, äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine kontinuierliche, äquimolare Zunahme der MalCoA- und AMP Konzentration erkennen. Insgesamt beträgt der erzielte Umsatz von CoA zu MalCoA über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C mit immobilisierten MatB im Standard Reaktions-Mix ca. 30 %. Ein direkter Vergleich der Umsätze von nativen und immobilisierten MatB lässt sich an dieser Stelle aufgrund der zwischenzeitlichen Optimierung der Probenvorbereitung (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) nicht tätigen.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von immobilisierten MatA (1A) zeigen neben dem Edukt-Peak von MalCoA zu Beginn der Reaktion zusätzlich einen Produkt-Peak von AcCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der MalCoA Konzentration und eine kontinuierliche Zunahme der AcCoA Konzentration erkennen. Insgesamt beträgt der erzielte Umsatz von MalCoA zu AcCoA über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix ca. 62 %. Ein direkter Vergleich der Umsätze von nativen und immobilisierten MatA lässt sich an dieser Stelle aufgrund der zwischenzeitlichen Optimierung der Probenvorbereitung (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) nicht tätigen.

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von immobilisierten CitZ (1A) zeigen neben dem Edukt-Peak von AcCoA zu Beginn der Reaktion einen Produkt-Peak von CoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine schnelle Abnahme von AcCoA und Zunahme von CoA bis zur vollständigen Umsetzung von AcCoA zu CoA erkennen. Insgesamt wurde ein vollständiger Umsatz von AcCoA zu CoA innerhalb eines Zeitraums von 5 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix erzielt. Ein direkter Vergleich der Umsätze von nativen und immobilisierten CitZ lässt sich an dieser Stelle aufgrund der zwischenzeitlichen Optimierung der Probenvorbereitung (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) nicht tätigen.

Für eine genauere Aussage über den Einfluss der Immobilisierung hätte die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen beim Vergleich von immobilisierten und nativen Enzymen jedoch konstant gehalten werden müssen. Da eine detaillierte Untersuchung des Einflusses einer Immobilisierung auf die Kinetik verschiedener Enzyme nicht trivial ist und im Rahmen dieser Arbeit nicht im Fokus stand, wurde auf eine nähere Untersuchung der zu Demonstrationszwecken genutzten nicht-kovalenten Immobilisierung der einzelnen Enzyme verzichtet. Weitere Untersuchungen erfolgten allerdings für die

Reaktionen mit immobilisierten MatB/MatA/CitZ (siehe Kapitel 3.5.2 *Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ*). Dennoch lässt sich festhalten, dass nach Reduzierung der Einfrier- und Auftauzyklen bei der Probenvorbereitung der Enzyme (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) und dessen Immobilisierung auf Ni-NTA Beads die Aktivität und Nutzbarkeit der immobilisierten Enzyme nachgewiesen werden konnte.

Eine weitere Auffälligkeit sind die vergleichsweise abrupt einsetzenden Konzentrationsschwankungen und die stärker variierenden Migrationszeiten bei den zeitaufgelösten Reaktionen der immobilisierten Enzyme, die in dieser Form zuvor nicht beobachtet wurden. Als naheliegende Ursache scheinen die Ni-NTA Beads in Frage zu kommen, da diese die einzige Änderung am Reaktions-Mix darstellen. Denkbar ist, dass die mit Enzymen beladenen Beads nicht vollständig durch den unter dem Proben Vial befindlichen Magneten zurückgehalten und sich somit eine vergleichsweise geringere Anzahl an Beads während der Injektion an die Kapillare angelagert oder in die CE-Kapillare injiziert werden. Bei genauerer Betrachtung aller Elektropherogramme fiel auf, dass die Injektionsmenge, aufgrund der beobachteten sehr kleinen Peaks zu den Zeitpunkten der abrupten Konzentrationsänderungen, auffällig gering gewesen sein muss. Möglicherweise beeinflusst die Anlagerung von beladenen Beads im Laufe der Reaktionen die bei geringen Drücken durchgeführte Injektion. Eine hartnäckige Anlagerung von beladenen Beads an Kunststoffoberflächen von Eppendorf Vials, die während dessen Handhabung beobachtet wurde, könnte diese These stützen. Vermutlich wird dadurch die Auswertung der sehr kleinen Peakflächen ungenauer, wodurch die Effekte der abrupten Konzentrationsänderungen zustande kamen. Zudem könnte die Anlagerung von Beads an oder in der Kapillare ähnlich wie bei der Adsorption von Proteinen an der Kapillarwand^{52,86,87} dazu führen, dass die durch den EOF induzierte Flussgeschwindigkeit während der Trennung variiert. Entsprechend ließen sich die variierenden Migrationszeiten erklären. Auch wenn diese spekulativen Schlussfolgerungen durchaus nachvollziehbar wären, konnte kein eindeutiger Nachweis für diese These gefunden werden. Als Konsequenz wurde der zu diesem Zeitpunkt verwendete Magnet durch zwei kleinere und stärkere Magneten bei gleichzeitiger Reduzierung des Abstands des Magneten zum Proben Vial ersetzt. Die anschließenden zyklischen Reaktionen von MatB/MatA/CitZ wurden entsprechend mit dem optimierten Aufbau durchgeführt.

3.5.2 Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ

Das in dieser Arbeit angestrebte enzymatische zellfreie Reaktionssystem auf der Basis eines Recyclings von CoA zur Produktion von Polyketid-Grundbausteinen und Polyketiden umzusetzen erforderte neben der bereits durchgeführten Evaluierung von nativen auch die Evaluierung von immobilisierten MatB, MatA und CitZ in zyklischen Reaktionen. Dazu wurde die gleiche Immobilisierungscharge wie bei den zuvor durchgeführten Einzelenzymreaktionen (siehe Kapitel 3.5.1 *Reaktion von immobilisierten*

MatB, MatA und CitZ) für eine zeitaufgelöste zyklische Reaktion mit immobilisierten MatB/MatA/CitZ verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

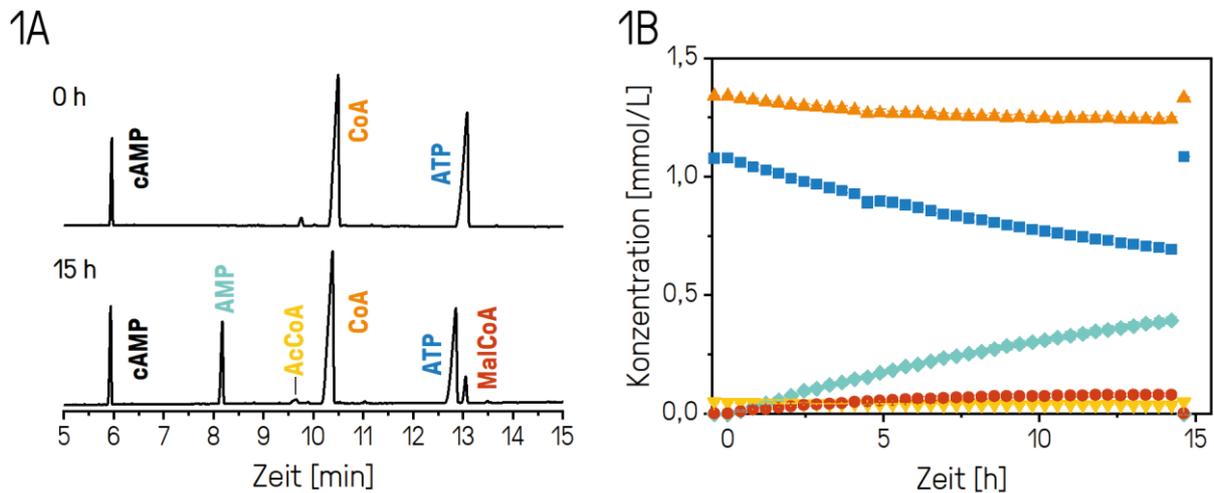


Abbildung 29: Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB/MatA/CitZ. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen (Kapitel 6.9.6) von immobilisierten MatB/MatA/CitZ (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix. Die zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen erfolgten als Triplikat. Es wurde jeweils die gleiche Immobilisierungscharge bei jeweiliger Neuansetzung des Reaktions-Mixes verwendet. Die Immobilisierungscharge entspricht der bei den zuvor durchgeführten immobilisierten Einzelenzymreaktionen (Kapitel 3.5.1). Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Enzym-Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ (1A) zeigen neben den Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP, MalCoA und AcCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration erkennen. Bereits zu Beginn der Reaktion divergieren die Konzentrationsverläufe sowohl von CoA und ATP als auch von AMP und MalCoA. Zudem ist die Konzentration von AcCoA konstant im niedrigen Konzentrationsbereich. Die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion erfolgt anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktion bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix von 36 % erreicht. Somit wird der Umsatz bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP durch die Etablierung eines zyklischen Reaktionssystems im Vergleich zur Einzelenzymreaktion von immobilisierten MatB von 30 % auf 36 % erhöht. Zurückführen lässt sich dies vermutlich auf die durch das Recycling vorhandene höhere CoA Konzentration. Damit ist die Substrat-Konzentration für die Reaktion von MatB höher,

wodurch der Umsatz steigen könnte. Anhand der nicht-äquimolaren Abnahme der Konzentration von CoA und ATP lässt sich zudem das Recycling von CoA erkennen. Es wird weniger CoA verbraucht als ATP, obwohl die Reaktion von MatB äquimolar verläuft. Grund dafür ist, dass bei der von CitZ katalysierten Umsetzung von AcCoA recyceltes CoA entsteht. In der vorliegenden Reaktion ist die Konzentrationsabnahme von ATP um den Faktor 4 größer als die Konzentrationsabnahme von CoA. Die Diskrepanz entspricht im Wesentlichen der Menge an recycelten CoA. Ein kleiner Anteil des entstandenen CoAs ist auf die Hydrolyse von MalCoA und AcCoA zurückzuführen. Entsprechend lässt sich bei der enzymatischen Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ bei Zugabe von CoA als Cofaktor ein zyklisches Reaktions-System nachweisen, bei dem signifikante Mengen CoA recycelt werden. Aus diesem Grunde wurde auf die Durchführung zeitaufgelöster Reaktionen mit immobilisierten MatB/MatA/CitZ bei Verwendung der anderen beiden Cofaktoren MalCoA und AcCoA verzichtet. Der Nachweis eines zyklischen Reaktionssystems mit den Cofaktoren MalCoA und AcCoA wurde bereits ausführlich in Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ* behandelt. Zudem zeigt der Vergleich der Umsätze der zyklischen Reaktionen von immobilisierten (36 %) und nativen MatB/MatA/CitZ nach optimierter Probenvorbereitung (59 %; siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*), dass der Umsatz von MatB/MatA/CitZ durch die Immobilisierung auf Ni-NTA Beads deutlich reduziert wurde.

Die Reduzierung des Umsatzes war jedoch erwartet worden und lässt sich vermutlich im Wesentlichen auf zwei Ursachen zurückführen. Zum einen werden die mit Enzymen beladenen Beads durch den Magneten am Boden des Proben Vials festgehalten werden. Somit war zu erwarten, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten durch eine lokale Verminderung der Substratkonzentration und eine größtenteils diffusionslimitierte Durchmischung der Probe verringert werden würden. Entsprechend würden die erzielten Umsätze sinken. Allerdings könnten diese Effekte durch die langen Reaktionszeiten teilweise ausgeglichen werden. Zum anderen ist es denkbar, dass die Enzyme MatB, MatA und CitZ aufgrund von sterischen Hinderungen und einer geringeren Mobilität bedingt durch die Immobilisierung beeinflusst werden, zumal ihre aktive Form häufig auch Polymere darstellen¹⁴⁴, dessen Bildung gestört werden könnte. Für eine genauere Aussage über den Einfluss der Immobilisierung hätten die Reaktionen jeweils ohne einen Magneten für die Immobilisierung der Beads im Reaktions-Vial durchgeführt werden müssen. Da diese jedoch nachweislich das Messsystem störten, wurde darauf verzichtet. Da eine detaillierte Untersuchung des Einflusses einer Immobilisierung auf die Kinetik verschiedener Enzyme nicht trivial ist und im Rahmen dieser Arbeit nicht im Fokus stand, wurde auf eine nähere Untersuchung der zu Demonstrationszwecken genutzten nicht-kovalenten Immobilisierung verzichtet. Dies ist allerdings ein wichtiger Aspekt bei der

Etablierung einer kovalenten Bindung der Enzyme an ein Trägermaterial, der zu gegebener Zeit näher quantifiziert werden sollte.

Darüber hinaus zeigt sich, dass die Problematik der Instabilität der Migrationszeiten und der sprunghaft variierenden Konzentrationsverläufe (siehe Kapitel 3.5.1 *Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ*) scheinbar durch die Verwendung zweier stärkerer Magneten und einen geringeren Abstand zwischen den Magneten und Proben Vial zur Zurückhaltung der magnetischen Beads gelöst werden konnte. Dies ermöglichte die Wiederherstellung der Güte der ursprünglich bei den zeitaufgelösten Reaktionen verwendeten Standard CZE-UV/Vis Methode.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass auch die auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ sowohl in Einzelenzymreaktionen als auch in einer zyklischen Multienzymreaktion nutzbar sind. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass der Umsatz im zyklischen Reaktionssystem vermutlich aufgrund der aktivitätsverringenden Immobilisierung reduziert wurde. Die Nutzbarkeit der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme im Rahmen einer ersten technischen Anwendung scheint allerdings gegeben zu sein. Dennoch ergibt sich hinsichtlich der Nutzbarkeit der immobilisierten Enzyme die Frage nach der Stabilität der mittels Enzym-Ni-NTA Chelat-Komplexes ermöglichten Immobilisierung. Auch wenn es sich bei Chelat-Komplexen in der Regel um stabile Verbindungen handelt, ist diese Art der Bindung nicht kovalenter Natur und damit reversibel¹⁴³. Die Stabilität der Immobilisierung wird daher im Rahmen der technischen Anwendung im Reaktor gesondert untersucht (siehe Kapitel 3.7 *CE integriertes enzymatisches Reaktorsystem*).

3.6 Bestimmung der Aktivität von nativen und immobilisierten Enzymen

Neben der bereits evaluierten Spezifität, Nutzbarkeit und Kinetik der nativen als auch immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ wird im Folgenden näher auf die Aktivität der Enzyme eingegangen. Die Aktivität eines Enzyms beschreibt dabei den maximal möglichen Substratumsatz pro Zeiteinheit bei der durch das Enzym katalysierten Reaktion⁷⁸. Besondere Bedeutung erfährt die Aktivität dabei im Bereich der Biotechnologie. Die Kenntnis über die katalytische Aktivität eines Enzyms ermöglicht eine kinetische Modellierung enzymtechnologischer Prozesse und stellt hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit solcher Reaktionssysteme einen wichtigen Faktor dar. Grundsätzlich steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration und erreicht den Maximalwert bei Substratsättigung^{78,82,83}. Daher wird die Aktivität eines Enzyms im linearen Bereich zu Beginn einer Reaktion bestimmt und häufig auch als Initial- oder Anfangsgeschwindigkeit (v_{\max}) bezeichnet⁷⁸. Dabei wird die Abnahme der Konzentration eines Eduktes oder die Zunahme der Konzentration eines Produktes unter definierten Reaktionsbedingungen bestimmt. Zur Angabe der spezifischen Aktivität

eines Enzyms wird die Aktivität auf die Menge an eingesetztem Enzym normiert. Zur Erhöhung der Aktivität können zudem neben der Substratsättigung der pH-Wert, die Temperatur, die Ionenkonzentration und die Co-Substrat Konzentration optimiert werden ⁷⁸.

3.6.1 Stoppen enzymatischer Reaktionen

Zur Bestimmung der Aktivität von MatB, MatA und CitZ mit möglichst hoher Zeitauflösung zu Beginn der Enzymreaktionen wurden die Enzymreaktionen durch eine pH-Wert Änderung nach definierten Zeitpunkten gestoppt und die Produkt-Konzentrationen anschließend mit der Standard CZE-UV/Vis Methode bestimmt. Konkret wurde der pH-Wert durch Zugabe von Ameisensäure von pH 8 auf pH 3 gesenkt werden, da bei pH-Werten kleiner als drei eine instantane Inaktivierung von Enzymen erwartet werden kann ¹⁴⁵. Zur Sicherstellung einer vollständigen Inaktivierung der Enzyme durch die pH-Wert Änderung wurde die Vorgehensweise zunächst in einem Vorversuch evaluiert. Dazu wurden für MatB, MatA und CitZ jeweils drei Referenzen und zwei Reaktionen evaluiert. Als Referenzen wurden der Reaktions-Mix in Abwesenheit der Enzyme ohne jeglichen äußeren oder zeitlichen Einfluss (Referenz Vorher), der Reaktions-Mix in Abwesenheit der Enzyme nach 15 h bei 25 °C mit pH-Wert Änderung (Referenz mit Säure) und der Reaktions-Mix in Abwesenheit der Enzyme nach 15 h bei 25 °C ohne pH-Wert Änderung (Referenz ohne Säure) genutzt. Äquivalent zu den letzten beiden Referenzen wurde einer der Reaktions-Mixe in Anwesenheit eines der Enzyme MatB, MatA oder CitZ vor dem Starten der Reaktion einer pH-Wert Änderung ausgesetzt und nach 15 h bei 25 °C analysiert (Reaktion mit Säure). Ein weiterer Reaktions-Mix wurde in Anwesenheit eines der Enzyme MatB, MatA oder CitZ keiner pH-Wert Änderung ausgesetzt und nach 15 h bei 25 °C analysiert (Reaktion ohne Säure). Mit dieser Vorgehensweise wird sowohl der Einfluss der Kombination aus Zeit und Temperatur, als auch der Einfluss der pH-Wert Änderung auf die Referenzen und die Enzym-Reaktionen aufgeklärt. Somit kann gewährleistet werden, dass die pH-Wert Änderung keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Referenz nimmt und die Enzym-Reaktionen nachweislich gestoppt werden. Die Ergebnisse der Vorversuche zum Stoppen der Enzym-Reaktionen von MatB, MatA und CitZ durch pH-Wert Änderung (siehe Kapitel 6.10.2 *Untersuchungen zum Stoppen von Enzymreaktionen durch pH-Wert Änderung*) sind nachfolgend dargestellt.

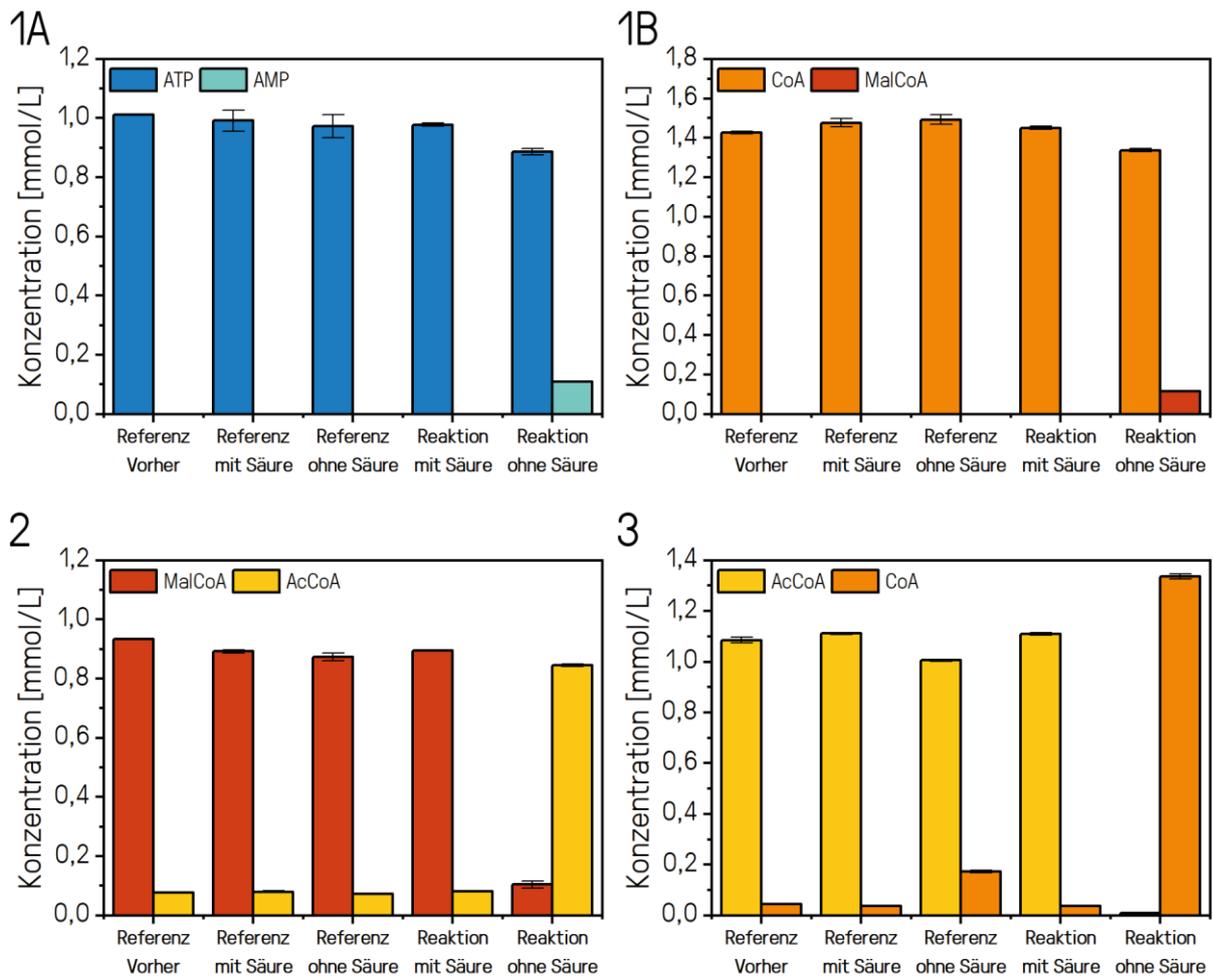


Abbildung 30: Untersuchung zum Stoppen der Enzym-Reaktionen von MatB, MatA und CitZ durch pH-Wert Änderung. Der Reaktions-Mix in Abwesenheit der Enzyme ohne jeglichen äußeren Einfluss (Referenz Vorher), mit pH-Wert Änderung (Referenz mit Säure) nach 15 h bei 25 °C und ohne pH-Wert Änderung (Referenz ohne Säure) nach 15 h bei 25 °C. Reaktions-Mixe in Anwesenheit eines der Enzyme MatB (1A, 1B), MatA (2) oder CitZ (3) mit pH-Wert Änderung vor dem Starten der Reaktion (Reaktion mit Säure) nach 15 h bei 25 °C und ohne pH-Wert Änderung (Reaktion ohne Säure) nach 15 h bei 25 °C (Kapitel 6.10.2). Die Messungen erfolgten als Triplikate mit der Standard CZE-UV/Vis Methode.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung zum Stoppen der Enzym-Reaktion von MatB (1A, 1B) zeigt sich, dass ausschließlich bei der enzymatischen Reaktion ohne pH-Wert Änderung (Reaktion ohne Säure) eine Abnahme der Edukt-Konzentration von ATP und CoA und eine Zunahme der Produkt-Konzentration von AMP und MalCoA zu beobachten ist. Der Vergleich der Referenz Vorher und der Referenz mit Säure zeigt, dass eine pH-Wert Änderung durch Ameisensäure offenbar keinen relevanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Referenz nimmt. Wird zusätzlich die Referenz ohne Säure in die Betrachtung einbezogen lässt sich zudem keine Zunahme der Produkt- und keine Abnahme der Edukt-Konzentration über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Rahmen der Fehlergenauigkeit erkennen. Zudem wird anhand der Reaktionen mit und ohne Säure ersichtlich, dass sich bei einer pH-

Wert Änderung vor Beginn der Reaktion im Vergleich zur Referenz kein zusätzliches ATP und CoA abgebaut oder AMP und MalCoA aufgebaut werden. Findet keine pH-Wert Änderung zu Beginn der Reaktion statt, wird ein geringfügiger Umsatz von ATP und CoA zu AMP und MalCoA beobachtet. Somit lässt sich nachweisen, dass eine pH-Wert Änderung durch Ameisensäure von pH 8 auf pH 3 die enzymatische Reaktion von MatB unterdrückt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung zum Stoppen der Enzym-Reaktion von MatA (2) zeigt sich, dass ausschließlich bei der enzymatischen Reaktion ohne pH-Wert Änderung (Reaktion ohne Säure) eine Abnahme der Edukt-Konzentration von MalCoA und eine Zunahme der Produkt-Konzentration von AcCoA zu beobachten ist. Der Vergleich der Referenzen zeigt, dass eine pH-Wert Änderung durch Ameisensäure offenbar keinen relevanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Referenz nimmt und sich zudem keine Bildung von Produkten nachweisen lässt. Allerdings wird eine geringfügige Abnahme der Edukt-Konzentration über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C beobachtet, die auf die bereits zuvor untersuchte hydrolytische Zersetzung von MalCoA zu CoA zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.3.2 *Malonyl-Coenzym A*). Zudem wird anhand der Ergebnisse zu den Reaktionen mit und ohne Säure ersichtlich, dass sich bei einer pH-Wert Änderung vor Beginn der Reaktion im Vergleich zur Referenz kein zusätzliches MalCoA abgebaut oder AcCoA aufgebaut wird. Findet keine pH-Wert Änderung zu Beginn der Reaktion statt, wird ein nahezu vollständiger Umsatz von MalCoA zu AcCoA beobachtet. Somit lässt sich nachweisen, dass eine pH-Wert Änderung durch Ameisensäure von pH 8 auf pH 3 die enzymatische Reaktion von MatA unterdrückt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung zum Stoppen der Enzym-Reaktion von CitZ (3) zeigt sich, dass ausschließlich bei der enzymatischen Reaktion ohne pH-Wert Änderung (Reaktion ohne Säure) eine nennenswerte Abnahme der Edukt-Konzentration von AcCoA und eine Zunahme der Produkt-Konzentration von CoA zu beobachten ist. Der Vergleich der Referenz Vorher und der Referenz mit Säure zeigt, dass eine pH-Wert Änderung durch Ameisensäure die Zusammensetzung der Referenz offenbar nicht im Hinblick auf die Analyten verändert. Wird zusätzlich die Referenz ohne Säure in die Betrachtung einbezogen lässt sich eine Abnahme der AcCoA Konzentration und eine Zunahme der CoA Konzentration beobachten, die auf die bereits zuvor untersuchte hydrolytische Zersetzung von AcCoA zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.3.3 *Acetyl-Coenzym A*). Die Ergebnisse zu den Referenzen weisen entsprechend daraufhin, dass die pH-Wert Änderung eine höhere Stabilität von AcCoA im sauren Milieu^{108,109} ermöglicht und scheinbar eine hydrolytische Zersetzung verhindert. Zudem wird anhand der Ergebnisse zu den Reaktionen mit und ohne Säure ersichtlich, dass sich bei einer pH-Wert Änderung vor Beginn der Reaktion im Vergleich zur Referenz kein zusätzliches AcCoA abgebaut oder CoA aufgebaut wird. Findet keine pH-Wert Änderung zu Beginn der Reaktion statt, wird ein vollständiger Umsatz von AcCoA zu CoA beobachtet. Somit lässt sich nachweisen, dass eine pH-

Wert Änderung durch Ameisensäure von pH 8 auf pH 3 die enzymatische Reaktion von CitZ unterdrückt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass eine pH-Wert Änderung von pH 8 auf pH 3 durch eine Zugabe von Ameisensäure eine erfolgreiche Inaktivierung von MatB, MatA und CitZ ohne weitere negative Begleiterscheinungen ermöglicht. Im Folgenden kann entsprechend durch gezielte Zugabe von Ameisensäure zum Reaktions-Mix eine enzymatische Reaktion von MatB, MatA und CitZ zu definierten Zeitpunkten gestoppt und hinsichtlich seiner Zusammensetzung untersucht werden.

3.6.2 Aktivitätsbestimmung nativer Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine einheitliche Vorgehensweise zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der nativen Enzyme MatB, MatA und CitZ definiert (siehe Kapitel 6.10.3 *Bestimmung der Enzymaktivität der nativen Enzyme*). Dazu wurde zunächst der zeitliche Rahmen zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der nativen Enzyme festgelegt. Anhand der zeitaufgelösten Reaktionen von nativen MatB, MatA und CitZ (siehe Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme*) wurde zunächst der zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit notwendige lineare Konzentrationsbereich oberhalb der Bestimmungsgrenze zeitlich abgeschätzt. Anschließend wurden drei Edukt-Mixe präpariert und eine Minute zeitversetzt durch die Zugabe der Enzyme gestartet. Die Proben wurden anschließend in zeitlichen Abständen von 3 min über einen Zeitraum von 24 min bei einer Temperatur von 25 °C den Reaktions-Mixen entnommen und die Reaktion durch eine durch Zugabe von Ameisensäure bewirkte pH-Wert Änderung gestoppt. Anschließend wurden die Proben als Triplikat mit der Standard CZE-UV/Vis Methode gemessen, die Konzentrationen der Produkte bestimmt und gegen die Entnahmezeitpunkte aufgetragen. Die Berechnung der Regressionsgleichung zur Bestimmung der Aktivität anhand der ermittelten Steigung erfolgte mittels linearer Regression. Insgesamt wurden drei biologische als auch drei messtechnische Replikate durchgeführt. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Aktivität der nativen Enzyme MatB, MatA und CitZ sind nachfolgend dargestellt.

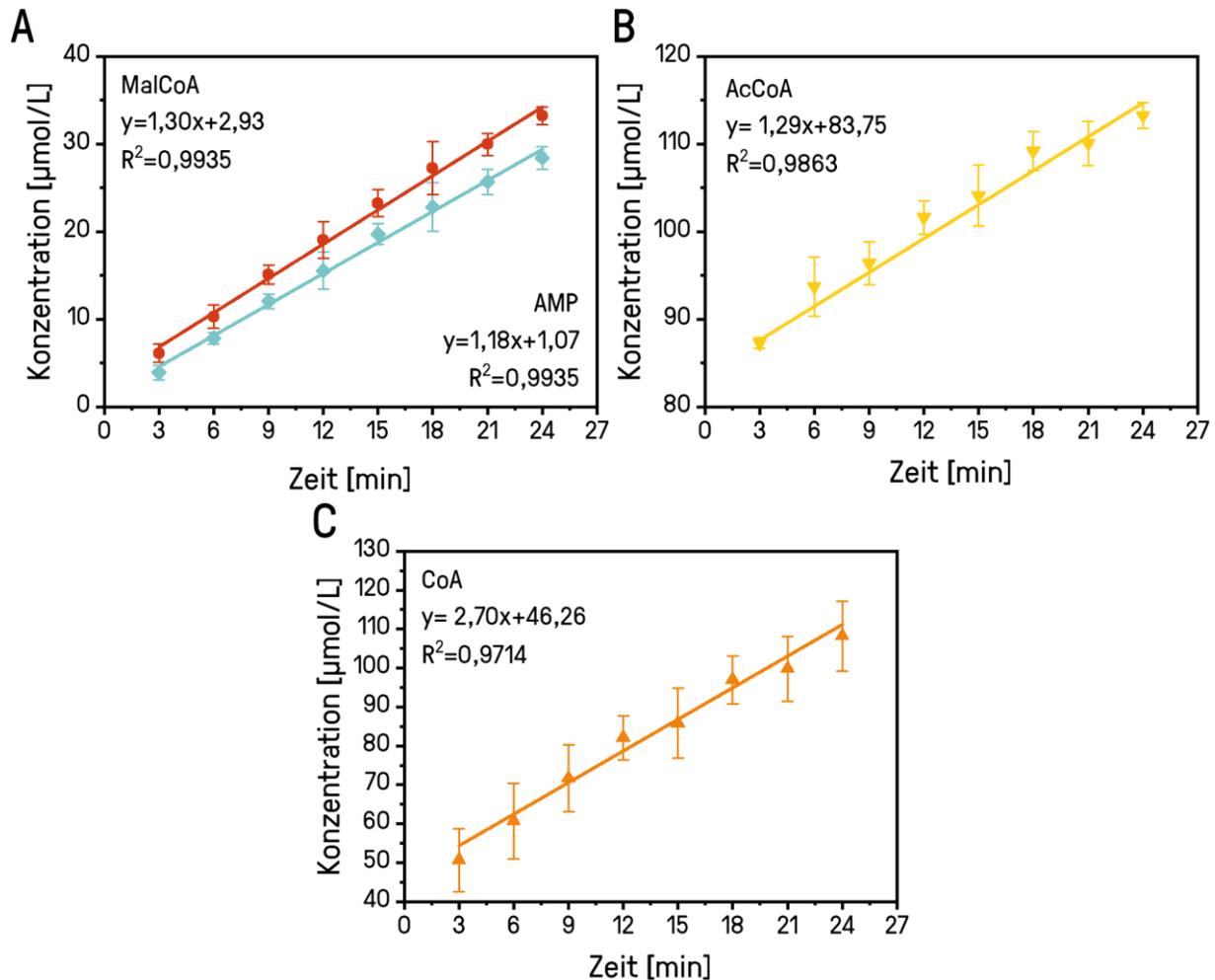


Abbildung 31: Bestimmung der Aktivitäten von nativen MatB, MatA und CitZ. Proben der Reaktionen von nativen MatB (A), MatA (B) und CitZ (C) wurden in zeitlichen Abständen von 3 min über einen Zeitraum von 24 min bei 25 °C den Reaktions-Mixen entnommen und die Reaktion durch eine durch Zugabe von Ameisensäure bewirkte pH-Wert Änderung gestoppt (Kapitel 6.10.3). Die Messung erfolgte als Triplikat mit der Standard CZE-UV/Vis Methode. Darstellung der Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R^2). Legende: AMP (◆), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Anhand der grafischen Auftrugungen der Konzentration der Produkte AMP, MalCoA, AcCoA und CoA der Enzym-Reaktionen von nativen MatB (A), MatA (B) und CitZ (C) gegen die Entnahmezeitpunkte lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Entnahmezeitpunkt erkennen. Bestätigt wird dieser Eindruck durch die ermittelten Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße, die einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Reaktionszeit nachweisen. Auf Basis der bestimmten Regressionsfunktionen wurden anschließend Aktivität und spezifische Aktivität der Enzyme bestimmt. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Aktivitäten sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 9: Bestimmung der Aktivitäten von nativen MatB, MatA und CitZ. Berechnung der Aktivität und der spezifischen Aktivität anhand der zuvor bestimmten Regressionsdaten (siehe Abbildung 31).

Enzym (nativ)	Molare Masse [kDa]	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Aktivität [$\mu\text{mol/min}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol/min/mg (Enzym)}$]
MatB	83,4	12,5	1,18 \pm 0,04 (AMP)	189 \pm 6 (AMP)
			1,30 \pm 0,04 (MalCoA)	208 \pm 6 (MalCoA)
MatA	79,9	1,25	1,29 \pm 0,06 (AcCoA)	2064 \pm 96 (AcCoA)
CitZ	71,8	0,125	2,70 \pm 0,18 (CoA)	43200 \pm 2880 (CoA)

Die bestimmten Aktivitäten der nativen Enzyme MatB, MatA und CitZ betragen zwischen 1,18 $\mu\text{mol/min}$ und 2,70 $\mu\text{mol/min}$. Damit sind diese bei den gewählten Konzentrationen in etwa vergleichbar miteinander. MatB und MatA weisen eine ähnliche Aktivität auf, wohingegen die Aktivität von CitZ in etwa doppelt so hoch ist wie die von MatB und MatA. Für eine direkte Vergleichbarkeit der Enzyme durch das Einbeziehen der eingesetzten Enzymmengen wurde zusätzlich die spezifische Aktivität berechnet. Bei der Betrachtung der spezifischen Aktivität zeigt sich, dass sich die spezifische Aktivität von MatB, MatA und CitZ in etwa um zwei Größenordnungen unterscheidet. Es wurden spezifische Aktivitäten zwischen 189 $\mu\text{mol/min/mg}$ und 43200 $\mu\text{mol/min/mg}$ bestimmt, wobei MatB die geringste und CitZ die höchste spezifische Aktivität aufweist. Dies bedeutet, dass für den gleichen Substratumsatz pro Zeiteinheit für MatB die höchste und für CitZ die geringste Enzym-Konzentration eingesetzt werden muss. Anzumerken sei an dieser Stelle, dass bedingt durch Unreinheiten der Ausgangssubstanzen die Konzentrationen von AcCoA und CoA bei den Reaktionen von MatA und CitZ bereits zu Beginn der Reaktion erhöht sind. Somit können die bestimmten Aktivitäten durch das Vorhandensein der Produkte beeinflusst sein und möglicherweise aufgrund von zuvor diskutierten Hemmungseffekten (siehe Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme*) nicht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit abbilden. Aufgrund des Substrat-Überschusses und der insgesamt geringen Umsätze sollte der Einfluss jedoch verhältnismäßig gering sein und die Aktivitäten näherungsweise richtig sein.

Ein Vergleich der bestimmten spezifischen Aktivitäten mit publizierten Ergebnissen gestaltet sich in der Regel schwierig, da sich die Reaktionsbedingungen in der Regel unterscheiden und somit aktivitätsbestimmende Parameter nicht identisch sind. Eine Publikation, die vergleichbare Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der Aktivität von nativen MatB aufweist, gibt spezifische Aktivitäten von MatB in der Größenordnung von ca. 20 $\mu\text{mol/min/mg}$ an²². Damit sind die hier erzielten spezifischen Aktivitäten innerhalb einer Größenordnung vergleichbar mit den publizierten Ergebnissen. Grundsätzlich lassen sich diese Ergebnisse zur spezifischen Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt zur kinetischen Modellierung zur Produktion der Polyketid-Grundbausteine CoA, MalCoA

und AcCoA oder darauf aufbauenden Polyketiden mittels nativen MatB, MatA und CitZ in einer technischen Anwendung nutzen.

3.6.3 Aktivitätsbestimmung immobilisierter Enzyme

Neben der Bestimmung der Aktivität der nativen Enzyme ist die Bestimmung der Aktivität der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ von Bedeutung. Der Vergleich der Aktivitäten nativer und immobilisierter Enzyme ermöglicht eine Abschätzung einer potenziellen Aktivitätsverringern durch die Immobilisierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu eine einheitliche Vorgehensweise zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ (siehe Kapitel 6.10.4 *Bestimmung der Enzymaktivität der immobilisierten Enzyme*) definiert. Anhand der zeitaufgelösten Reaktionen von immobilisierten MatB, MatA und CitZ (siehe Kapitel 3.5.1 *Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ*) wurde zunächst der zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit notwendige lineare Konzentrationsbereich oberhalb der Bestimmungsgrenze zeitlich abgeschätzt. Anschließend wurden drei Edukt-Mixe präpariert und eine Minute zeitversetzt durch die Zugabe der Enzyme gestartet. Die Proben wurden anschließend in zeitlichen Abständen von 3 min über einen Zeitraum von 24 min bei einer Temperatur von 25 °C den Reaktions-Mixen entnommen und die Reaktion durch eine durch Zugabe von Ameisensäure bewirkte pH-Wert Änderung gestoppt. Anschließend wurden die Proben als Triplikat mit der Standard CZE-UV/Vis Methode gemessen, die Konzentrationen der Produkte bestimmt und gegen die Entnahmezeitpunkte aufgetragen. Die Berechnung der Geradengleichung zur Bestimmung der Aktivität anhand der ermittelten Steigung erfolgte mittels linearer Regression. Insgesamt wurden drei biologische als auch drei messtechnischen Replikate durchgeführt. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Aktivität der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ sind nachfolgend dargestellt.

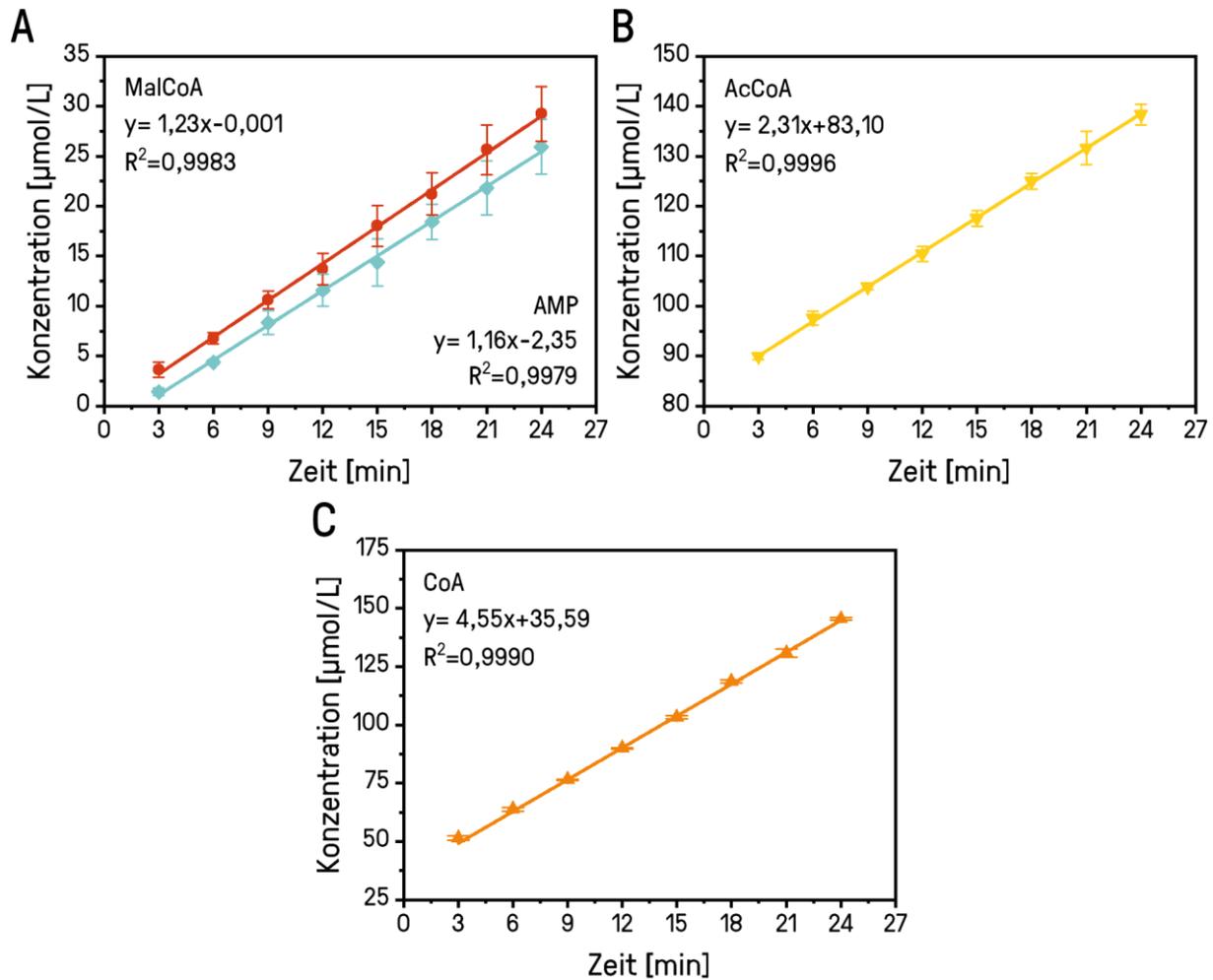


Abbildung 32: Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten von immobilisierten MatB, MatA und CitZ. Proben der Reaktionen von immobilisierten MatB (A), MatA (B) und CitZ (C) wurden in zeitlichen Abständen von 3 min über einen Zeitraum von 24 min bei 25 °C den Reaktions-Mixen entnommen und die Reaktion durch eine durch Zugabe von Ameisensäure bewirkte pH-Wert Änderung gestoppt (Kapitel 6.10.4). Die Messung erfolgte als Triplikat mit der Standard CZE-UV/Vis Methode. Darstellung der Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße (R^2). Legende: AMP (◆), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Anhand der grafischen Auftrugungen der Konzentration der Produkte AMP, MalCoA, AcCoA und CoA der Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB (A), MatA (B) und CitZ (C) gegen die Entnahmezeitpunkte lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Entnahmezeitpunkt erkennen. Bestätigt wird dieser Eindruck durch die ermittelten Regressionsgeraden, Regressionsfunktionen und Bestimmtheitsmaße, die einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Reaktionszeit nachweisen. Auf Basis der bestimmten Regressionsfunktionen wurden anschließend Aktivität und spezifische Aktivität der Enzyme bestimmt. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Aktivitäten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10: Bestimmung der Aktivität von immobilisierten MatB, MatA und CitZ. Berechnung der Aktivität und der spezifischen Aktivität anhand der zuvor bestimmten Regressionsdaten (Abbildung 32).

Enzym (immobilisiert)	Molare Masse [kDa]	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Aktivität [$\mu\text{mol/min}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol/min/mg (Enzym)}$]
MatB	83,4	12,5	1,16 \pm 0,02 (AMP)	186 \pm 3 (AMP)
			1,23 \pm 0,02 (MalCoA)	197 \pm 3 (MalCoA)
MatA	79,9	1,25	2,31 \pm 0,02 (AcCoA)	3696 \pm 32 (AcCoA)
CitZ	71,8	0,625	4,55 \pm 0,06 (CoA)	14560 \pm 192 (CoA)

Die bestimmten Aktivitäten der immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ betragen zwischen 1,16 $\mu\text{mol/min}$ und 4,55 $\mu\text{mol/min}$. Damit sind diese bei den gewählten Konzentrationen in etwa in derselben Größenordnung. MatA weist in etwa die doppelte Aktivität wie MatB auf, wohingegen die Aktivität von CitZ in etwa doppelt so hoch ist wie die von MatA. Für eine direkte Vergleichbarkeit der Enzyme durch das Einbeziehen der eingesetzten Enzymmengen wurde zusätzlich die spezifische Aktivität berechnet. Bei der Betrachtung der spezifischen Aktivität zeigt sich, dass sich die spezifische Aktivität von MatB, MatA und CitZ in etwa um zwei Größenordnungen unterscheidet. Es wurden spezifische Aktivitäten zwischen 186 $\mu\text{mol/min/mg}$ und 14560 $\mu\text{mol/min/mg}$ bestimmt, wobei MatB die geringste und CitZ die höchste spezifische Aktivität aufweist. Dies bedeutet, dass für den gleichen Substratumsatz pro Zeiteinheit für MatB die höchste und für CitZ die geringste Enzym-Konzentration eingesetzt werden muss. Anzumerken sei an dieser Stelle, dass bedingt durch Unreinheiten der Ausgangssubstanzen die Konzentrationen von AcCoA und CoA bereits zu Beginn der Reaktion erhöht sind. Somit können die bestimmten Aktivitäten durch das Vorhandensein der Produkte beeinflusst sein und somit möglicherweise aufgrund von zuvor diskutierten Hemmungseffekten (siehe Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme*) nicht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit abbilden. Aufgrund des Substrat-Überschusses und der insgesamt geringen Umsätze sollte der Einfluss jedoch verhältnismäßig gering sein und die Aktivitäten näherungsweise richtig sein. Diese Ergebnisse zur spezifischen Aktivität lassen sich zu einem späteren Zeitpunkt dennoch zur kinetischen Modellierung zur Produktion der Polyketid-Grundbausteine CoA, MalCoA und AcCoA oder darauf aufbauenden Polyketiden mittels immobilisierten MatB, MatA und CitZ in einer technischen Anwendung nutzen.

Der Vergleich der Aktivitäten der nativen (Tabelle 9 S.96) und der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ (Tabelle 10 S.99) wird in dieser Arbeit rein qualitativ betrachtet, da neben der Immobilisierung auch gleichzeitig eine Reduzierung der Einfrier- und Auftauzyklen zur Aktivitätserhöhung (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) einherging. Damit werden zwei vermeintlich gegenläufige Effekte der Aktivitätsverringering und Aktivitätserhöhung auftreten.

Entsprechend lässt sich der Einfluss der Immobilisierung auf die Aktivität der Enzyme nicht quantitativ betrachten. Dennoch lässt sich qualitativ betrachtet festhalten, dass die Aktivität der hier verwendeten nativen und immobilisierten Enzyme vergleichbar ist. Der positive Einfluss der Verringerung der Einfrier- und Auftauzyklen auf den Umsatz der Enzymreaktionen, welcher in einem vorhergehenden Kapitel (siehe Kapitel 3.4.5 *Stabilität der Enzyme*) quantifiziert wurde, und der negative Effekt der Immobilisierung auf die Aktivität der Enzyme scheinen sich näherungsweise gegeneinander aufzuheben. Somit ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mit einer Verringerung der Aktivität der genutzten immobilisierten Enzyme zu rechnen. Da die Immobilisierung auf Ni-NTA Beads nicht kovalenter Natur ist und im Rahmen dieser Arbeit nur zu Demonstrationszwecken genutzt wird (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*) wurde der Effekt der Immobilisierung hinsichtlich der Aktivität der Enzyme nicht näher quantitativ untersucht.

3.7 CE integriertes enzymatisches Reaktorsystem

Im Rahmen der im Leibniz Research Cluster (LRC) Projekt „Bio/synthetische multifunktionale Mikroproduktionseinheiten - neuartige Wege der Wirkstoffentwicklung“ angesiedelten Arbeit war es das übergeordnete Ziel, ein enzymatisches Reaktorsystem zur nachhaltigen Produktion von Polyketid-Grundbausteinen, Polyketiden und potenziellen Wirkstoffen zu etablieren. Zur Erreichung dieses Ziels ist es ganz nach dem Leitmotiv *Theoria cum praxi* der Leibniz-Gemeinschaft von entscheidender Bedeutung, durch die Kombination von Theorie und Praxis im Rahmen anwendungsorientierter Grundlagenforschung zur Entwicklung von neuen Technologien, Prozessen und Verfahren zu gelangen. Die bislang abgehandelten Kapitel zur Entwicklung einer analytischen Methode und die damit ermöglichte Charakterisierung von Spezifität, Nutzbarkeit und Kinetik der Enzymreaktionen der sowohl nativen als auch immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ bilden die Grundlage für eine anschließende technische Anwendung. Eine solche im Verlauf dieser Projektarbeit entwickelte technische Anwendung in Form eines enzymatischen Reaktorsystems, dass aufbauend auf dem Cofaktor CoA die Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA bei gleichzeitigem Recycling von CoA produzieren kann, wird in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

3.7.1 Auslegung des Reaktorsystems

Im Rahmen der Auslegung des zu entwickelnden enzymatischen Reaktorsystems wurden zunächst einmal die Ansprüche an ein solches System definiert. Grundsätzlich sollte das Design des Reaktors eine Verwendung der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ ermöglichen, wobei diese entweder magnetisch oder siebtechnisch lokalisiert werden. Dabei wäre es von Vorteil, wenn die immobilisierten Enzyme wiederverwendet werden könnten. Zudem sollte das Reaktorsystem

als einen ersten Schritt zur Demonstration einer industriellen Nutzbarkeit ein *Upscaling* im Vergleich zu den bisherigen *Batch* Ansätzen darstellen und im Durchfluss betrieben werden können. Darüber hinaus sollte es im Idealfall eine Etablierung der entwickelten Standard CZE-UV/Vis Methode zur Überwachung der enzymatischen Reaktionen im Reaktorsystem ermöglichen, kostengünstig produziert, ressourcenschonend genutzt und unter definierten Reaktionsbedingungen (z.B. Temperatur) betrieben werden können. Das Ergebnis dieser Überlegungen ist der nachfolgend dargestellte in die CE integrierte zyklische Durchfluss-Membranreaktor.

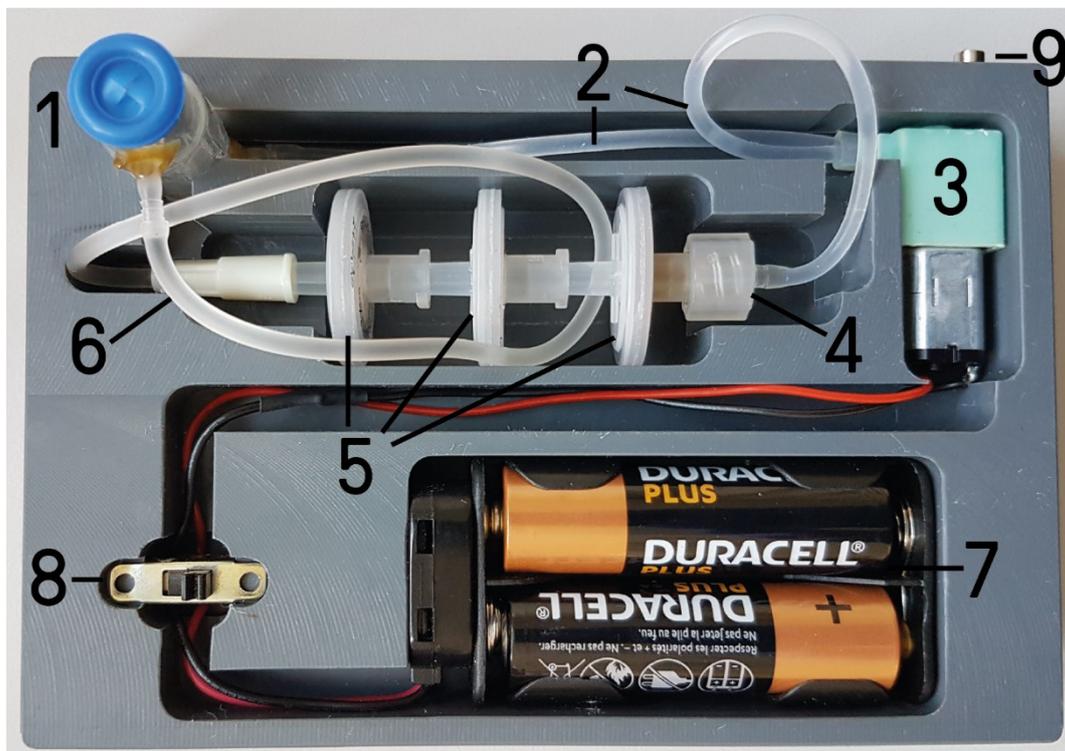


Abbildung 33: Reaktordesign des in die CE integrierten zyklischen Durchfluss-Membranreaktors. 1,5 ml Standard CE Vial mit CE Vial Anschlussstücken (1), Peristaltik-Pumpen Schlauch (2), Peristaltik-Pumpe (3), Schlauch/Spritzenfilter-Adapter (4), Spritzenfilter (5), abgeschnittene Flügelkanüle (6), Batterien und Batterien Halter (7), Kippschalter (8) und Magneten (9). Detaillierte Informationen zu den verwendeten Materialien sind im Kapitel 6.1 zusammengetragen. Die Ideenfindung und Umsetzung des Reaktordesigns erfolgte zusammen mit Erik Freier, Ute Münchberg und der am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. ansässigen Werkstatt. Eine technische Zeichnung lässt sich im Anhang finden (siehe Kapitel 8 *Anhang*).

Die Basis des Reaktors bildet ein aus inertem Polyvinylchlorid (PVC) gefertigter Block, in den die notwendigen Strukturen für die Reaktorkomponenten geätzt wurden. Der Block entspricht von seinen Maßen her dem originalen *48-Vial Sample Tray* (AB Sciex) und lässt sich somit in das *Inlet Sample Tray* der CE einsetzen. In diesen Grundblock wurden verschiedene Reaktorkomponenten eingesetzt, darunter ein vom *Autosampler* anfahrbares 1,5 ml Standard CE Vial (1). Das CE Vial wurde unten (in

Richtung Peristaltik-Pumpe) und oben (in Richtung Flügelkanüle) mit zwei Bohrungen versehen, in die zwei eigens hergestellte CE Vial Anschlussstücke gesteckt und mit einem Heißkleber befestigt wurden. An das untere Anschlussstück wurde ein Peristaltik-Pumpen Schlauch (2) angebracht, der über die Peristaltik-Pumpe (3) mit einem Schlauch/Spritzenfilter-Adapter (4) verbunden ist. An den Adapter wurden drei Spritzenfilter (5) befestigt, die wiederum über eine abgeschnittene Flügelkanüle (6) mit dem 1,5 ml Standard CE Vial verbunden sind. Die Pumpe wird mit einer Batteriequelle (7) betrieben und lässt sich über den Kippschalter (8) ein- und ausschalten. Zusätzlich mussten außen am Reaktorblock mehrere Magneten (9) angebracht werden, die zur Orientierung und korrekten Positionierung des *Autosamplers* dienen.

Dieses Reaktordesign vereint alle zuvor gestellten Ansprüche. Die auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ lassen sich separat auf die Membranen der Spritzenfilter auftragen (siehe Kapitel 6.12.1 *Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen*) und können die Spritzenfilter nicht passieren. Damit wird zum einen verhindert, dass Beads in das 1,5 ml Standard CE Vial gelangen und ggf. das Messsystem, wie bereits beobachtet (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*), nach dessen Injektion stören. Zum anderen können die auf den Membranen aufgetragenen Beads gleichmäßig vom Reaktions-Mix durchströmt werden. Die Beads müssen somit nicht mehr, wie zuvor bei den *Batch* Reaktionen, mit einem Magneten zurückgehalten werden. Die bessere Durchströmung der mit Enzymen belegten Beads birgt zudem das Potenzial zur Erlangung höherer Umsätze bei den Enzymreaktionen. Außerdem lassen sich die Art und Anzahl der mit immobilisierten Enzymen belegten Spritzenfilter modular austauschen und wiederverwenden. Darüber hinaus bestehen nahezu alle verwendeten Reaktorbestandteile aus günstigen Einwegartikeln, die bei Bedarf ohne großen Aufwand ausgetauscht werden können. Das Reaktorvolumen (2,5 mL) wurde im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten *Batch* Reaktionen (80 µL) um einen Faktor von etwa 30 erhöht. Zudem arbeitet der im zyklischen Durchfluss betriebene Reaktor mit einer den Dimensionen entsprechend leistungsfähigen Peristaltik-Pumpe, mit der Flüsse von ca. 1,1 mL/min realisiert werden und damit ein hoher Durchsatz bei den enzymatischen Reaktionen gewährleistet wird. Der größte Vorteil dieses Reaktordesigns besteht allerdings darin, dass der Reaktor in die CE integriert werden kann (siehe Kapitel 6.12.3 *Zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor*) und die Enzymreaktionen durch automatisierte Probennahme aus dem 1,5 ml CE Vial bei einer definierten Temperatur zeitaufgelöst verfolgt werden können. Somit kann die bereits bestehende Standard CZE-UV/Vis Methode weiterverwendet werden.

3.7.2 Stabilität der Enzym-Immobilisierung

Auf Basis der Ergebnisse zu den Analysen der zeitaufgelösten Reaktionen der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*) konnte bereits die Nutzbarkeit der immobilisierten Enzyme bestätigt und deren Aktivität abgeschätzt werden. Eine bislang ungeklärte Fragestellung besteht allerdings hinsichtlich der Stabilität der auf Ni-NTA Beads etablierten Immobilisierung der Enzyme. Die Stabilität der Enzym-Immobilisierung ist außerdem im Rahmen einer Wiederverwendung der auf den Filtermembranen aufgetragenen Beads von entscheidender Bedeutung. Dabei lässt sich dieser Sachverhalt mit Hilfe des Reaktors aufgrund des gewählten Reaktordesigns besonders anschaulich aufklären.

Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes werden drei zeitaufgelöste Reaktor-Reaktionen mit immobilisierten MatB, MatA und CitZ an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei die mit immobilisierten Enzymen belegten Spritzenfilter wiederverwendet werden. Zusätzlich wird der Reaktor zwischen den Reaktionen gespült, sodass durch Auflösung des Ni-NTA-Enzym-Komplexes potenziell entstandenes natives Enzym entfernt wird. Diese Vorgehensweise wird dazu führen, dass im Falle einer nicht stabilen Immobilisierung, aufgrund eines Verlustes an Enzym, sinkende Umsätze zwischen den Reaktionen beobachtet werden. Zur Sicherstellung, dass der Reaktor von allen Rückständen der vorherigen enzymatischen Reaktion befreit werden kann, wurde zu Testzwecken zunächst eine Reaktion mit immobilisierten MatB, MatA und CitZ im Reaktor durchgeführt. Der erhaltene Reaktions-Mix wurde anschließend mit der Standard CZE-UV/Vis Methode analysiert und als Referenzwert bei der Reaktorreinigung verwendet. Daraufhin wurde der Reaktor 10, 15 und 20 Spülvorgängen unterzogen (siehe Kapitel 6.12.4 *Untersuchung zur Stabilität der Enzym-Immobilisierung*) und der Fortschritt der Reaktorreinigung durch die Analyse des Reaktor-Inhaltes mit der Standard CZE-UV/Vis Methode dokumentiert. Die Ergebnisse zur Reaktorreinigung sind nachfolgend dargestellt.

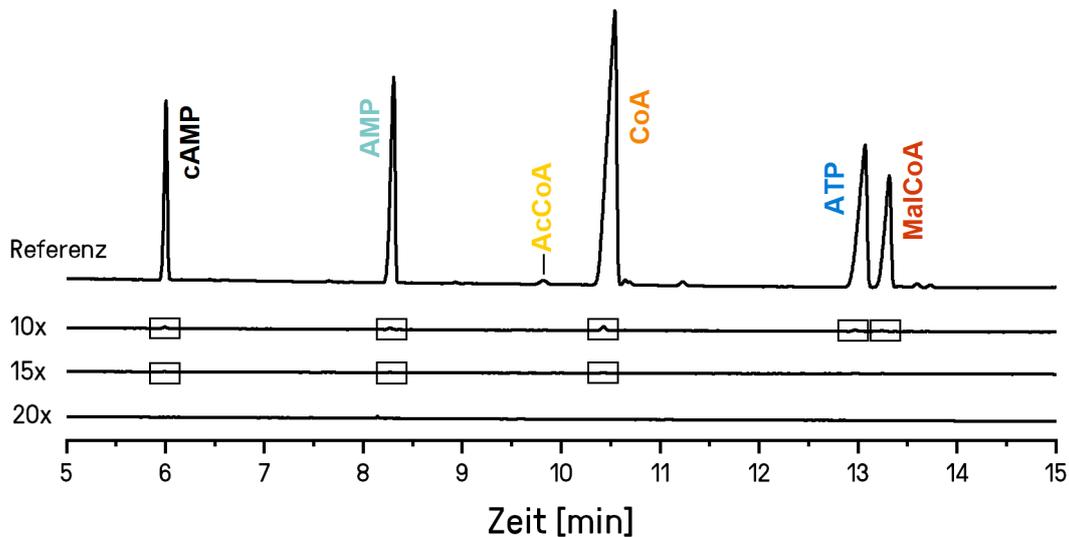


Abbildung 34: Reinigung des Reaktors nach einer enzymatischen Reaktion. Darstellung der mit Hilfe der Standard CZE-UV/Vis Methode erhaltenen Elektropherogramme zur Dokumentation des Reinigungsfortschritts (Kapitel 6.12.4). Abgebildet sind die bei der Analyse des Reaktions-Mixes der enzymatischen Reaktor-Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ (Referenz) und die nach 10 (10x), 15 (15x) und 20 Spülvorgängen (20x) erhaltenen Elektropherogramme.

Bei Betrachtung des Elektropherogramms zur Analyse des Reaktions-Mixes der Reaktor-Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ lassen sich die Edukte CoA und ATP, die Intermediate MalCoA und AcCoA, das Produkt AMP und der interne Standard cAMP nachweisen. Nach der Durchführung von 10 Spülvorgängen des Reaktors lassen sich anhand des Elektropherogramms kleinste Mengen an Rückständen finden. Nach der Durchführung von 15 Spülvorgängen lassen sich anhand des Elektropherogramms nur noch Spuren von Rückständen nachweisen. Bei einer Anzahl von insgesamt 20 Spülvorgängen lassen sich anhand des Elektropherogramms keine Rückstände mehr nachweisen. Daher wurde eine Anzahl von 20 Spülvorgängen für die Reaktorreinigung zwischen den nachfolgenden Reaktionen zur Untersuchung der Stabilität der Immobilisierung festgelegt.

Zur Untersuchung der Stabilität der Immobilisierung wurden anschließend drei zeitaufgelöste Reaktor-Reaktionen mit immobilisierten MatB/MatA/CitZ an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei die mit immobilisierten Enzymen belegten Spritzenfilter wiederverwendet wurden. Zwischen den Enzymreaktionen wurde der Reaktor 20 Spülvorgängen ausgesetzt. Aufgrund des hohen Maßes an Überschneidung dieses und der vorherigen Kapitel in Bezug auf die erzielten Ergebnisse zu den zeitaufgelösten Reaktionen von immobilisierten Enzymen, werden im Folgenden nur für die spezielle Untersuchung notwendigen neuen Erkenntnisse beschrieben. Zur Ergänzung der hier erzielten Ergebnisse sei auf die Kapitel 3.4 *Charakterisierung von Reaktionen nativer Enzyme* und 3.5

Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme verwiesen. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität der Immobilisierung sind nachfolgend dargestellt.

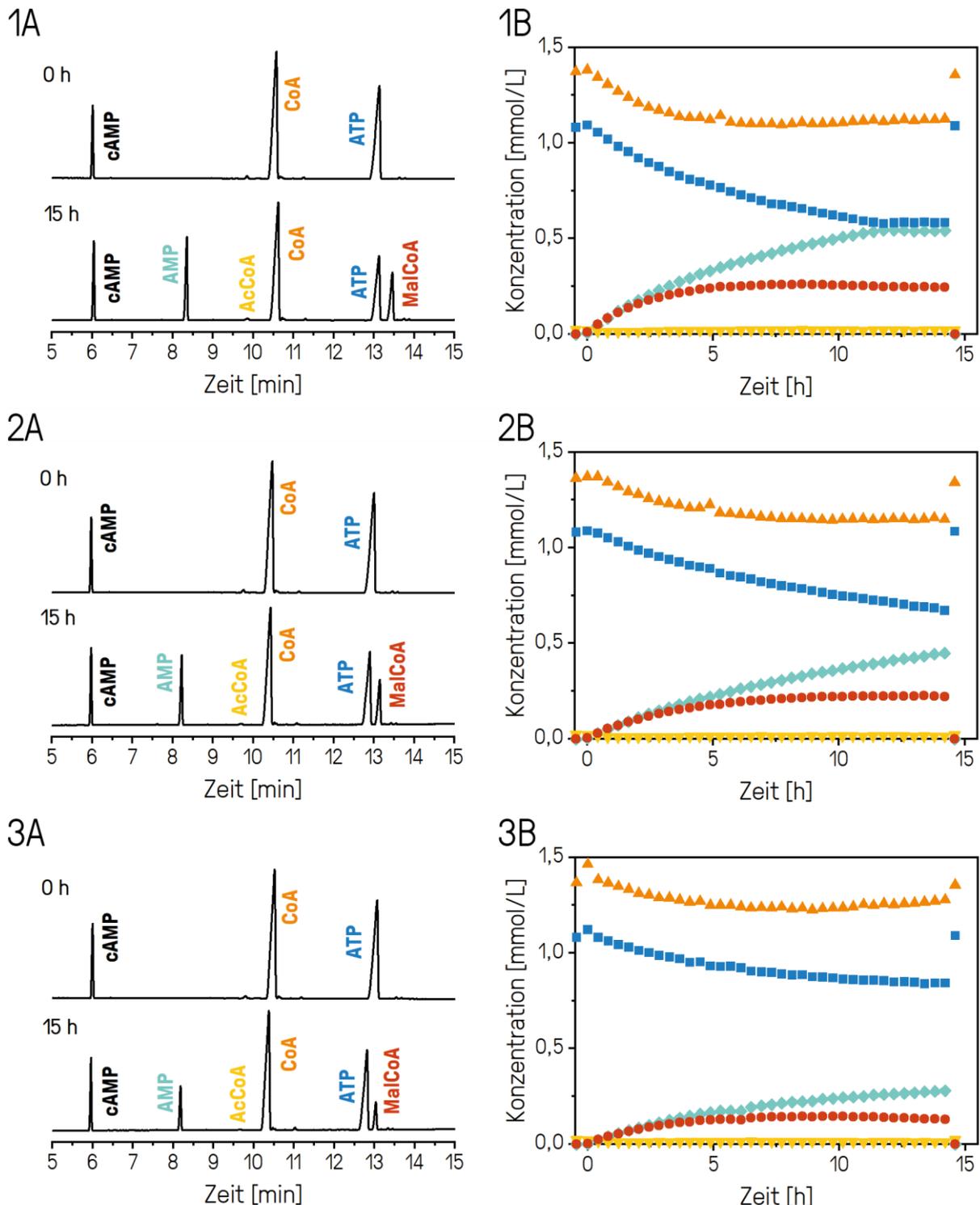


Abbildung 35: Untersuchung zur Stabilität der Enzym-Immobilisierung. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB/MatA/CitZ nach ein (1A, 1B), zwei (2A, 2B) und drei Reaktor-Reaktionen (3A, 3B) im standardmäßigen Reaktions-Mix (Kapitel 6.12.3). Die zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen erfolgten als Einzelmessung. Es wurden jeweils die gleichen mit immobilisierten Enzymen beladenen Spritzenfilter bei jeweiliger Neuansetzung des Edukt-Mixes verwendet. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Reaktor-Reaktionen von immobilisierten MatB/MatA/CitZ (1A, 2A, 3A) zeigen neben den Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP und MalCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelösten Reaktor-Reaktion (1B, 2B, 3B) bestätigt. Dabei lässt sich eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine kontinuierliche, nicht-äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration erkennen. Ab einer Reaktionszeit von ca. 2,5 h divergieren die Konzentrationsverläufe sowohl von CoA und ATP als auch von AMP und MalCoA. Zudem ist die Konzentration von AcCoA konstant im niedrigen Konzentrationsbereich. Es lässt sich außerdem ein sinkender Umsatz zwischen den Reaktor-Reaktionen erkennen. Dabei erfolgt die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der zyklischen Reaktor-Reaktionen bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP von etwa 56 %, 41 % und 26 % erreicht. Somit sinkt der beobachtete Umsatz der Reaktor-Reaktionen mit jeder Wiederverwendung der mit auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ belegten Spritzenfilter um ca. 15 %. Somit scheint die mittels Enzym-Ni-NTA Chelat-Komplexes ermöglichte Immobilisierung der Enzyme auf Ni-NTA Beads unter den gewählten Bedingungen zumindest für MatB nicht stabil zu sein. Die Evaluierung der Stabilität der Immobilisierung der anderen Enzyme gestaltet sich anhand der vorliegenden Daten schwierig. Da es sich bei allen Enzymen allerdings um die gleiche Form der Immobilisierung handelt, ist es denkbar, dass die Stabilität der Immobilisierung aller Enzyme vergleichbar miteinander ist. Auch wenn es sich bei Chelat-Komplexen in der Regel um stabile Verbindungen handelt, ist diese Art der Bindung nicht kovalenter Natur und damit reversibel ¹⁴³. Daher ist es denkbar, dass die durch kontinuierliche Durchströmung der auf den Spritzenfiltern abgelegten Beads erzeugten Schereffekte ⁷⁸ eine erneute Mobilisierung der Enzyme verursacht. Dadurch würden die Enzyme im Reaktions-Mix gelöst und mit diesem durch die Spülvorgänge ausgewaschen werden. Eine Folge daraus wären die beobachteten sinkenden Umsätze bei den Reaktor-Reaktionen bei Wiederverwendung der mit immobilisierten Enzymen belegten Spritzenfilter. Eine zeitliche Komponente hinsichtlich der Inaktivierung der Enzyme kann vermutlich ausgeschlossen werden, da bei den zeitaufgelösten Reaktionen der immobilisierten Enzyme (siehe Kapitel 3.5.2 *Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ*) ebenfalls die gleiche Charge an immobilisierten Enzymen an verschiedenen Tagen verwendet wurde und nachweislich keine Umsatzrückgänge zu beobachten waren.

Zur Klärung, ob die Enzyme tatsächlich von den Ni-NTA Beads gelöst werden, wurden CZE-LIF Messungen des Reaktions-Mixes einer abgelaufenen Reaktor-Reaktion durchgeführt (siehe Kapitel 6.7.2 *Standard CZE-LIF Methode*). Theoretisch sollte sich zumindest MatB im Reaktions-Mix über dessen fluoreszierenden GFP-Tag nachweisen lassen (siehe Kapitel 3.4.6 *Nachweis der Enzyme mittels CZE-*

LIF). Allerdings konnte mit den CZE-LIF Messungen des Reaktions-Mixes kein MatB nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Konzentration des abgelösten MatB zu gering für einen Nachweis. Darüber hinaus wurde freundlicherweise eine weitere Fluoreszenz-Messung mit einem Leica Mikroskop von Ute Münchberg (ISAS e.V.) durchgeführt, mit welchem eine höhere Laserleistung und damit eine höhere Nachweisempfindlichkeit erreicht werden konnte (Anregungswellenlänge: 488 nm, Detektionswellenlängen: 500-700 nm). Selbst die Messung einer eingetrockneten Probe des Reaktions-Mixes ließ keinen eindeutigen Nachweis von MatB zu. Denkbar wäre, dass MatB an den Reaktor-Komponenten unspezifisch gebunden wird und nicht länger im Reaktions-Mix gelöst ist. Weiterhin wäre es möglich, dass der Anteil an mobilisierten MatB sehr gering ist, dieser durch eine 20-fache Spülung des Reaktors mit GEFI jedoch signifikant erhöht wird. Entsprechend ist die Fragestellung nach der Stabilität der Immobilisierung weiter ungeklärt. Abgesehen von einer möglichen Instabilität der Immobilisierung sollte in Betracht gezogen werden, dass auch die nativen Enzyme aufgrund von Schereffekten im Durchfluss denaturiert und inaktiviert werden könnten. Der beobachtete Effekt sinkender Umsätze wäre in diesem Fall der gleiche.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass eine Wiederverwendung der auf Spritzenfiltern abgelegten auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ im Reaktor aufgrund einer vermutlich im Durchflussreaktor nicht ausreichend stabilen Immobilisierung nicht erfolgen kann. Daher werden für alle folgenden Reaktor-Reaktionen jeweils neue Spritzenfilter mit immobilisierten Enzymen bestückt, wobei immer dieselbe Immobilisierungscharge verwendet wird. Langfristig stellt sich allerdings die Frage nach einer alternativen Immobilisierungsstrategie die eine möglichst kovalente Immobilisierung der Enzyme an ein Trägermaterial ermöglicht. Erste Erfolge im Rahmen des LRC-Projektes konnten bereits erzielt werden (siehe Kapitel 5.1 Optimierungsmöglichkeiten des Produktionssystems).

3.7.3 Reaktion von MatB/MatA/CitZ

Im Anschluss an die Untersuchungen zur Stabilität der Immobilisierung wurde die Wiederholbarkeit der enzymatischen Reaktionen bei der Verwendung des Reaktors evaluiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die Präparation des Reaktors und die enzymatischen Reaktionen mit auf Ni-NTA Beads immobilisierten MatB, MatA und CitZ im Reaktor wiederholbar durchgeführt werden können, um eine zuverlässige Produktion der Polyketid-Grundbausteine oder potenzieller Polyketide zu gewährleisten. Entsprechend wurden drei zeitaufgelöste Reaktor-Reaktionen mit auf den Filtermembranen abgelegten immobilisierten Enzymen MatB, MatA und CitZ durchgeführt, wobei jeweils die gleiche Immobilisierungscharge bei jeweiliger Neuansetzung des Reaktions-Mixes verwendet und eine vollständige Präparation des Reaktors getätigt wurde (siehe Kapitel 6.12 *Enzym-Reaktionen im Reaktor*). Die Ergebnisse zur Untersuchung der Wiederholbarkeit der Reaktor-Reaktionen sind nachfolgend dargestellt.

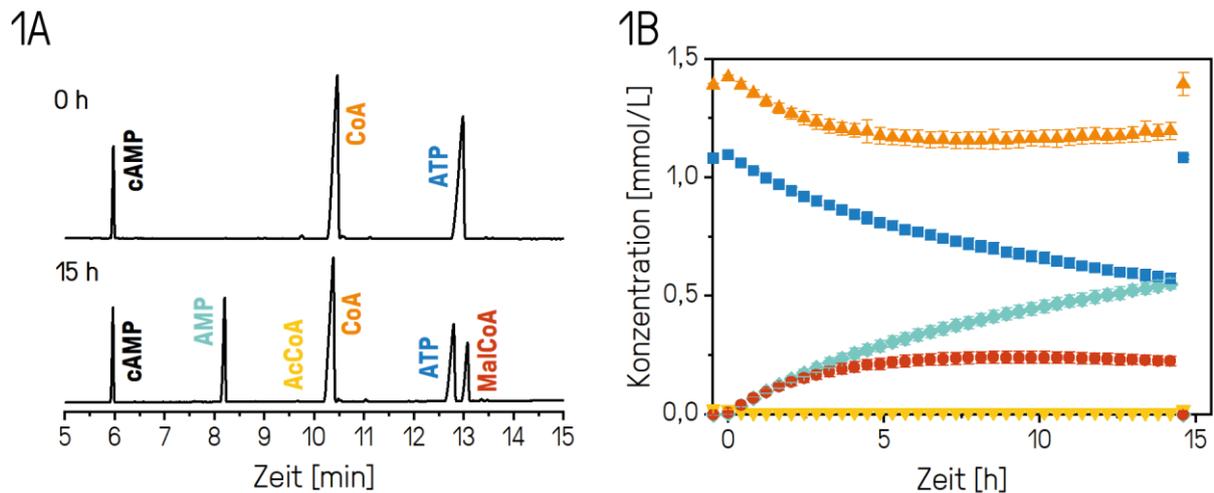


Abbildung 36: Untersuchung zur Wiederholbarkeit der Reaktor-Reaktionen. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von immobilisierten MatB, MatA und CitZ im Reaktor (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix (Kapitel 6.12.3). Die zeitaufgelösten Reaktor-Reaktionen erfolgten als Triplikate. Es wurde jeweils die gleiche Immobilisierungscharge bei jeweiliger Neuansetzung des Reaktions-Mixes verwendet und eine vollständige Präparation des Reaktors durchgeführt. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h und 15 h der Reaktor-Reaktion von immobilisierten MatB, MatA und CitZ (1A) zeigen neben den Edukt-Peaks von CoA und ATP zu Beginn der Reaktion zusätzliche Produkt-Peaks von AMP und MalCoA am Ende der Reaktionszeit. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich eine nicht-äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine nicht-äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration erkennen. Nach einer Reaktionszeit von etwa 2,5 h divergieren die Konzentrationsverläufe von CoA und ATP und von AMP und MalCoA. Sowohl die Konzentration von CoA als auch von MalCoA sind nach einer Reaktionszeit von etwa 5 h nahezu konstant. Zudem ist die Konzentration von AcCoA über den gesamten Zeitraum im niedrigen Konzentrationsbereich. Die Angabe des Umsatzes der zyklischen Reaktion erfolgt anhand der Konzentrationen von ATP und AMP, da diese nicht Teil des Recyclings sind. Insgesamt wurde ein Umsatz der Reaktor-Reaktion bezogen auf die Reaktion von ATP zu AMP über einen Zeitraum von 15 h bei 25 °C im Standard Reaktions-Mix von 51 % erreicht. Damit ist der mit der Reaktor-Reaktion erzielte Umsatz um ca. 15 % höher als die vergleichbaren *Batch* Reaktionen (36 %) der immobilisierten Enzyme (siehe Kapitel 3.5.2 *Reaktion von immobilisierten MatB/MatA/CitZ*). Zurückführen lässt sich dies möglicherweise auf die bessere Durchmischung der auf Ni-NTA Beads immobilisierten Enzyme bei der Verwendung des kontinuierlich im Durchfluss betriebenen Membranreaktors im Vergleich zu den mit Magneten zurückgehaltenen Beads bei den *Batch* Reaktionen. Grundsätzlich bewirkt eine kontinuierliche Durchströmung der Beads sich vorteilhaft auf den bei Reaktionen notwendigen Stofftransport der Reaktanden aus ⁷⁸. Durch einen höheren

Stofftransport werden wiederum höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht, die höhere Umsätze pro Zeiteinheit ermöglichen. Anhand der nicht-äquimolaren Abnahme der Konzentration von CoA und ATP lässt sich zudem das Recycling von CoA erkennen. Es wird weniger CoA verbraucht als ATP, obwohl die Reaktion von MatB äquimolar verläuft. Grund dafür ist, dass bei der von CitZ katalysierten Umsetzung von AcCoA recyceltes CoA entsteht. In der vorliegenden Reaktion ist die Konzentrationsabnahme von ATP um den Faktor 2,6 größer als die Konzentrationsabnahme von CoA. Die Diskrepanz entspricht im Wesentlichen der Menge an recycelten CoA. Ein kleiner Anteil des entstandenen CoAs ist auf die Hydrolyse von MalCoA und AcCoA zurückzuführen. Darüber hinaus zeigt sich eine hohe Wiederholbarkeit der zeitaufgelösten Reaktor-Reaktionen mit auf den Filtermembranen abgelegten immobilisierten Enzymen MatB, MatA und CitZ trotz jeweiliger Neuansetzung des Reaktions-Mixes und vollständiger Präparation des Reaktors. Weiterhin lässt sich erneut aufzeigen, dass die Enzyme der verwendeten Immobilisierungscharge keinen nachweisbaren Aktivitätsverlust über einen Zeitraum von 3 Tagen aufweisen.

Insgesamt lässt sich bei der enzymatischen Reaktor-Reaktion von auf Ni-NTA Beads immobilisierten MatB, MatA und CitZ ein zuverlässig wiederholbares Reaktions-System nachweisen, bei dem signifikante Mengen CoA recycelt und bei weiterer Optimierung der Reaktionsbedingungen potenziell hohe Umsätze bei der Produktion von Polyketid-Grundbausteinen und potenziellen Polyketiden ermöglicht werden. Zudem konnte der Umsatz bei der Verwendung des kontinuierlich betriebenen Membran-Reaktors im Vergleich zu den *Batch* Reaktionen deutlich erhöht werden.

3.7.4 Sequenzielle Zugabe von MatB, MatA und CitZ

Abgesehen von der Wiederholbarkeit der Reaktor-Reaktionen stellt die Flexibilität und die Modularität des in dieser Arbeit entwickelten kontinuierlich im Durchfluss betriebenen Membran-Reaktors einen entscheidenden Vorteil dar. Das Reaktorsystem lässt sich durch die in Art und Anzahl variablen mit Enzymen beladenen Spritzenfilter individuell an einen Produktionsprozess anpassen. Somit kann sowohl die Art als auch die Anzahl verwendeter Enzyme an ein zu produzierendes Zielmolekül ausgerichtet werden. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl möglicher Prozesse zur Herstellung von Polyketid-Grundbausteinen, aber auch darauf basierenden Polyketiden, mit einer direkten Möglichkeit zur analytischen Überwachung des Produktionsprozesses. Zur Demonstration der Flexibilität und Modularität des kontinuierlich im Durchfluss betriebenen Membran-Reaktors wurde eine zeitaufgelöste enzymatische Reaktor-Reaktion zunächst mit einem mit MatB bestückten Filter gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wurde ein zweiter mit MatA bestückter Filter zu dem bereits integrierten mit MatB bestückten Filter hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 10 h wurde ein dritter mit CitZ bestückter Filter zu den zwei mit MatB und MatA bestückten Filtern eingebaut. Anschließend wurde die Reaktor-Reaktion für weitere 15 h zeitaufgelöst verfolgt (siehe

Kapitel 6.12.5). Die entsprechend zur Untersuchung der Flexibilität und Modularität des Reaktors erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

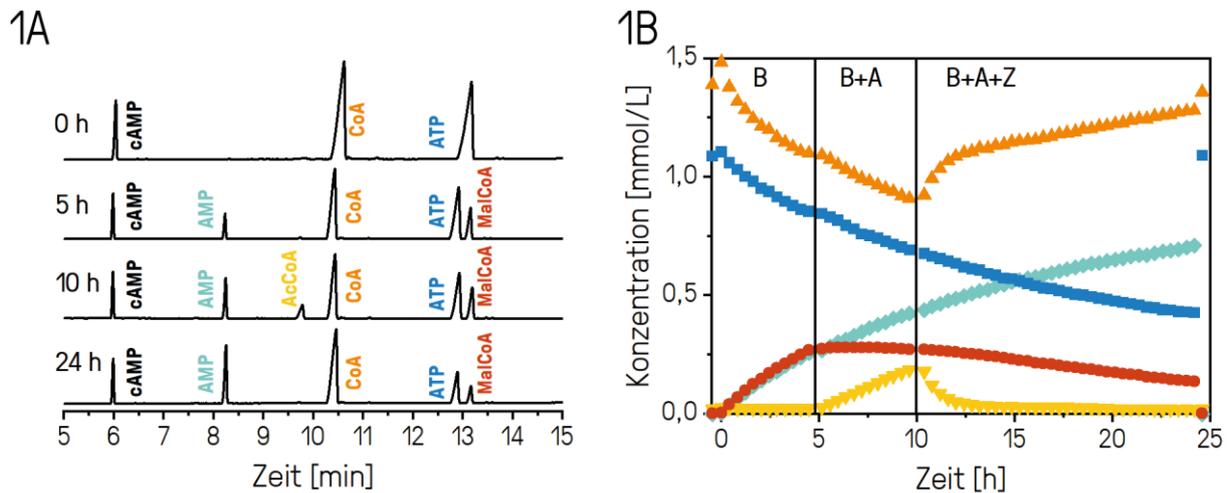


Abbildung 37: Untersuchung zur Flexibilität und Modularität des Reaktors. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h, 5 h, 10 h und 24 h (1A) der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen von sequentiell hinzugefügten immobilisierten MatB (B), MatA (B+A) und CitZ (B+A+Z) im Reaktor (1B) bei Verwendung des standardmäßigen Reaktions-Mixes (Kapitel 6.12.5). Die Reaktion wurde mit MatB gestartet. Nach 5 h wurde MatA und nach 10 h CitZ hinzugefügt. Die zeitaufgelöste Reaktor-Reaktion erfolgte als Einzelmessung. Legende: AMP (◆), ATP (■), CoA (▲), MalCoA (●) und AcCoA (▼).

Die Elektropherogramme nach 0 h, 5 h, 10 h und 24 h der Reaktor-Reaktion von sequenziell hinzugefügtem immobilisiertem MatB, MatA und CitZ (1A) bilden den groben Verlauf der Enzym-Reaktion ab. Nach einer Reaktionszeit von 0 h lassen sich zwei Peaks der Edukte ATP und CoA erkennen. Nach einer Reaktionszeit von 5 h in der Gegenwart von MatB lassen sich neben den Edukt-Peaks von CoA und ATP ebenfalls zwei Produkt-Peaks von MalCoA und AMP erkennen. Nach einer Reaktionszeit von 10 h in der Gegenwart von MatB und MatA lässt sich neben den Peaks von CoA, ATP, MalCoA und AMP ebenfalls ein Peak von AcCoA erkennen. Das letzte Elektropherogramm zeigt nach einer Reaktionszeit von 24 h erneut die Peaks von CoA, ATP, MalCoA und AMP. Diese Beobachtung wird durch die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion (1B) bestätigt. Dabei lässt sich innerhalb der ersten 5 h Reaktionszeit eine äquimolare Abnahme der ATP- und CoA Konzentration und eine äquimolare Zunahme der AMP- und MalCoA Konzentration in Gegenwart von MatB erkennen. Innerhalb von 5 h nach der Zugabe von MatA divergieren die Konzentrationsverläufe von AMP und MalCoA, wobei die Konzentration von AMP kontinuierlich ansteigt während die Konzentration von MalCoA nahezu konstant ist. Währenddessen nimmt die Konzentration von CoA und ATP weiterhin äquimolar ab. Darüber hinaus lässt sich ein zeitgleicher Anstieg der AcCoA Konzentration beobachten. Nach der

finalen Zugabe von CitZ nach einer Reaktionszeit von 10 h lassen sich diverse Effekte beobachten. Die Konzentration von ATP wird weiterhin kontinuierlich verringert und die Konzentration von AMP kontinuierlich erhöht. Zeitgleich steigt die Konzentration von CoA zügig an, während die Konzentration von AcCoA zügig abnimmt. Die MalCoA Konzentration verringert sich im gleichen Zeitraum langsam und konstant. Die Beobachtungen zur zeitaufgelösten Reaktor-Reaktion bei der sequenziellen Zugabe der Enzyme MatB, MatA und CitZ stimmen mit den bereits getätigten Beobachtungen zu Reaktionen der einzelnen Enzyme und der Enzymkaskade überein (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*). MatB katalysiert innerhalb der ersten 5 h Reaktionszeit die Bildung von MalCoA ausgehend von NaMal und CoA unter der Hydrolyse von ATP zu AMP und freiem Phosphat. Nach der Zugabe von MatA wird in weiteren 5 h Reaktionszeit zusätzlich MalCoA zu AcCoA durch Abspaltung von CO₂ umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10 h wird durch CitZ das von MatA produzierte AcCoA und die gegenwärtige Oxalessigsäure zur Bildung von CoA und Citrat genutzt. Durch die sequenzielle Zugabe der Enzyme lassen sich die Reaktionen jedes einzelnen Enzyms anhand der zeitaufgelösten Konzentrationsänderungen nachvollziehen. Besonderes Augenmerk gilt dabei nochmals dem Recycling von CoA, welches an dieser Stelle besonders prägnant nachgewiesen wird. In den letzten 15 h Reaktionszeit lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der ATP Konzentration bei gleichzeitigem kontinuierlichem Anstieg der CoA Konzentration beobachten, obwohl ATP und CoA äquimolar in der von MatB katalysierten Reaktion umgesetzt werden. Zum Ende der Reaktion wird die Ausgangskonzentration von CoA nahezu erreicht. Dies ist abermals der Nachweis, dass kein kostenintensives CoA während der Reaktionen verwirtschaftet, sondern recycelt wird.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Flexibilität und Modularität durch die sequenzielle Zugabe der mit immobilisierten Enzymen belegten Spritzenfilter nachgewiesen werden konnten. Entsprechend ergibt sich eine Vielzahl an weiteren denkbaren Produktionswegen für verschiedenste Zielmoleküle, die zu Testzwecken im kleinen miniaturisierten Maßstab hergestellt werden können. Denkbar wäre beispielsweise die Produktion von Orsellinsäure, die sich über ein Molekül AcCoA und drei Molekülen MalCoA enzymatisch über den Polyketidweg herstellen ließe. Entsprechende Polyketidsynthasen wurden bereits in verschiedenen Pilzen identifiziert ¹⁴⁶. Als ein weiteres bekanntes strukturell komplexeres Polyketid ist Erythromycin zu nennen, welches über das Enzym Desoxyerythronolid B-Synthase (DEBS) über den Polyketidweg mittels der hier hergestellten Polyketid-Grundbausteine herstellen ließe ¹⁴⁷. Ließen sich mit dem hier erarbeitenden Produktionssystem solche wirtschaftlich interessanten Polyketide herstellen, würde dies ein weiterer wichtiger demonstrativer Schritt zur zukünftigen Nutzbarkeit zellfreier enzymatischer Produktionssysteme darstellen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen des Leibniz Research Cluster (LRC) Projekts „Bio/synthetische multifunktionale Mikroproduktionseinheiten – neuartige Wege der Wirkstoffentwicklung“ wurden in dieser Arbeit einige Entwicklungsschritte zur Etablierung eines miniaturisierten Reaktorsystems zur Umsetzung einer einfachen *in vitro* Biosynthese der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA bearbeitet.

Dabei stand zunächst die Entwicklung und Validierung einer Messmethode aus dem Bereich der Trenntechniken zur Analyse der Nukleotide AMP, ADP und ATP und der Coenzyme CoA, MalCoA und AcCoA in enzymatischen Reaktionen im Vordergrund. Dabei sollte die Analysenmethode mit geringsten Probenvolumina im Nanoliter- bis Mikroliterbereich und enzymatischen Matrices mit hohem Salzgehalt ohne zusätzliche Probenvorbereitung auskommen, um potenzielle Proben aus miniaturisierten enzymatischen Reaktionssystemen zeiteffizient analysieren zu können. Zudem sollte diese spezifisch, selektiv, präzise, genau, linear und automatisierbar bei geringem instrumentellem und applikativem Aufwand sein. Eine Trenntechnik die diesen Anforderungen gerecht werden konnte war die Kapillarelektrophorese. Ausgehend von einer literaturbekannten CZE-MS Methode wurde die Analysenmethode auf die in dieser Arbeit zu bearbeitenden analytischen Fragestellung der Bestimmung von Nukleotiden und Coenzymen in enzymatischen Reaktionen angepasst. Dabei wurde zunächst aufgrund des einfacheren instrumentellen Aufbaus von einer MS- auf eine UV/Vis (PDA)-Detektion gewechselt, was die Notwendigkeit einer Optimierung der Messmethode hin zu einer vollständigen Trennung der Analyten mit sich brachte. In der Folge wurden der Kapillardruck, die Kapillarspannung, die Kapillartemperatur, die Art des Puffers, die Pufferkonzentration und der pH systematisch variiert und optimiert. Zudem wurde cAMP als geeigneter interner Standard herausgearbeitet. Sowohl die Nukleotide, Coenzyme als auch der interne Standard ließen sich final in wässriger Lösung vollständig mit der CZE-UV/Vis Methode separieren. Anschließend wurden sequenzielle Mehrfachinjektionen von enzymatischen Matrices durchgeführt, die eine Reihe von Trennproblemen bei der Verwendung der entwickelten Analysenmethode verursachten. Durch eine erneute Anpassung der Kapillardimensionen, der Injektionsparameter und der Konditionierungsbedingungen wurde die ursprüngliche Güte der Trennung wiederhergestellt.

Nach der erfolgreichen Entwicklung der Trennmethode wurde die Methode in Anlehnung an die von der *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) bereitgestellten Richtlinien zur Validierung analytischer Methoden validiert. Hinsichtlich der Spezifität und Selektivität ließen sich einzelne aber auch mehrere der Analyten zuverlässig und unabhängig voneinander bestimmen. Durch die Verwendung von intern hergestellten Referenzstandards und durch die Bestimmung von Wiederfindungsraten ließ sich zudem die Genauigkeit der Methode nachweisen. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung eines internen Standards und

zeitkorrigierter Peakflächen eine hohe analytische Präzision. Zudem wurde der Arbeitsbereich festgelegt, Linearität nachgewiesen, eine erfolgreiche Kalibrierung des Messsystems durchgeführt und eine Nachweisempfindlichkeit bis in den niedrigen einstelligen mikromolaren Konzentrationsbereich bestimmt. Mit dem erfolgreichen Abschluss der Methodenentwicklung und Methodvalidierung wurden zwei wichtige Meilensteine im Rahmen der Projektplanung erreicht, die die Grundlage für eine qualitativ hochwertige Charakterisierung des Reaktionssystems bildete.

Mit Hilfe der CZE-UV/Vis Methode wurden anschließend die Stabilitäten einiger kritischer Analyten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass CoA in der enzymatischen Matrix zur Dimerisierung neigt und dieses durch die Zugabe von TCEP stabilisiert wird. Zudem wurde eine Hydrolyse bedingte Instabilität von AcCoA und MalCoA festgestellt und innerhalb der enzymatischen Matrix und den enzymatischen Reaktionsbedingungen quantifiziert. ATP erwies sich unter gleichen Bedingungen als stabil. Mit der Evaluierung der Stabilitäten konnte eine weitere Grundlage zum Verständnis der späteren enzymatischen Reaktionen gelegt werden und die Art und der Anteil an nichtenzymatischer Degradation im Gesamtzusammenhang beschrieben werden.

Im weiteren Verlauf wurden die für diese Arbeit bereitgestellten zellfreien Enzyme Malonyl-CoA Synthetase Y3K-deGFP MatB, Malonyl-CoA Decarboxylase Y3K-mRuby MatA und Citratsynthase Y3K-eBFP CitZ hinsichtlich Spezifität und Kinetik ihrer katalysierten Reaktionen als auch ihre Nutzbarkeit zur Produktion der CoA-Fettsäureester CoA, MalCoA und AcCoA evaluiert. Dazu wurden sequenzielle Mehrfachinjektionen von Einzel- als auch Mehrenzymbreaktionen durchgeführt und die Konzentrationen der Analyten über mehrere Stunden zeitaufgelöst überwacht. Dadurch wurde die Funktionalität der nativen Enzyme einzeln als auch im Verbund nachgewiesen, wobei keine Nebenprodukte beobachtet wurden. Jedoch zeigten sich beim Einfrieren der Enzyme in flüssigen Stickstoff und anschließenden Auftauen signifikante Aktivitätsverluste, die eine Anpassung der zuvor definierten Handhabungsweise notwendig machten. Durch eine geringere Anzahl an Einfrier- und Auftauzyklen konnte folglich eine Erhöhung der Enzymaktivität und damit der Reaktionsumsätze erzielt werden.

Zur Ermöglichung einer Verwendung der Enzyme in einem Reaktorsystem wurden die Enzyme anschließend auf magnetischen Ni-NTA Beads über den strukturell integrierten His-Tag immobilisiert. Diese Form der Immobilisierung barg das Potenzial die Enzyme sowohl magnetisch als auch siebtechnisch in einem potenziellem Reaktorsystem lokalisieren zu können. Durch die Wiederholung der zuvor mit nativen Enzymen durchgeführten Reaktionen mit immobilisierten Enzymen ließ sich die Funktionalität der immobilisierten Enzyme und die Nutzbarkeit der Immobilisierung für die weitere Verwendung validieren. Darüber hinaus wurden die Aktivitäten von nativen als auch immobilisierten

Enzymen durch eine entwickelte und validierte Methode zur Inaktivierung von Enzymen durch pH-Wert Änderung für eine spätere kinetische Modellierung des Reaktionssystems in einer technischen Anwendung bestimmt. Mit erfolgreichem Abschluss dieser Entwicklungsschritte wurde der letzte bedeutsame Meilenstein vor einer technischen Anwendung erreicht. Das enzymatische Reaktionssystem wurde detailliert charakterisiert und verstanden, sodass die Basis für eine Anwendung und Bewertung der Enzyme im Reaktorsystem gegeben war.

Final wurde entsprechend ein in die CE integrierbarer miniaturisierter Durchfluss-Membranreaktor im Rahmen einer Proof-of-Concept Applikation für einfache *in vitro* Biosynthese von Citrat und der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA mit einem integriertem CoA-Recycling System entwickelt. Neben der durch eine direkte Kopplung des Reaktors mit der Analytik ermöglichten Prozessüberwachung stellt das Reaktorsystem dabei einen ersten demonstrativen Schritt für eine industrielle Nutzbarkeit dar, wobei ein *Upscaling* im Vergleich zu den bisherigen *Batch* Ansätzen und eine Arbeit im Durchfluss ermöglicht wurde. Der Reaktor lässt sich zudem im Sinne der BMBF Initiative „Nächste Generation biotechnologischer Verfahren – Biotechnologie 2020+“ zur Förderung nachhaltiger biotechnologischer Produktionsverfahren kostengünstig produzieren, ressourcenschonend nutzen und unter definierten Reaktionsbedingungen betreiben. Besonders vorteilhaft erwies sich zudem die durch den sequenziellen Einsatz von mit Enzymen beladenen Filtereinheiten nachgewiesenen Modularität des Reaktors, die eine vielfältige Nutzbarkeit und Flexibilität mit sich bringt. Zudem lassen sich die Enzyme in diesem Reaktordesign wiederverwenden. Allerdings wurde bei einer ersten Untersuchung zur Stabilität der Immobilisierung festgestellt, dass eine mehrfache Verwendung von einer Charge immobilisierter Enzyme aufgrund einer Verringerung der Enzymaktivitäten mit dieser Immobilisierungsstrategie nicht möglich scheint. Entsprechend muss in Zukunft eine alternative Immobilisierungsstrategie erarbeitet werden. Die genaue Ursache der Aktivitätsverluste im Zusammenhang mit der Immobilisierung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Dennoch wurden die Projektziele vollumfänglich erreicht und darüber hinaus durch die Entwicklung und Umsetzung eines eigenen unabhängigen Reaktorkonzeptes erweitert.

Rückblickend konnten im Rahmen dieser Arbeit bedeutsame Fortschritte bei der Umsetzung des zu Beginn des Projektes entwickelten Reaktor-Konzeptes erzielt werden. Dazu zählen vor allem die Entwicklung einer adäquaten Analytik, die erste grundlegende Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen der Enzyme MatB, MatA und CitZ, die Immobilisierung der Enzyme und dessen Verwendung in dem entwickelten vielversprechenden Reaktor-Prototypen. Ausstehend ist die Kopplung des Reaktors an eine Free-Flow Elektrophorese (FFE) Einheit zur kontinuierlichen Separation der Produkte von der Reaktionsmatrix und die finale Integration einer zellfreien Polyketid-Synthase

zur Herstellung eines potenziellen Wirkstoffs im Reaktorsystem. Beides ist gegenwärtig Teil vielversprechender, auf diesem Projekt aufbauender Forschung. Weitere potenziell zu erforschende Aspekte werden im nachfolgenden Kapitel ausblickend dargestellt.

5 Ausblick

5.1 Optimierungsmöglichkeiten des Produktionssystems

In dieser Arbeit wurden die Enzyme überwiegend hinsichtlich ihrer Funktionalität, Spezifität und Nutzbarkeit sowohl in ihrer nativen als auch immobilisierten Form untersucht. Dabei galten diese Untersuchungen als erste Hürde für eine technische Anwendung der Enzyme in einem Produktionssystem. Da sich die Enzyme grundsätzlich als nutzbar erwiesen, sollte in einem weiteren Schritt die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsätze im Vordergrund stehen. Bislang wurde unter empirisch gewonnenen und anschließend standardisierten Reaktionsbedingungen zur grundlegenden Charakterisierung der Enzymreaktionen gearbeitet. Allerdings ist auch bekannt, dass die Umgebungsbedingungen der Enzyme maßgeblichen Einfluss auf dessen Aktivität haben⁷⁸. Dabei wird die räumliche Struktur und damit die Aktivität der Enzyme durch Temperatur, Art des Puffers, pH-Wert und Ionenkonzentration beeinflusst. Vor allem durch eine Erhöhung der Temperatur sind leicht umzusetzende Aktivitätssteigerungen zu erwarten. Dabei bietet sich vor allem die Verwendung des entwickelten Reaktorsystems zur Optimierung der Reaktions-Temperatur an, da es sich dabei um ein nahezu geschlossenes System mit einem geringen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis handelt, wodurch ein geringerer Verdampfungseffekt zum Tragen kommt. Entsprechend bietet sich die Möglichkeit, das Reaktions-Volumen zur besseren Abschätzung des Temperatureffekts annähernd konstant zu halten. Hinweise bezüglich der optimalen Puffersysteme können darüber hinaus auch entsprechende Publikationen liefern²². In der Literatur können sich außerdem spezielle Optimierungsmöglichkeiten der einzelnen Enzyme finden lassen. Beispielsweise stellt Magnesium-Chlorid einen wichtigen Cofaktor von ATP dar, wobei das Magnesium die negativen Ladungen an den Sauerstoffen der Phosphatgruppe bindet und den Phosphattransfer erleichtert¹⁴⁸. Denkbar wäre entsprechend, dass die Aktivität von MatB durch die Gegenwart von Magnesium-Chlorid erhöht werden könnte. Zudem lässt sich eine durch ATP bedingte Inhibierung von CitZ ebenfalls durch eine Zugabe von Magnesium-Chlorid reduzieren^{149,150}. Grundsätzlich gestalten sich Optimierungsmaßnahmen bei der Verwendung von kaskadierten, enzymatischen Reaktionssystemen allerdings schwierig und zeitaufwendig, da eine Optimierung anhand der jeweiligen Enzyme evaluiert werden muss.

Darüber hinaus sollten die Substrat-Konzentrationen optimiert werden, da die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration erhöht wird und den Maximalwert bei Substratsättigung erreicht⁷⁸. Dazu würde sich die in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der Aktivitäten oder zur systematischen Evaluierung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen die Vorgehensweise nach der Michaelis-Menten Theorie^{78,82,83} anbieten.

Interessant wäre außerdem die Etablierung eines ATP Recycling-Systems, das die Wirtschaftlichkeit der Produktion durch Wiederherstellung von verbrauchten, kostenintensiven ATP erhöhen würde. Entsprechende ATP Recycling-Systeme lassen sich entsprechender Fachliteratur bereits finden¹⁵¹ und durch die Verwendung zusätzlicher Enzyme etablieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Anpassung der aktuellen oder die Entwicklung einer neuen Immobilisierungsstrategie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits festgestellt, dass die Immobilisierung der Enzyme auf magnetischen Ni-NTA Beads zwar relativ stabil aber dennoch reversibel scheint. Dies führte dazu, dass die auf den Beads immobilisierten Enzyme im Durchflusssystem des Reaktors möglicherweise mobilisiert, inaktiviert und die Umsätze entsprechend gesenkt werden. Eine mögliche Ursache stellen die diskutierten Schereffekte dar (siehe Kapitel 3.7.2 *Stabilität der Enzym-Immobilisierung*). Diese ließen sich beispielsweise durch eine Reduzierung der Flussrate oder eine Erhöhung des Widerstands der Filter im Reaktor reduzieren. Möglicherweise wäre die Immobilisierung unter angepassten Bedingungen ausreichend stabil. Andererseits ließe sich mit größerem zeitlichem Aufwand ebenso eine neue Immobilisierungsstrategie entwickeln (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*), bei der die Enzyme beispielsweise kovalent gebunden werden. Erste Erfolge hinsichtlich einer neuen Immobilisierungsstrategie ließen sich im Rahmen des LRC Projekts bereits bei der zellfreien Proteinsynthese in Mikrogelen erzielen¹⁵². Denkbar ist, dass die Immobilisierungsstrategie auf die hier verwendeten Enzyme übertragen und die Mikrogele im Reaktorsystem verwendet werden könnten.

5.2 Präparative Reinigung von enzymatischen Reaktionsmatrices mittels FFE

Die zu Beginn dieser Arbeit vorgestellte Vision zur Erstellung eines kontinuierlich betriebenen Reaktorsystems mit analytischer Prozessüberwachung zur Herstellung potenzieller Wirkstoffe oder deren Grundbausteinen im Rahmen des Leibniz Research Cluster (LRC) Projekts „Bio/synthetische multifunktionale Mikroproduktionseinheiten - neuartige Wege der Wirkstoffentwicklung“ wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt. Allerdings beinhaltete das ursprüngliche Reaktordesign neben den in Reihe geschalteten miniaturisierten Produktionseinheiten ebenfalls eine Einheit zur kontinuierlichen präparativen Trennung der enzymatischen Matrices. Diese sollte eine Rückführung von nicht umgesetzten Edukten und eine Abführung von Produkten ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Etablierung einer solchen Einheit unterstützend begleitet.

Im Rahmen des LRC Projekts wurde die mikrofluidische Freifluss Elektrophorese (μ FFE)^{27,28} als Tool zur präparativen Auftrennung der enzymatischen Reaktionsmatrices hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit evaluiert. Bei der μ FFE wird eine Probe zunächst über einen separaten Kanal in eine Trennkammer geführt (Abbildung 38 S.119). In der Trennkammer wird die Probenlösung durch den gerichteten Fluss der umgebenden Pufferlösung in Richtung der Trennkammerausgänge befördert. Orthogonal zur Fließrichtung wird ein elektrisches Feld mit Hilfe von zwei an der Kammer anliegenden Elektroden erzeugt, sodass die Analyt-Ionen senkrecht zur Fließrichtung elektrophoretisch ablenkt werden. Aufgrund unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeiten der Analyt-Ionen ergibt sich eine Trennung der Analyten in verschiedene Zonen, die sich über die Trennkammer hinweg verteilen und unterschiedliche Ausgänge der Trennkammer erreichen. Über diese verschiedenen Ausgänge lassen sich die einzelnen Analyten sammeln. Im Rahmen des LRC Projektes bietet die Etablierung der μ FFE entsprechend die Möglichkeit die Substanzgemische der vorangeschalteten Reaktoreinheiten zu trennen und kostenintensive Reaktanden zurück- und Produkte abzuführen. Da es sich bei der FFE und der CE grundsätzlich um zwei elektrophoretische Trenntechniken handelt, wenngleich auch mit analytischem und präparativem Nutzen, lassen sich beide Techniken prinzipiell für dieselbe Trennaufgabe verwenden, Methoden teilweise übertragen und die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen. Zudem entsprechen die mit der μ FFE zu trennenden Analyten den Analyten der enzymatischen Reaktionen. Aus diesem Grund wurde die hier entwickelte Standard CZE-UV/Vis Methode zudem für die Validierung der Ergebnisse der μ FFE-Trennungen verwendet. Dabei wurde eine 0,5 mM Probe bestehend aus AMP, ATP und CoA in die μ FFE gegeben und getrennt. Die über die Trennkammerausgänge erhaltenen Lösungen wurden gesammelt und mit Hilfe der Standard CZE-UV/Vis Methode analysiert. Zudem wurde ein Referenz-Mix mit den zu erwartenden Analyten AMP, ADP, ATP und CoA gemessen, wobei ADP lediglich zur Identifikation als potenzielles Hydrolyse Produkt

von ATP hinzugefügt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind neben einer schematischen Darstellung einer μ FEE-Trennung nachfolgend abgebildet.

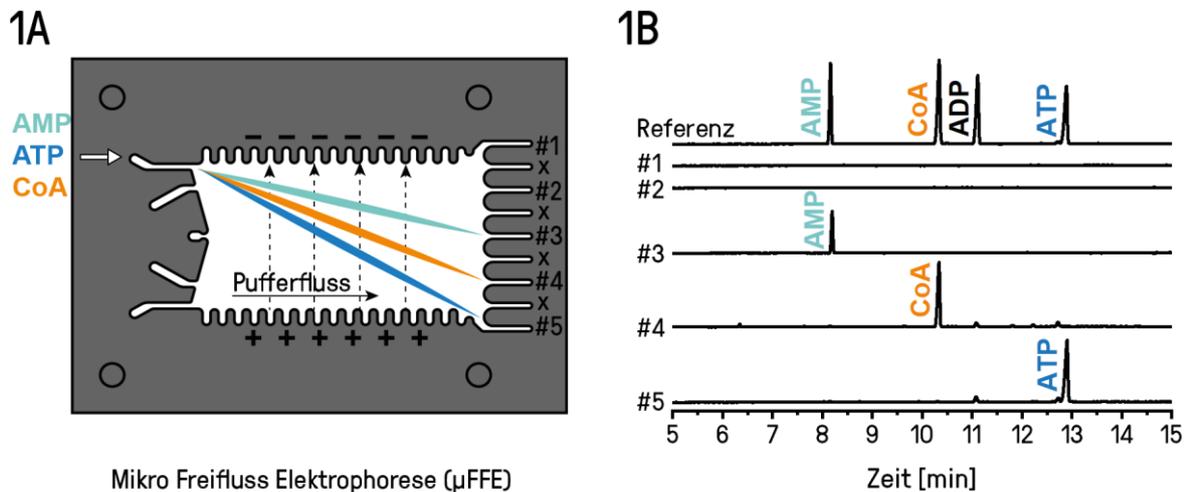


Abbildung 38: Präparative Trennung von enzymatischen Reaktionsmatrixen mittels Mikro Freifluss Elektrophorese (μ FEE). Schematische Darstellung einer Trennung von AMP, ATP und CoA in einer μ FEE (1A). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Matthias Jender (ISAS e.V.) zur Verfügung gestellt und mit dessen Erlaubnis modifiziert ²⁸. Bei der Validierung der μ FEE-Trennung mit Hilfe der Standard CZE-UV/Vis Methode erhaltenen Elektropherogramme zur Analyse von AMP, ADP, ATP, und CoA in den gesammelten Ausflüssen der Trennkammerausgänge #1 bis #5 (1B).

Die bei der Validierung der μ FEE-Trennung mit Hilfe der Standard CZE-UV/Vis Methode erhaltenen Elektropherogramme zur Trennung von AMP, ATP und CoA zeigen die in den fünf unterschiedlichen Trennkammerausgängen #1 bis #5 enthaltenen Substanzen. Die zu erwartenden Analyten AMP, ADP, ATP und CoA lassen sich dabei über den Vergleich der Migrationszeiten der Analyten der Referenz und der Analyten der fünf Trennkammerausgänge identifizieren. Dabei lässt sich in Trennkammerausgang #1 und #2 kein Analyt nachweisen. In Ausgang #3 lässt sich AMP, in Ausgang #4 CoA und in Ausgang #5 ATP nachweisen. Zudem lassen sich kleinste Mengen von ADP in den Ausgängen #4 und #5 feststellen. Die Analyten AMP, ATP und CoA lassen sich somit kontinuierlich im Durchfluss voneinander trennen. Das Vorhandensein von ADP ist vermutlich auf die Hydrolyse von ATP zurückzuführen ¹¹⁰⁻¹¹². Insgesamt zeigt sich das Potenzial der μ FEE zur kontinuierlichen, präparativen Trennung von Gemischen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen. In einem weiteren Schritt müsste die Trennung um die Analyten MalCoA und AcCoA erweitert werden, um eine Selektion der bei den enzymatischen Reaktionen vorkommenden relevanten Analyten zu ermöglichen. Anschließend könnte die μ FEE möglicherweise als präparative Einheit in einem mikrofluidischen, enzymatischen Reaktorsystem integriert werden. Weitere detaillierte Informationen zur μ FEE-Trennung lassen sich in der entsprechenden Publikation nachlesen ²⁸.

5.3 Weitere Optimierung der CE-Trennung

In dieser Arbeit wurden enzymatische Reaktionen über einen langen Zeitraum von 15 h durchgeführt. Der Vorteil bei der Durchführung von Reaktionen über lange Zeiträume ist der Einsatz minimalster Enzymmengen. Dies kann vor allem bei der Verwendung von kostenintensiven Enzymen bei der Durchführung einer Vielzahl an Reaktionen hilfreich sein. Nachteilig gestaltet sich allerdings der hohe Zeitaufwand bei der Durchführung der Reaktionen. Zur Verringerung dieses Zeitaufwands kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Steigerung des Enzymeinsatzes erhöht werden. Mit einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit verringert sich allerdings entsprechend der Beobachtungszeitraum der enzymatischen Reaktionen. Soll die Genauigkeit der Abbildung des zeitlichen Verlaufs konstant bleiben, muss die Zeitauflösung erhöht werden. Dabei hängt die Zeitauflösung von der Analysenzeit der Messmethode ab. Da die enzymatischen Reaktionen in dieser Arbeit grundlegend charakterisiert wurden ist es denkbar, dass der Zeitaufwand bei der weiteren Optimierung der Reaktionsbedingungen der Enzyme (siehe Kapitel 5.1 *Optimierungsmöglichkeiten des Produktionssystems*) zukünftig verringert wird. So ließen sich eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionsbedingungen in einem kürzeren Zeitraum untersuchen.

Entsprechend wurde zum Ende des Projekts untersucht, inwieweit sich der Zeitaufwand der Standard CZE-UV/Vis Methode verringern ließe. Dazu wurden die zeitdefinierenden Parameter der CZE-UV/Vis Methode, wie beispielsweise Kapillardruck, Kapillartemperatur, Kapillardimension und Pufferzusammensetzung, hinsichtlich einer Verringerung der Analysenzeit untersucht. Nachfolgend werden die bei der Optimierung der Standard CZE-UV/Vis Methode erhaltenen Ergebnisse abgebildet. Dabei wird keine weitere ausführliche Methodenoptimierung beschrieben, sondern lediglich eine dem Ausblick dienlichen Darstellung der optimierten Trennbedingungen und resultierenden kapillarelektrophoretische Trennungen erfolgen.

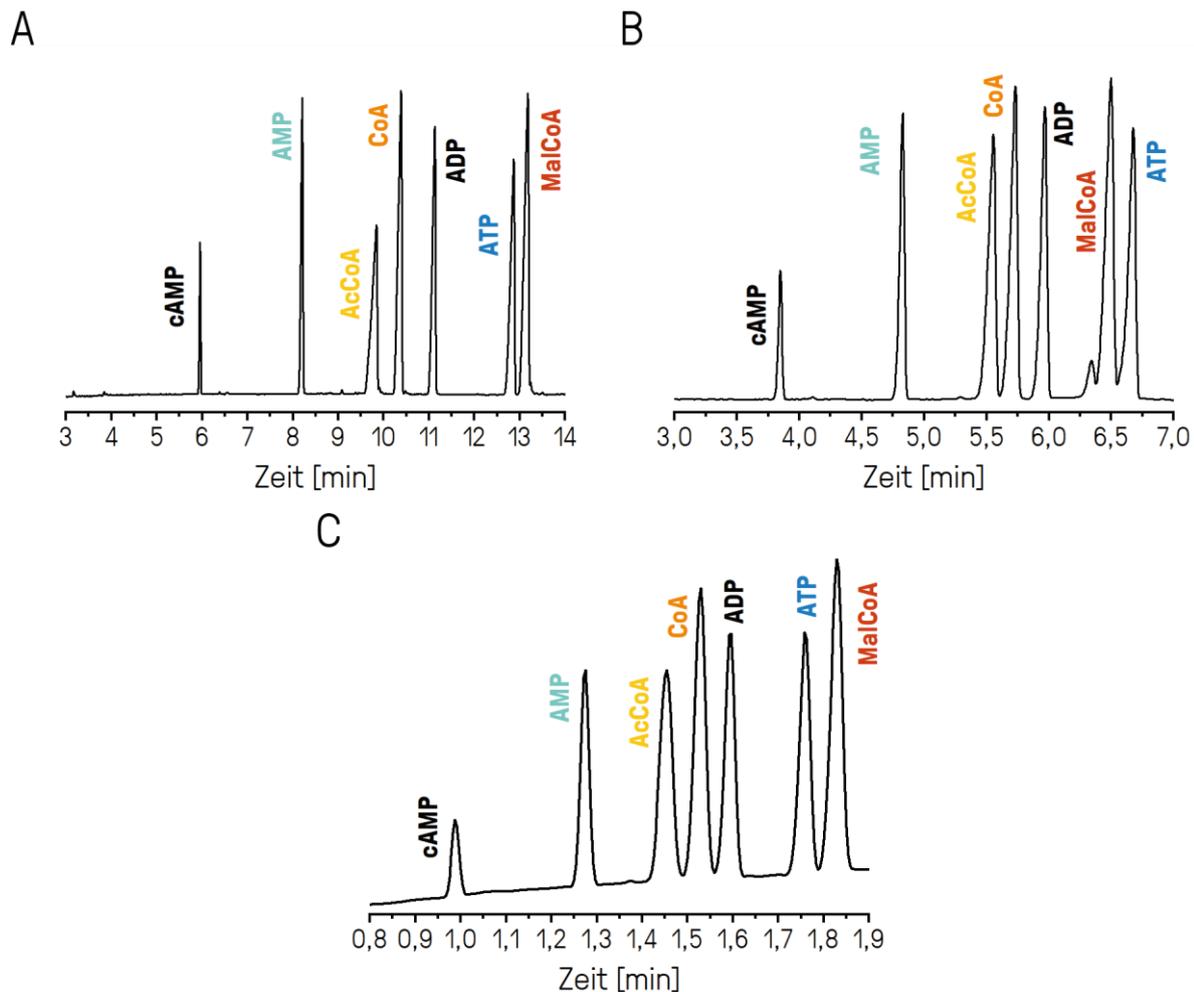


Abbildung 39: Optimierung der CZE-UV/Vis Trennung. Elektropherogramm zur Messung eines Methoden-Standards (A) bestehend aus 0,25 mM cAMP und 0,5 mM AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP und MalCoA mittels Standard CZE-UV/Vis Methode. Elektropherogramm zur Messung des Methoden-Standards mit folgenden optimierten Trennbedingungen (B): 60 cm (Effektive Länge: 50 cm) unbelegte Quarzglas Kapillare. Innendurchmesser: 50 μ m. Außendurchmesser: 360 μ m. Kapillardruck: 0,3 psi. Trennungsspannung: 30 kV. Puffer: 20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 8,0. Elektropherogramm zur Messung des Methoden-Standards mit folgenden optimierten Trennbedingungen (C). 31 cm (Effektive Länge: 21 cm) unbelegte Quarzglas-Kapillare Innendurchmesser (ID): 50 μ m. Außendurchmesser (OD): 360 μ m. Trennungsspannung: 30 kV. Trennpuffer: 50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 8,0. Alle weiteren Methodenparameter entsprechen der Standard CZE-UV/Vis Methode.

Zunächst wurde zu Vergleichszwecken ein Methoden-Standard bestehend aus den Analyten cAMP, AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP und MalCoA mit der Standard CZE-UV/Vis Methode analysiert (A). Ausgehend von den Parametern der Standard CZE-UV/Vis Methode wurde die Puffer-Konzentration von 50 mM Natriumdihydrogenphosphat auf 20 mM Natriumdihydrogenphosphat verringert und zusätzlich ein Kapillardruck von 0,3 psi angelegt. Das unter diesen Trennbedingungen erhaltene Elektropherogramm (B) weist eine Basislinientrennung für nahezu alle Peaks auf. Lediglich die Peaks von ATP und MalCoA weisen eine geringfügige Überlappung auf. Die Trenndauer konnte in diesem Fall von etwa 13 Minuten auf etwa 6,5 Minuten reduziert werden. Dies entspricht einer Reduzierung der

Trenndauer um ca. 50 %. Zur weiteren Reduzierung der Trenndauer wurde die Kapillarlänge im Vergleich zur Standard CZE-UV/Vis Methode von 60 cm auf 31 cm bei ansonsten identischen Bedingungen verringert (C). Die Verringerung der Kapillarlänge ermöglichte eine Basislinientrennung der sieben Analyten in ca. 1,9 Minuten. Im Vergleich zur Standard CZE-UV/Vis Methode konnte somit eine Reduzierung der Trenndauer um ca. 85 % erreicht werden.

Entsprechend ließe sich aufgrund der damit einhergehenden erhöhten Zeitauflösung bei zukünftigen Optimierungen der enzymatischen Reaktionen eine Vielzahl von Reaktionen bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen bei deutlich geringerem Zeitaufwand bei gleicher Trenngüte durchführen. Vor Verwendung der Methode sollte dennoch zunächst eine erneute Methodvalidierung durchgeführt werden.

5.4 Erweiterung der CE-Trennung

Neben dem in dieser Arbeit vorgestellten enzymatischen Produktionssystem zur Herstellung der Polyketid-Grundbausteine MalCoA und AcCoA gibt es eine Vielzahl weiterer enzymatischer Reaktionssysteme zur Herstellung von Biochemikalien und Biopharmazeutika^{137,153}. Dabei werden sowohl Coenzym-abhängige als auch Coenzym-unabhängige Prozessdesigns etabliert. Coenzyme wie ATP, NAD, NADH, NADP und NADPH finden bei Coenzym-abhängigen Produktionen besonders regelmäßig Einsatz und dienen sowohl als universelle Energieträger als auch als universelle Redoxreagenzien in enzymatischen Reaktionen. Da der Einsatz dieser Coenzyme kostspielig ist, gibt es bereits eine Reihe an Recycling-Systemen zur Gewährleistung der Wirtschaftlichkeit eines solchen Prozesses^{151,154–156}. Vor allem werden die Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH von sogenannten Ketoreduktasen als Teil der Polyketidsynthesen bei der Herstellung von Polyketiden genutzt^{157,158}. Es ist daher denkbar, dass das hier vorgestellte ATP-abhängige Reaktionssystem zukünftig durch weitere NAD-, NADH-, NADP- und NADPH-abhängige Enzyme wie Polyketidsynthesen ergänzt wird und somit eine Notwendigkeit einer Anpassung der analytischen Methode notwendig wird. Entsprechend wurde die Standard CZE-UV/Vis Methode hinsichtlich des Trennvermögens der zusätzlichen Analyten NAD, NADH, NADP und NADPH untersucht. Dazu wurde ein 0,5 mM Methoden-Standard bestehend aus cAMP, AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP, MalCoA, NAD, NADH, NADP und NADPH angesetzt und mit der Standard CZE-UV/Vis Methode analysiert. Zusätzlich wurden zur Identifikation entsprechende Einzelstandards hergestellt und analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

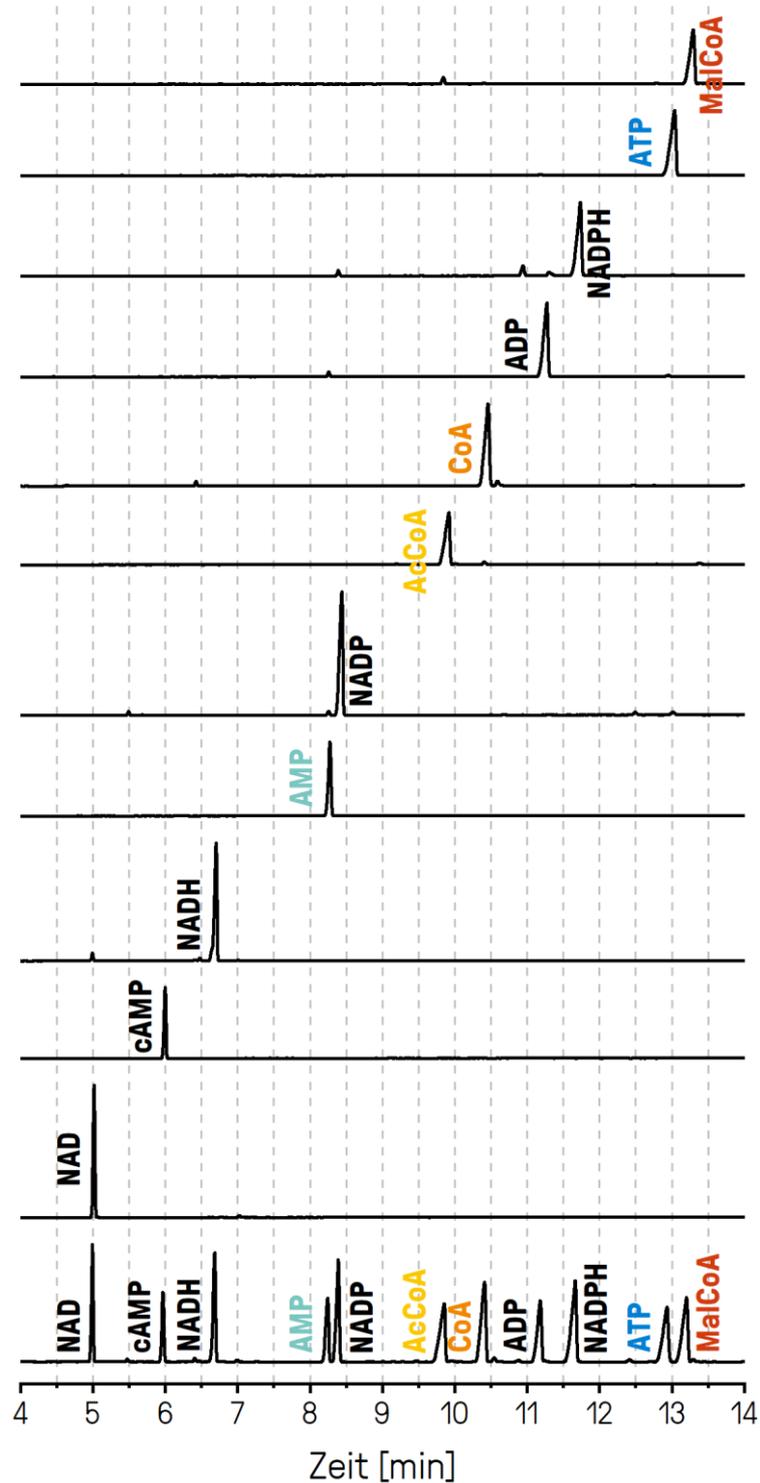


Abbildung 40: Methoden-Standard und Einzelstandards. Identifizierung der Analytepeaks im Elektropherogramm zur Analyse des Methoden-Standards durch die Überlagerung der Elektropherogramme zur Analyse der Einzelstandards. Zusammensetzung des Methodenstandards: 0,5 mM cAMP, AMP, AcCoA, CoA, ADP, ATP, MalCoA, NAD, NADH, NADP und NADPH. Die Konzentration der Einzelstandards beträgt ebenfalls 0,5 mM.

Anhand der Elektropherogramme zur Analyse des Methoden-Standards und der Einzelstandards lässt sich eine vollständige Basislinientrennung und Identifizierung der Analyten mit der Standard CZE-UV/Vis Methode erkennen. Entsprechend bietet die hier entwickelte Standard CZE-UV/Vis Methode die Möglichkeit zusätzlich zu den bisher untersuchten Analyten die Analyten NAD, NADH, NADP und NADPH zu trennen. Entsprechend wäre es denkbar, die entwickelte Methode für die Analyse weiterer Coenzym-abhängiger Enzymreaktionen zu nutzen und gegebenenfalls ein Recycling-Systems dieser Substanzen zur Erhöhung der Wirtschaftlichkeit eines solchen Prozesses zu etablieren. Zudem ließe sich die CE für komplexere analytische Fragestellungen mit einem MS koppeln. Damit würde eine direkte Kopplung des Reaktors an eine CE-MS Analytik ermöglicht werden. Für eine solche MS basierte Anwendung müsste die Methode allerdings angepasst werden. Hilfreich dabei wäre die Publikation von Soga et al.⁶¹.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und den entsprechenden Herstellerinformationen werden in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Herstellerinformationen.

Verbrauchsmaterialien	Herstellerinformationen
Beads	Beads zur Immobilisierung von Proteinen HisPur™ Ni-NTA magnetische Beads Kapazität: $\geq 500 \mu\text{g}$ 6x His-Tagged GFP/mL Beads Thermo Scientific (88832)
CE Kapillaren	Unbelegte Quarzglas Kapillare 50 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser Polymicro Technologies (1068150017) Unbelegte Quarzglas Kapillare 75 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser Chromatographie Service GmbH (107180-10)
CE Vials	1,5 ml Standard CE Vials (A62251) PCR Microvials (144709) NanoVials (5043467) Universal Vial Caps (A62250) Sciex (Beckmann Coulter)
Einmalspritze	HSW HENKE-JECT - zweiteilige Einmalspritzen HenkeSassWolf GmbH (4100.X00V0)
Filter	25mm 0,45 μm Nylon Filter VWR (514-0067)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 500 - 5000 μL (613-3508) 100 - 1000 μL (613-0340) 10 - 200 μL (613-0246) 1 - 10 μL (613-0334) VWR
Low bind Vials	Protein Low bind Tubes 5 ml Protein LoBind Tubes (0030108302) 1,5 ml Protein LoBind Tubes (00301083116) Eppendorf
Vials	Eppendorf: 2ml (0030 120.094); 1,5ml (0030 120.094); 0,5ml (0030 121.023) AHN Biotechnologie: PCR Tubes 0,2 ml (3-010-50-2)

Tabelle 12: Verwendete Materialien und Herstellerinformationen bei der Auslegung des Reaktors.

Materialien	Herstellerinformationen
Batterien	Akkus Sanyo (hr-3uwxb) oder gleichwertig*
Batterien Halter	Keine Informationen verfügbar (Werkstatt ISAS e.V.)
Block	Reaktorblock aus Polyvinylchlorid (PVC) Aus eigener Herstellung (Werkstatt ISAS e.V.)
Dosiernadel	VIEWEG Dosiernadel Standard mit Gewinde Innendurchmesser 1,19 mm, 1'' (F560200-1)
Drehpotentiometer	Rosenthal Drehpotentiometer 822 WM 50 P4 47Ω P
Flügelkanüle	Wing-Flo Flügelkanülen (I4 0018)
CE Vial Anschlussstück	KEL-F - PCTFE (Polychlortrifluorethylen) Aus eigener Herstellung (Werkstatt ISAS)
Spritzenfilter	Machery Nagel; Spritzenvorsatzfilter, beschriftet, Chromafil Xtra RC 13mm 0,45µm (729237)
Heißkleber	Keine Informationen verfügbar (ISAS Werkstatt)
Kippschalter	Miyama Parts; Kippschalter MS 500-F 6A-125VAC Reichelt Elektronik GmbH & Co. KG (MS 500F)
Magneten	Magnet Expert; 4mm dia x 2mm thick N35 Neodymium Magnet (F042-N35-50) eLander Neodym-Super-Magnet Würfel 5x5x5 mm Amazon (B071GFD83G)
Peristaltische Pumpe	Aquatech Co., Ltd. Ringpump RP-Q1.2N-P20Z-DC3V 0,2 ml/min Ringpump RP-QX1.5S-1Z-DC3V 1,1 ml/min
Peristaltik-Pumpen Schlauch	Saint-Gobain; Sani-Tech® ULTRA-C-040-0 .040'' ID x .086'' OD x .023'' W x 25' L
Schlauch/Spritzenfilter-Adapter	Watson-Marlow Fluid Technology Group Male Luer, integral fixed lock ring (MTLL004-6005)
Skizze/Plan Reaktor	Technische Zeichnung, 3 Ansichten, 3D Zeichnung

*bspw. Batterien von Duracell oder Varta der Größe AA wie vereinzelt abgebildet

6.2 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und die entsprechenden Informationen werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 13: Verwendete Enzyme und Informationen.

Enzym	Informationen
Malonyl-CoA Synthetase MatB*	Y3K-deGFP MatB aus <i>Rhizobium</i> 1mg/mL Aliquote Geliefert auf Trockeneis, Gelagert bei -80°C
Malonyl-CoA Decarboxylase MatA*	Y3K-mRuby MatA aus <i>Rhizobium</i> 1mg/mL Aliquote Geliefert auf Trockeneis, Gelagert bei -80°C
Citrat Synthase CitZ*	Y3K-eBFP CitZ aus <i>Bacillus subtilis</i> 1mg/mL Aliquote Geliefert auf Trockeneis, Gelagert bei -80°C

* Enzyme wurden bereitgestellt von Dr. Sandra Hoefgen und Dr. Vito Valiante vom Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Deutschland.

6.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und die entsprechenden Herstellerinformationen werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien und Herstellerinformationen.

Chemikalien (Abkürzung)	Herstellerinformationen
AMP	Adenosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz Hydrat 99,5 % VWR (J61643)
AcCoA	Acetyl coenzyme A sodium salt ≥ 93 % Sigma-Aldrich (A2056)
ADP	Adenosine 5' -diphosphate sodium salt 97 % Sigma-Aldrich (A2754)
ATP	Adenosine 5' -triphosphate disodium salt hydrate ≥ 99 % Sigma-Aldrich (A2383)
cAMP	Adenosin-3.5-cyclophosphat Natriumsalz Monohydrat ≥ 98 % Sigma-Aldrich (A6885)
CoA	Coenzym A Lithium Salz Hydrat ≥ 95 % Cayman (21499)
FA (HCO ₂ H)	Ameisensäure 100 % VWR (84865)

Chemikalien (Abkürzung)	Herstellerinformationen
FAD	Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate 94 % AlfaAesar (A14495)
HCl	Salzsäure 32 % VWR (20254)
H ₂ O	Reinstwasser Typ I Hergestellt mit ELGA PURELAB flex 3
Isopropanol	2-Propanol ≥99,8 % VWR (20880)
MalCoA	Malonyl Coenzym A Lithium Salz ≥ 90 % Cayman (16455)
Methanol	Methanol ≥ 99,9 % VWR (83638)
NaCl	Natriumchlorid ≥ 99 % Merck (106404)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat ≥ 99 % Merck (106346)
NaMal	Natrium Malonat ≥ 98 % Sigma-Aldrich (M1875)
NaOH	Natriumhydroxid ≥ 99 % Merck (106498)
NaOH Lösung	Natriumhydroxidlösung 1M Roth (K020)
OxAc	Oxalessigsäure 98 % VWR (ACRO416600050)
TCEP Lösung pH 7	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Keine Reinheitsangabe des Herstellers Sigma (646547)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ≥ 99,9 % Roth (4855)

6.4 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und die entsprechenden Herstellerinformationen werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 15: Verwendete Geräte und Herstellerinformationen.

Geräte	Herstellerinformationen
Analysenwaage	Analysenwaage Sartorius (MC210P)
Kapillarelektrophorese (CE)	AB Sciex (Beckmann Coulter) PA 800 Plus Karat 9.0 UV Quelle: Deuterium Lampe PDA Detektor: Wellenlängen Bereich von 190-600 nm LIF Detektor: 488 nm Laser mit 520 nm Bandpassfilter 635 nm Laser mit 663 nm Langpassfilter Extinktionsbereich: 300 nm - 700 nm Emissionsbereich: 350 nm - 750 nm
pH Meter 1	Zum Ansetzen von Pufferlösungen Knick, pH-Meter 766 Calimatic Kalibrierlösungen (Roth): pH4 (A517.2); pH7: (P713.2); pH9: (P714.2)
Pipetten	Eppendorf Research® plus Pipetten 5 ml (0,5-5 ml), 1ml (10-1000 µL), 200 µL (20-200 µL), 100 µL (10-100 µL), 20 µL (2-20 µL), 10 µL (0,5-10 µL)
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort / Thermomixer R (5355 41070)
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC100T VWR (142-6044)
Wasseraufbereitungsanlage	Veolia Water Technologies Deutschland GmbH ELGA LabWater- PURELAB flex 3

6.5 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software und die entsprechenden Herstellerinformationen werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 16: Verwendete Software.

Software	Herstellerinformationen
R	Version 3.5.3, The R Foundation for Statistical Computing
Origin	Origin 2018G, Origin Lab Corporation
Karat	Version 9.0, Beckmann Coulter (AB Sciex)
Microsoft Office	Word und Excel 2019, Microsoft
Illustrator/InDesign	Illustrator und InDesign 2018, Adobe

6.6 Puffersysteme

In dieser Arbeit wurden verschiedene Puffersysteme verwendet, die auf Phosphat- und TRIS-Puffern basieren. Die Puffer wurden auf einer Analysenwaage in einer Wägeschale mit einer Genauigkeit von ± 1 mg eingewogen, in Reinstwasser gelöst und in einen Messkolben überführt. Das pH-Meter wurde zwischen pH 7 und pH 9 kalibriert und der pH-Wert der Pufferlösung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,02$ eingestellt. Die Phosphatpuffer wurden jeweils mit 10 molarer Natronlauge und der GEFI mit 37 %-iger Salzsäure eingestellt. Die Phosphatpuffer wurden als Hintergrundelektrolyt für die kapillarelektrophoretischen Messungen (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode* und 6.7.2 *Standard CZE-LIF Methode*) und die Gelfiltrationspuffer (GEFI) als Reaktionspuffer der enzymatischen Reaktionen (siehe Kapitel 6.9 *Enzymatische Reaktionen*) verwendet. Die angesetzten Puffer wurden mit Hilfe einer Einmalspritze und einem Nylon Filter (Porendurchmesser 0,45 μm) filtriert und im Falle des Hintergrundelektrolyten vor Verwendung für 5 min im Ultraschallbad entgast. Die nachfolgende Tabelle 17 fasst die verwendeten Puffer zusammen.

Tabelle 17: Verwendete Puffersysteme.

Zusammensetzung	Konzentration [mM]	pH-Wert
Natriumdihydrogenphosphat-Puffer	10	8,0
	15	8,0
	20	7,0
	20	7,5
	20	8,0
	35	7,0
	35	7,5
	35	8,0
	50	7,0
	50	7,5
	50	8,0
GEFI (Standard Konzentration):		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	20	8,0
Natriumchlorid (NaCl)	150	
GEFI (für Verdünnungszwecke):		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	50	8,0
Natriumchlorid (NaCl)	375	

6.7 CE Methoden

6.7.1 Standard CZE-UV/Vis Methode

In dieser Arbeit wurde eine CZE-UV/Vis Methode entwickelt (siehe Kapitel 3.1 *Methodenentwicklung*), die anschließend für nahezu alle Messungen verwendet wurde. Sofern die Messmethode von der hier aufgeführten Methodeneinstellungen (Tabelle 18) und dem Zeitprogramm (Tabelle 19) der Standard CZE-UV/Vis Methode abwich, wurde dies an entsprechender Stelle kenntlich gemacht. Standardmäßig wird eine 60 cm lange (effektive Länge: 50 cm) unbelegte Quarzglas Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm und einem Außendurchmesser von 360 μm (Polymicro Technologies) eingesetzt. Ein Detektionsfenster wird durch Abflammen der Polyimid Beschichtung der Kapillare erzeugt und mit Isopropanol gereinigt. Bei Verwendung der Standard CZE-UV/Vis Methode wird die Kapillare für 3 Minuten bei 60 psi mit Hintergrundelektrolyt (50mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 8,0; siehe Kapitel 6.6 Puffersysteme) durchströmt. Der Hintergrundelektrolyt wird dabei in ein mit 900 μL destillierten Wasser befüllten Abfallgefäß gespült. Der Hintergrundelektrolyt wird somit direkt im Wasser verdünnt, wodurch Salzurückstände am Kapillarende vermieden werden. Daraufhin wird die Probe für 5 Sekunden bei 0,3 psi hydrodynamisch injiziert, gefolgt von der Injektion von Wasser für 3 Sekunden bei 0,3 psi. Die anschließende drucklose, 18-minütige Trennung erfolgt bei 30 kV mit einer Anlaufzeit der Spannung von 0,3 Minuten. Die Temperatur der Probengarage wurde je nach Art der Messung mit 25 °C für Enzymreaktionen und mit 4 °C für alle weiteren Proben variabel gewählt. Da erfahrungsgemäß die Probengarage nicht bis auf 4 °C, sondern in Abhängigkeit der Raumtemperatur, nur auf ca. 5-7 °C gekühlt werden kann, ist die Temperatur hier mit ≤ 7 °C anzugeben. Die Kapillare wird stets auf 20 °C temperiert. Die Detektion erfolgte mit einem Photodiodenarray-Detektor (PDA-Detektor) im Wellenlängenbereich von 210 bis 600 nm mit einer Frequenz von 4 Hz, wobei zur Auswertung die Elektropherogramme bei einer Wellenlänge von 210 nm herangezogen wurden.

Tabelle 18: Standard CZE-UV/Vis Methodeneinstellungen.

Parameter	Einstellung
Konditionierung	3 min (60 psi) 50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Hintergrundelektrolyt	50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Trennungsspannung	30 kV
Kapillartemperatur	20 °C
Kapillardruck	-
Injektionszeit (Probe)	5 s
Injektionsdruck (Probe)	0,3 psi
Injektionszeit (Wasser)	3 s
Injektionsdruck (Wasser)	0,3 psi
Detektor	PDA-Detektor (210-600 nm)
Kapillare	Unbelegte Quarzglas Kapillare 60 cm (50 cm effektiv) 50 µm ID x 360 µm OD

Tabelle 19: Zeitprogramm der Standard CZE-UV/Vis Methode.

Aktion	Wert	Dauer	Zufluss Vial	Abfluss Vial
Spülen	60 psi	3 min	Hintergrundelektrolyt	Abfallgefäß
Probeninjektion	0,3 psi	5 sek	Probe	Abfallgefäß
Wasserinjektion	0,3 psi	3 sek	Reinstwasser	Abfallgefäß
Trennung	30 kV	18 min	Hintergrundelektrolyt	Hintergrundelektrolyt

6.7.2 Standard CZE-LIF Methode

Die in dieser Arbeit entwickelte Standard CZE-LIF Methode (Tabelle 20 und Tabelle 21) entspricht im Wesentlichen der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*). Allerdings wird anstelle eines PDA-Detektors ein LIF-Detektor verwendet. Die Verwendung der gleichen Messmethode mit zwei unterschiedlichen Detektoren ermöglichte die Gewinnung komplementärer Analysenergebnisse unter gleichen Trennbedingungen. Die Anregungswellenlänge liegt bei der LIF-Detektion bei 488 nm und die Emissionswellenlänge bei 520 nm.

Tabelle 20: Standard CZE-LIF Methodeneinstellungen.

Parameter	Einstellung
Konditionierung	3 min (60 psi) 50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Hintergrundelektrolyt	50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
Trennungsspannung	30 kV
Kapillartemperatur	20 °C
Kapillardruck	-
Injektionszeit (Probe)	5 s
Injektionsdruck (Probe)	0,3 psi
Injektionszeit (Wasser)	3 s
Injektionsdruck (Wasser)	0,3 psi
Detektor	LIF-Detektor Anregungswellenlänge: 480 nm Emissionswellenlänge: 520 nm
Kapillare	Unbelegte Quarzglas Kapillare 60 cm (50 cm effektiv) 50 µm ID x 360 µm OD

Tabelle 21: Zeitprogramm der Standard CZE-LIF Methode.

Aktion	Wert	Dauer	Zufluss Vial	Abfluss Vial
Spülen	60 psi	3 min	Hintergrundelektrolyt	Abfallgefäß
Probeninjektion	0,3 psi	5 sek	Probe	Abfallgefäß
Wasserinjektion	0,3 psi	3 sek	Reinstwasser	Abfallgefäß
Trennung	30 kV	18 min	Hintergrundelektrolyt	Hintergrundelektrolyt

6.7.3 Konditionierung der CE Kapillare vor erstmaliger Verwendung

Vor der erstmaligen Verwendung der hier genutzten unbelegten Quarzglas Kapillaren erfolgte zunächst eine Konditionierung bei der zusätzlich zur täglichen Konditionierung (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*) mit Methanol gespült wird. Diese dient zur Entfernung von potenziellen organischen Rückständen aus der Produktion der Kapillare, aber auch zur Sicherstellung von qualitativ hochwertigen Analysen (stabile Migrationszeiten, horizontale Basislinie, adäquate Peakformen) durch eine solide Oberflächenbeschaffenheit der Kapillarinnenwand (siehe Kapitel 2.1.4 *Trennkapillaren*). Dabei wird die Kapillare 10 Minuten bei 60 psi mit Methanol, 10 Minuten bei 60 psi mit 1 mol/L Natronlauge, 10 Minuten bei 60 psi mit destilliertem Wasser und 20 Minuten bei 60 psi mit Hintergrundelektrolyt gespült (Tabelle 22).

Tabelle 22: CE Methode zur Konditionierung der CE Kapillare vor erstmaliger Verwendung.

Lösung	Spülzeit bei 60 psi [min]
Methanol	10
Natronlauge	10
Reinstwasser	10
Hintergrundelektrolyt	20

6.7.4 Tägliche Konditionierung der CE Kapillare

Zur Sicherstellung einer qualitativ hochwertigen Analyse (Entfernen unspezifisch gebundener Analyten, stabile Migrationszeiten, horizontale Basislinie, adäquate Peakformen) durch eine solide Oberflächenbeschaffenheit der Kapillarinnenwand (siehe Kapitel 2.1.4 *Trennkapillaren*) wurden zu Beginn jedes Messtages eine Konditionierung der Kapillare und zwei Testmessungen durchgeführt. Zur Konditionierung der Kapillare wird die Kapillare für 10 Minuten bei 60 psi mit 1 M Natronlauge, 10 Minuten bei 60 psi mit destilliertem Wasser und 20 Minuten bei 60 psi mit dem danach zu verwendenden Hintergrundelektrolyt gespült (Tabelle 23). Nach der Konditionierung erfolgen zwei Testmessungen einer bekannten Probe mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*).

Tabelle 23: CE Methode zur täglichen Konditionierung der CE Kapillare.

Lösung	Spülzeit bei 60 psi [min]
Natronlauge	10
Reinstwasser	10
Hintergrundelektrolyt	20

6.8 Validierungen

6.8.1 Kalibrierung

Für die externe Kalibrierung mit internem Standard wurde eine Kalibrierreihe im Konzentrationsbereich von 0,005 mM bis 1,5 mM für die im UV/Vis-Bereich detektierbaren Analyten AMP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA angesetzt. Die Konzentration des internen Standards cAMP betrug in jedem Kalibrierstandard 0,5 mM. Die Konzentration aller weiteren, nicht im UV/Vis-Bereich detektierbaren Substanzen des Edukt-Mix, wie OxAc (5 mM), TCEP (1 mM) und NaMal (1 mM) wurde konstant gehalten. Jeder Kalibrierstandard wurde in GEFI angesetzt (20 mM TRIS; 150 mM NaCl).

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden zunächst zwei Mixe hergestellt. Ein erster Mix bestand aus AMP, ATP, CoA, MalCoA, AcCoA und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl). Ein zweiter Mix bestand aus cAMP, OxAc, TCEP, NaMal und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl). Der erste Mix wurde auf die für die Kalibriereihe benötigten Konzentrationen verdünnt. Durch das anschließende Mischen von beiden Mixen wurden die finalen Konzentrationen von 0,005 mM, 0,01 mM, 0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM und 1,5 mM für die Analyten AMP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA erhalten, wobei die Konzentration von cAMP (0,5 mM), OxAc (5 mM), TCEP (1 mM) und NaMal (1 mM) in jedem Standard identisch war. Von jedem Kalibrierstandard wurden anschließend fünf messtechnische Replikate mit der Standard CZE-UV/Vis Methode gemessen.

6.8.2 Detektionslimit

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze mit Hilfe der Kalibriergerademethode nach DIN 32645 wurde eine Kalibrierreihe im Konzentrationsbereich von 3 μ M bis 30 μ M für die im UV/Vis-Bereich detektierbaren Analyten AMP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA angesetzt. Die Konzentration des internen Standards cAMP beträgt in jedem Kalibrierstandard 0,5 mM. Die Konzentration aller weiteren, nicht im UV/Vis-Bereich detektierbaren Substanzen des Edukt-Mixes, wie OxAc (5 mM), TCEP (1 mM) und NaMal (1 mM) wurden konstant gehalten. Jeder Kalibrierstandard wurde in GEFI angesetzt (20 mM TRIS; 150 mM NaCl).

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden zunächst zwei Mixe hergestellt. Ein erster Mix bestand aus AMP, ATP, CoA, MalCoA, AcCoA und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl). Ein zweiter Mix bestand aus cAMP, OxAc, TCEP, NaMal und GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl). Der erste Mix wurde auf die für die Kalibrierreihe benötigten Konzentrationen verdünnt. Durch das anschließende Mischen von beiden Mixen wurden die finalen Konzentrationen von 3 μ M, 6 μ M, 9 μ M, 12 μ M, 15 μ M, 18 μ M, 21 μ M, 24 μ M, 27 μ M und 30 μ M für die Analyten AMP, ATP, CoA, MalCoA und AcCoA erhalten, wobei die Konzentration von cAMP (0,5 mM), OxAc (5 mM), TCEP (1 mM) und NaMal (1 mM) in jedem Standard

identisch war. Von jedem Kalibrierstandard wurden anschließend fünf messtechnische Replikate mit der Standard CZE-UV/Vis Methode gemessen.

6.9 Enzymatische Reaktionen

6.9.1 Ansetzen der Enzym-Stammaliquote

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Malonyl-CoA Synthetase Y3K-deGFP MatB, Malonyl-CoA Decarboxylase Y3K-mRuby MatA und Citratsynthase Y3K-eBFP CitZ wurden im Rahmen des Leibniz-Research-Cluster (LRC) Projekts von Dr. Sandra Hoefgen und Dr. Vito Valiante vom Leibniz-Institut für Naturstoff Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI) (Jena, Deutschland) bereitgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vollständigen Enzym-Namen zur besseren Lesbarkeit mit MatB, MatA und CitZ abgekürzt. Die Enzyme wurden in mehreren Enzym-Aliquoten mit einer Konzentration von 1 mg/mL und Volumina von 500-1000 μ L auf Trockeneis geliefert und anschließend bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Für die enzymatischen Reaktionen wurden aus diesen Aliquoten zunächst kleinere Stamm-Aliquote mit Konzentrationen von 0,01 mg/mL bis 1 mg/mL und Volumina von 30-50 μ L hergestellt. Dabei wurden die Enzyme stets bei 37 °C zügig aufgetaut und auf Raumtemperatur aufgewärmt, nach Verarbeitung in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Aus diesen Stamm-Aliquoten wurden die Enzym-Mixe (siehe Kapitel 6.9.2 *Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen*) hergestellt, aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die aliquotierten, identischen Enzym-Mixe wurden dann nach Bedarf verwendet, sodass Mehrfachreaktionen mit dem gleichen Enzym-Mix durchgeführt werden konnten. Bei der Handhabung der Enzyme wurde besonders auf ausgiebige Durchmischung geachtet, um Inhomogenität (z.B. durch Enzymagglomerate) in den Stammaliquoten zu vermeiden. Dazu wurde jede verwendete Enzymlösung vor weiterer Verwendung zehn Mal mit einer Pipette durch langsames Aufziehen und Ablassen der Enzymlösung durchmischt.

6.9.2 Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen

Für die enzymatischen Reaktionen wurde aus den Enzym-Stammaliquoten (siehe Kapitel 6.9.1 *Ansetzen der Enzym-Stammaliquote*) je nach Verwendung ein Enzym-Mix aus ein, zwei oder drei Enzymen in GEFI hergestellt. Der Enzym-Mix wurde für die Reaktion dann mit einem Edukt-Mix auf die angegebenen finalen Konzentrationen (Tabelle 24) verdünnt. Die jeweils verwendeten Enzyme und Konzentrationen, sofern sie von dem hier aufgeführten Enzym-Mix abwichen, wurden an entsprechender Stelle kenntlich gemacht.

Tabelle 24: Standardmäßige Zusammensetzung des Enzym-Mixes.

Enzym	Konzentration im Reaktions-Mix
Y3K-deGFP MatB und/oder	0,0125 mg/mL
Y3K-mRuby MatA und/oder	0,00125 mg/mL
Y3K-eBFP CitZ	0,0125 mg/mL
Gelfiltrationspuffer (GEFI):	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	20 mmol/L
Natriumchlorid (NaCl)	150 mmol/L

6.9.3 Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen

Für die enzymatischen Reaktionen wurde immer der gleiche Edukt-Mix angesetzt. Für dessen Herstellung wurden ATP, Natrium Malonat, TCEP und einer der drei Cofactoren CoA, MalCoA oder AcCoA in äquimolaren Mengen zu je 1 mM in GEFI angesetzt. Die Konzentration von cAMP und Oxalessigsäure betragen 0,5 mM und 5 mM (Tabelle 25). Der Edukt-Mix wurde für die Reaktion anschließend mit einem Enzym-Mix auf die angegebenen finalen Konzentrationen verdünnt.

Tabelle 25: Standardmäßige Zusammensetzung des Edukt-Mixes.

Substanz	Konzentration im Reaktions-Mix [mmol/L]
Adenosin-3.5-cyclophosphat (cAMP)	0,5
Adenosin-5'-monophosphat (ATP)	1
Cofaktor:	
Acetyl coenzyme A (AcCoA) oder	1
Coenzym A (CoA) oder	1
Malonyl Coenzym A (MalCoA)	1
Natrium Malonat (NaMal)	1
Oxalessigsäure (OxAc)	5
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	1
Gelfiltrationspuffer (GEFI):	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	20
Natriumchlorid (NaCl)	150

6.9.4 Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen

Das Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen ist bei der quantitativen Analyse von Enzymreaktionen von hoher Bedeutung. Inhomogenität durch unzureichende Durchmischung von den Enzym-Aliquoten (siehe Kapitel 6.9.1 *Ansetzen der Enzym-Stammaliquote*), Enzym-Mixen (siehe Kapitel 6.9.2 *Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen*), Edukt-Mixen (siehe 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen*) und den Reaktions-Mixen (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) führen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen bei den zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen. Daher wurde hoher Wert auf das Mischen dieser Mixe gelegt. Das Mischen erfolgte in dieser Arbeit immer mit einer Pipette. Dabei wurden die Mixe mit Hilfe einer Pipette durch dreimaliges (wenn an entsprechender Stelle nicht anders angegeben) langsames Aufziehen und Ablassen eines möglichst großen Flüssigkeitsvolumens gemischt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in der Mischung erzeugt wurden. Besondere Aufmerksamkeit galt dem Mischen von Enzym-Lösungen, weil Enzym-Aliquote mit hoher Enzym-Konzentration eine höhere Viskosität aufwiesen als Wasser, schwieriger zu mischen waren und zum Einschluss von Luftblasen neigten. Zudem sollte langsames Pipettieren gewährleisten, dass die Enzyme nicht durch starke hydraulische Belastung beschädigt werden.

6.9.5 Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen

Für die zeitaufgelösten Messungen von enzymatischen Batch Reaktionen wurden insgesamt 38 automatisierte Messungen in Serie (ca. 15 h) durchgeführt, wobei die erste und letzte Messung eine Referenzmessung war. Alle weiteren Messungen dienten zur Analyse des Reaktions-Mixes. Der Reaktions-Mix (Tabelle 26) und der Reaktions-Referenz (Tabelle 27) unterschieden sich durch die An- und Abwesenheit der Enzyme. Die Referenzmessungen dienten somit zur Bestimmung der Ausgangs- und Endkonzentrationen in Form einer Negativ-Kontrolle. Der nachfolgend dargestellte Reaktions-Mix und die Reaktions-Referenz sollen dabei vor allem das standardmäßige Verhältnis der Komponenten darstellen, wobei das Gesamtvolumen entsprechend angepasst werden kann.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Reaktions-Mixes bei Reaktionen mit freien Enzymen.

Mix	Volumen [μL]
Enzym-Mix	30
Edukt-Mix	50

Tabelle 27: Zusammensetzung der Reaktions-Referenz bei Reaktionen mit freien Enzymen.

Mix	Volumen [μL]
GEFI	30
Edukt-Mix	50

Bevor eine Serie an Messungen gestartet wurde, wurde zunächst die Kapillare konditioniert und zwei Testmessungen durchgeführt (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*). Anschließend wurde die Probengarage der CE auf 25 °C temperiert. Edukt-Mix (siehe Kapitel 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen*) und Enzym-Mix (siehe Kapitel 6.9.2 *Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen*) wurden dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und bei 37 °C zügig aufgetaut und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Reaktions-Referenz wurde daraufhin angesetzt und 50 µL Edukt-Mix für den Reaktions-Mix in ein PCR Microvial vorgelegt. Der Enzym-Mix wurde bis zum Starten der Reaktion separat aufbewahrt. Die Reaktions-Referenz, der vorgelegte Edukt-Mix und der Enzym-Mix wurden anschließend in das auf 25 °C vortemperierte *48-Vial Sample Tray* der CE gestellt. Die erste Referenzmessung wurde durchgeführt und die beteiligten Mixe währenddessen temperiert. Nach Abschluss der ersten Referenzmessung wurde die Reaktion sofort durch Zugabe von 30 µL Enzym-Mix zu den vorgelegten 50 µL Edukt-Mix gestartet. Die Durchmischung des Reaktions-Mixes erfolgte direkt nach Zugabe des Enzym-Mixes durch dreimaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette (70 µL pipettiertes Volumen) ohne dabei Luftblasen zu produzieren. Die vorprogrammierte Messserie wurde sofort gestartet, wobei anschließend 36 Mal der Reaktions-Mix in zeitlichen Abständen von ca. 24,5 min und abschließend erneut die Reaktions-Referenz automatisiert injiziert und mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert wurde.

6.9.6 Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen

Für die zeitaufgelösten Messungen von enzymatischen Batch Reaktionen (immobilisierte Enzyme) wurden insgesamt 38 automatisierte Messungen in Serie (ca. 15 h) durchgeführt, wobei die erste und letzte Messung eine Referenzmessung war. Alle weiteren Messungen dienten zur Analyse des Reaktions-Mixes. Der Reaktions-Mix (Tabelle 28) und der Reaktions-Referenz (Tabelle 29) unterschieden sich durch die An- und Abwesenheit der Enzyme. Die Referenzmessungen dienten somit zur Bestimmung der Ausgangs- und Endkonzentrationen in Form einer Negativ-Kontrolle.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Reaktions-Mixes bei Reaktionen mit immobilisierten Enzymen.

Mix	Volumen [µL]
Enzym-Mix (immobilisiert auf Beads)	30
Edukt-Mix	50

Tabelle 29: Zusammensetzung der Reaktions-Referenz bei Reaktionen mit immobilisierten Enzymen.

Mix	Volumen [μL]
GEFI	30
Edukt-Mix	50

Bevor eine Serie an Messungen gestartet wurde, wurde zunächst die Kapillare konditioniert und zwei Testmessungen durchgeführt (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*). Anschließend wurde die Probengarage der CE auf 25 °C temperiert. Edukt-Mix (siehe Kapitel 6.9.3 *Edukt-Mix für enzymatische Reaktionen*) wurde dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und bei 37 °C zügig aufgetaut und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Der immobilisierte Enzym-Mix (siehe Kapitel siehe Kapitel 6.11.2 *Immobilisierung der Enzyme auf Beads*) wurde dem Kühlschrank (4 °C) entnommen und bis auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Reaktions-Referenz wurde daraufhin angesetzt. In ein Standard 1,5 ml CE Vial wurden zwei eLander Magneten eingelegt und darüber ein PCR Microvial (Abbildung 41 A) eingesetzt. Die Magneten dienten dazu, die magnetischen Beads auf den Boden des PCR Microvials zu fixieren (vgl. Abbildung 41 B und C), wodurch eine Injektion der Beads in die Kapillare vermieden wurde (siehe Kapitel 3.5 *Charakterisierung von Reaktionen immobilisierter Enzyme*).

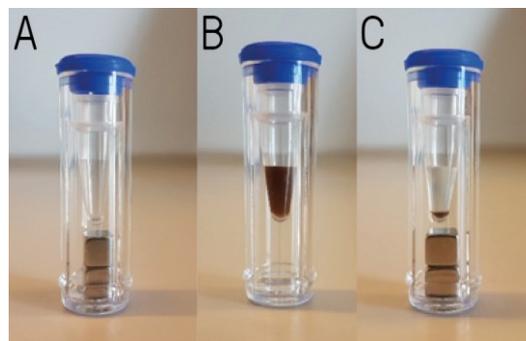


Abbildung 41: Präparation des CE Vials für Reaktionen mit immobilisierten Enzymen. A: 1,5 ml Standard CE Vial mit Vial Cap und PCR Microvial exklusive Reaktionsmix (zwei eLander Magneten). B: 1,5 ml Standard CE Vial mit Vial Cap und PCR Microvial inklusive Reaktionsmix (keine Magneten). C: 1,5 ml Standard CE Vial mit Vial Cap, PCR Microvial inklusive Reaktionsmix (zwei eLander Magneten). Die Verweilzeit des Reaktions-Mixes auf den Magneten beträgt hier 3 Minuten. Der Abstand der Magneten zum PCR Microvial beträgt etwa 2 mm.

In ein mit zwei eLander Magneten bestücktes Vial (Abbildung 41 A) wurden zur Präparation des Reaktions-Mixes 50 μL Edukt-Mix vorgelegt. Der immobilisierte Enzym-Mix wurde bis zum Starten der Reaktion separat aufbewahrt. Die Reaktions-Referenz, der vorgelegte Edukt-Mix und der immobilisierte Enzym-Mix wurden anschließend in das auf 25 °C vortemperierte *48-Vial Sample Tray* der CE gestellt. Die erste Referenzmessung wurde durchgeführt und die beteiligten Mixe währenddessen temperiert. Nach Abschluss der ersten Referenzmessung wurde der immobilisierte

Enzym-Mix durch dreimaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette gemischt und die Reaktion sofort durch Zugabe von 30 μL immobilisiertem Enzym-Mix zu den vorgelegten 50 μL Edukt-Mix gestartet. Die Durchmischung des Reaktions-Mixes erfolgte direkt nach Zugabe des immobilisierten Enzym-Mixes durch dreimaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette (70 μL pipettiertes Volumen) ohne dabei Luftblasen zu produzieren. Die vorprogrammierte Messserie wurde sofort gestartet, wobei anschließend 36 Mal der Reaktions-Mix in zeitlichen Abständen von ca. 24,5 min und abschließend erneut der Reaktions-Referenz, automatisiert injiziert und mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert wurde.

6.9.7 Zeitaufgelöste Stabilitätsmessungen

Für die zeitaufgelösten Stabilitätsmessungen wurden insgesamt 38 automatisierte Messungen in Serie (ca. 15 h) durchgeführt. Alle Messungen dienten zur Analyse der Reaktions-Referenz (Tabelle 30), wobei der gewählte Messrahmen dem Messrahmen der zeitgelösten Enzymreaktionen (38 Messungen; ca. 15 h) entsprach. Dadurch wurde ein direkter Vergleich der Enzym-Reaktionen mit den Stabilitätsmessungen ermöglicht. Der zur Stabilitätsuntersuchung verwendete Mix entsprach entsprechend der Reaktions-Referenz (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen* und 6.9.6 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen*) der zeitaufgelösten Enzymreaktionen und zeichnet sich durch die Abwesenheit der Enzyme aus. Die zeitaufgelösten Stabilitätsmessungen dienten somit neben der Untersuchung der Stabilität der Edukt-Mix Komponenten gleichzeitig zur zeitaufgelösten Analyse der Reaktions-Referenz.

Tabelle 30: Zusammensetzung der Reaktions-Referenz bei zeitaufgelösten Stabilitätsmessungen.

Mix	Volumen [μL]
GEFI	30
Edukt-Mix	50

Bevor eine Serie an Messungen gestartet wurde, wurde zunächst die Kapillare konditioniert und zwei Testmessungen durchgeführt (siehe Kapitel 6.7.4 *Tägliche Konditionierung der CE Kapillare*). Anschließend wurde die Probengarage der CE auf 25 °C temperiert. Der Edukt-Mix wurde dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und bei 37 °C zügig aufgetaut und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Reaktions-Referenz wurde daraufhin angesetzt und bei 25 °C im *48-Vial Sample Tray* der CE vortemperiert. Die vorprogrammierte Messserie wurde gestartet, wobei anschließend 38 Mal die

Reaktions-Referenz in zeitlichen Abständen von ca. 24,5 min automatisiert injiziert und mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert wurde.

6.10 Bestimmung von Enzymaktivitäten

6.10.1 Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von MatB, MatA und CitZ wurde ein Schema (Tabelle 31) entwickelt, mit dessen Hilfe sich Enzymaktivitäten als biologisches Triplikat zeiteffektiv bestimmen lassen. Dabei werden drei gleichwertige Reaktionsansätze (A, B und C) angesetzt, zeitversetzt gestartet und der Umsatz einer Reaktion durch nacheinander folgende Probenentnahme zu den Zeitpunkten von 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Minuten bestimmt. Das nachfolgende Schema (Tabelle 31) wurde in dieser Arbeit standardmäßig zur Bestimmung von Enzymaktivitäten verwendet.

Tabelle 31: Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten.

Probe	A3	B3	C3	A6	B6	C6	...	A21	B21	C21	A24	B24	C24
Start [min]	0	1	2	0	1	2	...	0	1	2	0	1	2
End [min]	3	4	5	6	7	8	...	21	22	23	24	25	26
Reaktionszeit [min]	3	3	3	6	6	6	...	21	21	21	24	24	24

Dabei wurde bei Probe A3 beispielsweise der Reaktionsansatz A bei Zeitpunkt 0 Minuten gestartet und bei Zeitpunkt 3 Minuten gestoppt. Die Reaktion weist somit eine Reaktionszeit von 3 Minuten auf. Bei Probe B3 wurde der Reaktionsansatz B bei Zeitpunkt 1 Minute gestartet und bei Zeitpunkt 4 Minuten gestoppt. Dieser weist somit ebenfalls eine Reaktionszeit von 3 Minuten auf und stellt ein biologisches Replikat zum Reaktionsansatz A dar. Das Schema skizziert entsprechend die ersten sechs und letzten sechs Proben. Die übrigen 12 Proben folgen dem gleichen Schema, wurden jedoch übersichtshalber nicht dargestellt. Insgesamt werden nach dem Schema drei biologische Replikate bei acht Zeitpunkten in 26 Minuten durchgeführt.

6.10.2 Untersuchungen zum Stoppen von Enzymreaktionen durch pH-Wert Änderung

Für die Untersuchungen zum Stoppen der Enzymreaktionen von MatB, MatA und CitZ wurde eine systematische Methodik erarbeitet, mit der der Einfluss einer pH-Wert Änderung aufgeklärt wurde. Für eine direkte Vergleichbarkeit zu den Enzym-Reaktionen wurde der gleiche Reaktions-Mix (siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*) verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Reaktions-Mixe wird in nachfolgender Tabelle dargestellt (Tabelle 32).

Tabelle 32: Reaktions-Mix beim Stoppen von Enzymreaktionen durch pH-Wert Änderung. Zusammensetzung der Reaktions-Mixe bei den Untersuchungen zum Stoppen der Enzymreaktionen von MatB, MatA und CitZ durch pH-Wert Änderung. Die Enzyme MatB, MatA und CitZ wurden jeweils separat untersucht. Der Enzym-Mix beinhaltet entsprechend jeweils nur eins der Enzyme.

Bestandteil	Referenz Vorher	Referenz ohne Säure	Referenz mit Säure	Reaktion ohne Säure	Reaktion mit Säure
Enzym-Mix	0 µL	0 µL	0 µL	30 µL	30 µL
Edukt-Mix	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
GEFI	30 µL	30 µL	30 µL	0 µL	0 µL
H ₂ O	0 µL	2 µL	0 µL	2 µL	0 µL
Ameisensäure (4 %)	0 µL	0 µL	2 µL	0 µL	2 µL

Zunächst wurden Edukt-Mix und Wasser bzw. Ameisensäure der Referenzen mit und ohne Säure und der Reaktionen mit und ohne Säure in einem 200 µL PCR Tube vorgelegt. Anschließend wurde der Enzym-Mix hinzugegeben, welcher entweder MatB, MatA oder CitZ enthielt. Die Reaktions-Mixe wurden für 16 h bei 25 °C temperiert und anschließend zusammen mit der frisch angesetzten Referenz Vorher auf Eis gekühlt. Alle Reaktions-Mixe wurden daraufhin als messtechnisches Triplikat mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) gemessen. Die Referenz Vorher wurde entsprechend keinem äußeren Einfluss (Reaktionszeit, Temperatur, Säure) ausgesetzt und entspricht dem Reaktions-Mix. Die Referenzen mit und ohne Säure wurden in Abwesenheit der Enzyme einer Reaktionszeit von 16 h und 25 °C ausgesetzt. Die Reaktionen mit und ohne Säure wurden in Anwesenheit der Enzyme einer Reaktionszeit von 16 h und 25 °C ausgesetzt. Sowohl GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl) als auch Wasser wurden zum Volumenausgleich anstelle des Enzym-Mixes und der Ameisensäure hinzugegeben. Der pH-Wert sinkt dabei durch die Hinzugabe der Säure von pH 8.0 auf pH 3.2. Insgesamt wurden ein biologisches Replikat und drei messtechnische Replikate durchgeführt.

6.10.3 Bestimmung der Enzymaktivität der nativen Enzyme

Zur Bestimmung der Aktivität der freien Enzyme MatB, MatA und CitZ wurden drei gleichwertige 500 μL Reaktionsansätze (A, B und C; Tabelle 33) angesetzt und der Umsatz der Reaktion zu den Zeitpunkten von 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Minuten durch Probenentnahme und Stoppen der Reaktion mit Säure bestimmt. Dazu wurden die Enzym- und Edukt-Mixe zunächst in einem Thermomixer Comfort von Eppendorf auf 25 °C temperiert. Die Reaktionen wurden mit jeweils einer Minute Zeitversatz durch Zugabe des Enzym-Mixes zum vorgelegten Edukt-Mix gestartet und kontinuierlich bei 600 rpm geschüttelt. Danach wurden 20 μL Probe entsprechend dem Schema (siehe Kapitel 6.10.1 *Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten* Tabelle 31) entnommen und in ein 0.2 ml PCR Tube mit 2 μL vorgelegter Ameisensäure (1 %) gemischt. Der im Schema angegebene Endzeitpunkt ist dabei derjenige, bei dem der Reaktions-Mix zur Säure hinzugefügt wurde. Zehn Mikroliter der entnommenen Proben wurden anschließend direkt in ein PCR Microvial überführt, bei ≤ 7 °C in der Probengarage der CE temperiert und im Rahmen einer Messserie mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert. Es wurden dabei für jede Probe drei technische Replikate gemessen. Insgesamt wurden entsprechend drei biologische und drei messtechnische Replikate durchgeführt. Die verbliebenen 10 μL Restvolumina der Proben wurden als Rückstellproben bei - 80°C gelagert.

Tabelle 33: Zusammensetzung des Reaktions-Mixes der Reaktionsansätze A, B und C zur Bestimmung der Aktivität von freien Enzymen.

Mix	Volumen [μL]
Enzym-Mix	187,5
Edukt-Mix	312,5

6.10.4 Bestimmung der Enzymaktivität der immobilisierten Enzyme

Zur Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Enzyme MatB, MatA und CitZ wurden drei gleichwertige 500 μL Reaktionsansätze (A, B und C; Tabelle 34) angesetzt und der Umsatz der Reaktion zu den Zeitpunkten von 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Minuten durch Probenentnahme und Stoppen der Reaktion mit Säure bestimmt. Dazu wurden die Enzym- und Edukt-Mixe zunächst in einem Thermomixer Comfort von Eppendorf auf 25 °C temperiert. Der immobilisierte Enzym-Mix wurde unmittelbar vor dem Starten der Reaktion mit Hilfe einer Pipette (siehe Kapitel 6.9.4 *Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen*) durchmischt bis die Beads gleichmäßig in Suspension vorlagen und kein Bodensatz mehr erkennbar war. Die Reaktionen wurden mit jeweils einer Minute Zeitversatz durch Zugabe des immobilisierten Enzym-Mixes zum vorgelegten Edukt-Mix gestartet und kontinuierlich bei 600 rpm geschüttelt. Danach wurden 20 μL Probe entsprechend dem Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (siehe Kapitel 6.10.1 *Schema zur Bestimmung von Enzymaktivitäten* Tabelle 31) entnommen und in ein 0.2 ml PCR Tube mit 2 μL vorgelegter Ameisensäure (1 %) gemischt. Der im Schema angegebene Endzeitpunkt ist dabei derjenige, bei dem der Reaktions-Mix zur Säure hinzugefügt wurde. Bei der Probennahme wurde der Reaktions-Mix einmal durch Aufziehen und Ablassen des Reaktions-Mixes mit einer Pipette durchmischt, damit potenziell abgelagerte Beads erneut in eine gleichmäßige Suspension übergehen. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Enzymkonzentration konstant blieb. Die 0.2 ml PCR Tubes wurden anschließend für fünf Minuten auf einen eLander Magneten gestellt, damit sich die Beads am Boden des 0.2 ml PCR Tubes absetzen. Zehn Mikroliter des Überstandes der entnommenen Proben wurden anschließend direkt in ein PCR Microvial überführt, bei ≤ 7 °C in der Probengarage der CE temperiert und im Rahmen einer Messserie mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) analysiert. Es wurden dabei für jede Probe drei technische Replikate gemessen. Insgesamt wurden entsprechend drei biologische und drei messtechnische Replikate durchgeführt. Die verbliebenen 10 μL Restvolumina der Proben wurden als Rückstellproben bei - 80°C gelagert.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Reaktions-Mixes der Reaktionsansätze A, B und C zur Bestimmung der Aktivität von immobilisierten Enzymen.

Mix	Volumen [μL]
Immobilisierter Enzym-Mix	187,5
Edukt-Mix	312,5

6.10.5 Untersuchungen zur Enzymaktivität

Bei den Untersuchungen zur Enzymaktivität unter dem Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen sollte untersucht werden, inwieweit das Einfrieren in flüssigen Stickstoff und das anschließende Auftauen Einfluss auf die Enzymaktivität von MatB, MatA und CitZ haben. Dazu wurde eine systematische Vorgehensweise erarbeitet, die nachfolgend schematisch dargestellt ist (Abbildung 42).

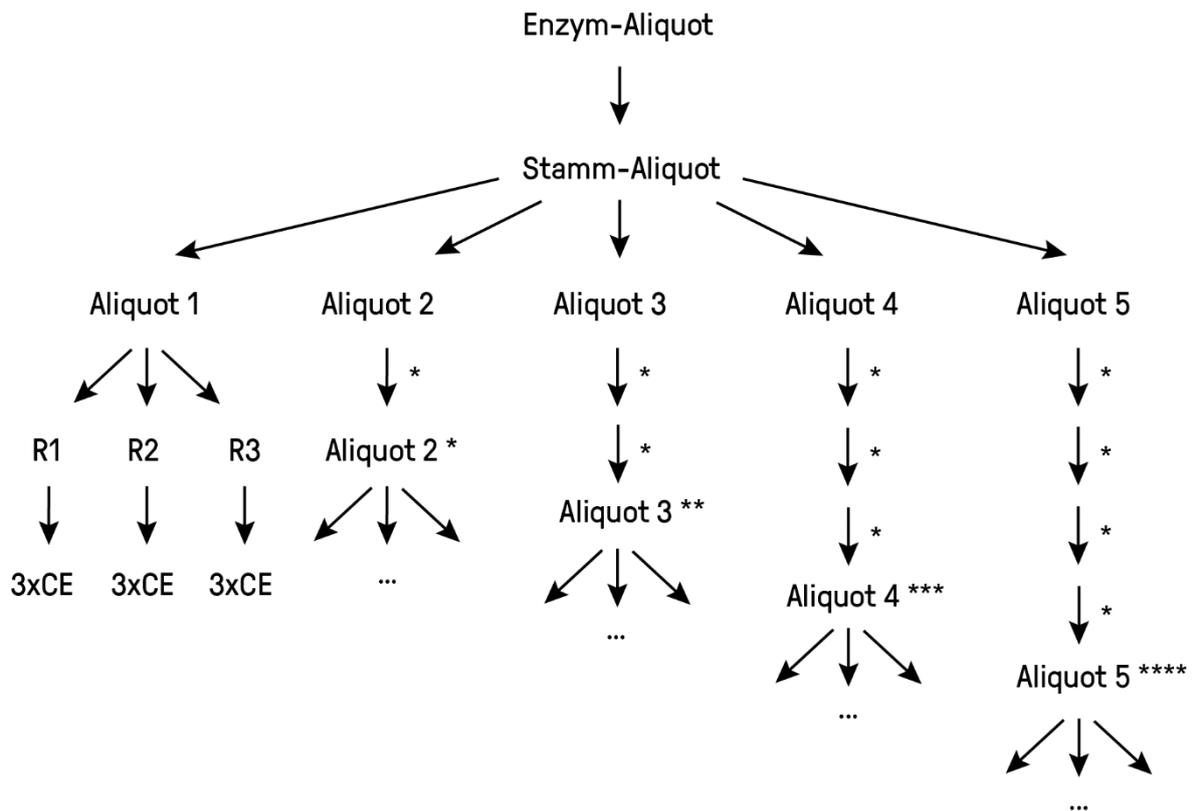


Abbildung 42: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise für die Untersuchungen zur Enzymaktivität unter dem Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen. Reaktionen (R1, R2 und R3). Einfrier- und Auftauzyklus (*). CE Triplikat Messungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (3xCE). Verkürzte Darstellung, aber gleiches Verfahren wie bei Aliquot 1 (...).

Zunächst wurde ein bislang ungenutztes Enzym-Aliquot (MatB, MatA oder CitZ) bei 37 °C zügig aufgetaut und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei diesen Aliquoten handelt es sich um die in Kapitel 6.9.1 *Ansetzen der Enzym-Stammaliquote* beschriebenen Enzym-Aliquote, die im Rahmen dieses Projektes zur Verfügung gestellt worden sind. Die Enzym-Aliquote wurden anschließend sorgfältig mit einer Pipette durchmischt (siehe Kapitel 6.9.4 *Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen*) und mit GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH 8,0) in einem 5 ml Protein LoBind Tube zu einem 2,5 ml Stamm-Aliquot verdünnt. Das Stamm-Aliquot wurde zehn Mal mit einer Pipette durchmischt und in fünf 1,5 ml Protein LoBind Tubes zu je 500 µL Aliquoten (Aliquot 1-5) aufgeteilt. Anschließend wurden die Aliquote erneut gemischt und einer Anzahl von null bis vier Einfrier- und Auftauzyklen (*) ausgesetzt. Dabei bedeutet

ein Einfrier- und Auftauzyklus das Einfrieren des Aliquots in flüssigen Stickstoff, zweiminütiges Aufwärmen bei Raumtemperatur, zügiges Auftauen bei 37 °C und eine fünfminütige Verweilzeit bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden ggf. weitere Zyklen durchgeführt. Die im Schema gewählte Darstellung wurde für die Aliquote 2-5 aus übersichtsgründen verkürzt dargestellt (...), allerdings wurde mit allen Aliquoten gleich verfahren. Anschließend wurden mit jedem Aliquot drei Enzymreaktionen (R1, R2 und R3) für 15 h bei 25 °C durchgeführt (für Reaktions-Mix siehe Kapitel 6.9.5 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit freien Enzymen*). Die Reaktionen wurden nach der Reaktionszeit mit Säure gestoppt (siehe Kapitel 6.10.2 *Untersuchungen zum Stoppen von Enzymreaktionen durch pH-Wert Änderung*), in ein PCR Microvial überführt und anschließend mit der Standard CE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) im Triplikat gemessen. Insgesamt wurden drei biologische Replikate der Enzymreaktionen und drei messtechnische Replikate durchgeführt. Die genauen Konzentrationen der verschiedenen Aliquote sind nachfolgend dargestellt (Tabelle 35).

Tabelle 35: Verwendete Enzymkonzentrationen zu den Untersuchungen zur Enzymaktivität unter dem Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen.

Enzym	Enzymkonzentration im Enzym-Aliquot [mg/mL]	Enzymkonzentration im Stammaliquot und Aliquot 1-5 [µg/mL]	Enzymkonzentration in Reaktion [µg/mL]	Reaktionszeit [h]
MatB	1	33,3	12,5	15
MatA	1	3,33	1,25	15
CitZ	1	3,33	1,25	1

Die Konzentration von MatB und MatA wurden entsprechend des Standard Enzym-Mixes (siehe Kapitel 6.9.2 *Enzym-Mix für enzymatische Reaktionen*) verwendet. Die Konzentration und die Reaktionszeit von CitZ wurde um den Faktor 10 und 15 verringert, um eine vollständige Umsetzung des Edukts während der Reaktionen zu vermeiden und Aktivitätsunterschiede auflösen zu können.

6.11 Immobilisierung von Enzymen

6.11.1 Berechnung der Kapazität und Beladung der Beads

Die Kenntnis über die Beladung der magnetischen HisPur™ Ni-NTA Beads ist in dieser Arbeit entscheidend, um eine sichere Aussage über die vorhandene Enzymkonzentration tätigen zu können. Die Beladung beschreibt dabei die prozentuale Belegung aller Bindungsstellen der Beads mit 6xHis-getaggten Enzymen. Da die Bestimmung der Beladung nicht trivial ist, wird die hier zugrundeliegende Berechnung nachfolgend am Beispiel von MatB erläutert.

Die Kapazität, also die Menge Protein, die maximal auf einer bestimmten Menge Beads gebunden werden kann, wird für die magnetischen HisPur™ Ni-NTA Beads vom Hersteller mit $\geq 500 \mu\text{g}$ 6x-His-tagged GFP/mL Beads angegeben¹⁴². GFP besitzt eine molekulare Masse von 26,9 kDa (persönliche Kommunikation mit Dr. Sandra Hoefgen vom Leibniz-Institut für Naturstoff-forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Deutschland). Die molekulare Masse von 6xHis-getagtem MatB mit GFP Fluoreszenz-Tag ist mit 83,4 kDa anzugeben (persönliche Kommunikation mit Dr. Sandra Hoefgen vom Leibniz-Institut für Naturstoff-forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Deutschland). Die molekulare Masse pro MatB_deGFP Molekül mit einem 6xHis-Tag entsprechend deutlich höher als das GFP Molekül selbst, für das die Kapazität vom Hersteller angegeben wird. Unter der Annahme, dass die gleiche Anzahl von MatB Molekülen immobilisierbar ist, wie es bei GFP der Fall ist, lässt sich Kapazität (K) zunächst wie folgt berechnen:

$$K (\text{MatB auf Beads}) = \frac{M(\text{MatB})}{M(\text{GFP})} * 500 \mu\text{g 6xHis tagged GFP/ml Beads}$$

$$K (\text{MatB auf Beads}) = \frac{83,4 \text{ kDa}}{26,9 \text{ kDa}} * 500 \mu\text{g 6xHis tagged GFP/ml Beads}$$

$$K (\text{MatB auf Beads}) = 1550 \mu\text{g 6xHis tagged MatB/ml Beads}$$

Die berechnete Kapazität liegt aufgrund der höheren Masse von MatB entsprechend höher als die Kapazität für GFP, wenn die gleiche Anzahl von MatB Molekülen immobilisierbar ist, wie es bei GFP der Fall ist.

Entscheidend zur Berechnung der Beladung (B) ist die Menge an Enzym pro Volumen Beads-Lösung. Für den wässrigen Enzym-Mix eine Dichte von 1 g cm^{-3} angenommen. Das benötigte Beads-Volumen beträgt $300 \text{ }\mu\text{L}$ mit einer Konzentration von MatB von $0,0333 \text{ mg/ml}$. Für die Immobilisierung in Kapitel 6.11.2 *Immobilisierung der Enzyme auf Beads* wird die Beladung (B) beispielhaft wie folgt berechnet:

$$B (\text{MatB auf Beads}) = \frac{m(\text{Enzym})[\mu\text{g}] * \frac{1000 \mu\text{L}}{V(\text{Beads})[\mu\text{L}]}}{K(\text{Enzym})} * 100 \%$$

$$B (\text{MatB auf Beads}) = \frac{33,3 \mu\text{g} * \frac{1000 \mu\text{L}}{300 \mu\text{L}}}{1550 \mu\text{g}} * 100 \%$$

$$B (\text{MatB auf Beads}) = 7,2 \%$$

Anhand der Gleichungen wird ersichtlich, dass die Beladung von der Kapazität und diese wiederum von der Molekülmasse des zu bindenden Enzyms abhängig sind. Daher wurden die Kapazitäten und Beladungen für die einzelnen Enzyme separat berechnet und in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 36: Zusammenfassung der bestimmten Kenngrößen zur Immobilisierung von Enzymen auf Beads bei der Bestimmung der Aktivitäten von immobilisierten Enzymen und bei den zeitaufgelösten Reaktionen mit immobilisierten Enzymen.

Enzym	Molekülmasse [kDa]	Kapazität [μg]	Masse Stammaliquot [μg]	Volumen Beads [μL]	Beladung [%]	Konzentration final [$\mu\text{g/mL}$]
MatB	83,4	1550	33,3	300	7,2	33,3
MatA	79,9	1485	3,33	300	0,8	3,33
CitZ	71,8	1335	33,3	300	8,3	33,3

Tabelle 37: Zusammenfassung der bestimmten Kenngrößen zur Immobilisierung von Enzymen auf Beads bei den Reaktorreaktionen.

Enzym	Molekülmasse [kDa]	Kapazität [μg]	Masse Enzym Stammaliquot [μg]	Volumen Beads [μL]	Beladung [%]	Konzentration final [$\mu\text{g/mL}$]
MatB	83,4	1550	33,3	150	14,4	33,3
MatA	79,9	1485	3,33	150	1,6	3,33
CitZ	71,8	1335	33,3	150	16,6	33,3

Die dargestellten Ansätze sollen dabei vor allem das beispielhafte Verhältnis der Komponenten darstellen, wobei das Gesamtvolumen entsprechend angepasst werden kann. Die hier aufgeführten Ansätze werden in den Reaktionen durch die Verdünnung mit Edukt-Mix im Reaktions-Mix auf die Standard Enzym-Konzentrationen final verdünnt (siehe Kapitel 6.9.6 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen*). Anzumerken ist, dass unter den getroffenen Annahmen die Beladung der Beads mit Enzymen nur näherungsweise bestimmt werden kann. Beispielsweise wurden sterische Hinderungen bei der Immobilisierung aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen und damit verbundene veränderte Bindungsaffinitäten an dieser Stelle nicht berücksichtigt. Um von einer vollständigen Immobilisierung der eingesetzten Enzym-Menge und damit von einer definierten Enzym-Konzentration ausgehen zu können, wurde die Beladung vom Ansatz eher konservativ und deutlich entsprechend kleiner als 20 % gewählt.

6.11.2 Immobilisierung der Enzyme auf Beads

Die Immobilisierung von MatB, MatA und CitZ oder Gemische aus diesen erfolgte auf magnetischen HisPur™ Ni-NTA Beads. Die Vorgehensweise bei der Immobilisierung war dabei unabhängig von der späteren Verwendung stets die gleiche. Lediglich die verwendeten Volumina, Konzentrationen und Beladungen unterschieden sich, werden aber an entsprechender Stelle kenntlich gemacht. Eine beispielhafte Vorgehensweise ist nachfolgend beschrieben.

Zunächst wurden die magnetischen HisPur™ Ni-NTA Beads mit Hilfe einer Pipette zu einer gleichmäßigen Suspension aufgeschlämmt, 300 µL Beads-Suspension entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Vial überführt. Zu der Beads-Suspension wurden 1000 µL GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH 8,0) hinzugefügt und gemischt. Die 1300 µL verdünnte Beads-Suspension wurde für 10 Minuten auf zwei eLander Magneten gestellt. Nach zehn Minuten wurden 1000 µL Überstand abgenommen und die verbleibenden 300 µL Beads-Suspension inklusive 1,5 ml Eppendorf Vial gewogen. Anschließend wurde die Beads-Suspension weitere vier Mal mit 1000 µL GEFI versetzt, die Suspension für 10 Minuten auf zwei eLander Magneten gestellt und 1000 µL Überstand abgenommen. Diese Schritte dienten zum Waschen und Umpuffern der Beads-Suspension, die ursprünglich in 20-prozentigem Ethanol vorlag. Anschließend konnten die Beads zur Immobilisierung genutzt werden.

Dafür wurde zuerst ein Enzym Stamm-Aliquot zügig bei 37 °C aufgetaut, auf Raumtemperatur aufgewärmt und mit Hilfe einer Pipette gemischt (siehe Kapitel 6.9.4 *Mischen von Enzym- und Reaktions-Mixen*). Anschließend wurden 33,3 µL des Enzym Stamm-Aliquots mit 967,7 µL GEFI versetzt und erneut gemischt. Dieser Enzym-Mix wurde auf die gewaschenen 300 µL Beads-Suspension gegeben und sofort drei Mal mit der Pipette gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von mindestens einer Stunde. Der immobilisierte Enzym-Mix wurde fünf Mal mit 1000 µL GEFI gewaschen (s.o.). Zum

Schluss wurden erneut 1000 μL Überstand abgenommen, sodass 300 μL immobilisierter Enzym-Mix übrig war. Dieser wurde erneut inklusive Vial gewogen und das Gewicht auf das zu Beginn der Immobilisierung notierte Gewicht durch Zugabe oder Abnahme von GEFI oder Überstand angepasst. So wurde sichergestellt, dass die Konzentration der Beads nicht durch die Waschvorgänge verändert wurde. Final wurden 700 μL GEFI hinzugegeben, um 1000 μL gebrauchsfertige immobilisierten Enzym-Mix für die Enzymreaktionen zu erhalten. Eine genaue Zusammensetzung der immobilisierten Enzym-Mixe von MatB, MatA und CitZ ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tabelle 38).

Tabelle 38: Zusammensetzung der immobilisierten Enzym-Mixe zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten und zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen.

Enzym	Konzentration Stammaliquot [mg/mL]	Volumen Stammaliquot [μL]	Volumen Beads [μL]	Volumen Final [μL]	Konzentration final [$\mu\text{g/mL}$]	Beladung der Beads [%]
MatB	1,0	33,3	300	1000	33,3	7,2
MatA	0,1	33,3	300	1000	3,33	0,8
CitZ	1,0	33,3	300	1000	33,3	8,3

Aus den immobilisierten 1er Enzym-Mixen wurde bei Bedarf immobilisierter 3er Enzym-Mix bestehend aus MatB, MatA und CitZ hergestellt (Tabelle 39). Dazu wurden die immobilisierten Enzym-Mixe auf zwei eLander Magneten gestellt und zwei Drittel des Volumens als Überstand abgenommen. Die verbliebene immobilisierte 1er Enzym-Mixe wurde durch Mischen mit einer Pipette in eine gleichmäßige Suspension überführt und zu gleichen Anteilen mit den anderen 1er Enzym-Mixen gemischt. Sowohl die Immobilisierungscharge als auch die finale Konzentration des immobilisierten 3er Enzym-Mixes ist entsprechend die gleiche, wie die der immobilisierten 1er Enzym-Mixe.

Tabelle 39: Zusammensetzung der immobilisierten Enzym-Mixe zur Bestimmung der zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen.

Enzym-Mix	Konzentration final [$\mu\text{g/mL}$]	Beladung der Beads [%]
MatB	33,3	5,4
MatA	3,33	
CitZ	33,3	

6.12 Enzym-Reaktionen im Reaktor

6.12.1 Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen

Ziel bei der Beladung von Spritzenfiltern mit auf HisPur™ Ni-NTA Beads immobilisierten Enzymen ist eine gleichmäßige, luftfreie Verteilung der Beads auf der Filtermembran. Dadurch wird eine gleichmäßige Schüttung zur Durchströmung gewährleistet. Beim Beladungsvorgang sollte die mechanische Belastung der Beads zudem möglichst gering sein, um die über Chelat-Komplexe reversibel gebundenen Enzyme nicht von den Beads abzulösen. Dazu wurde ein separater Versuchsaufbau zur Beladung von auf Beads immobilisierten Enzymen verwendet (Abbildung 43).

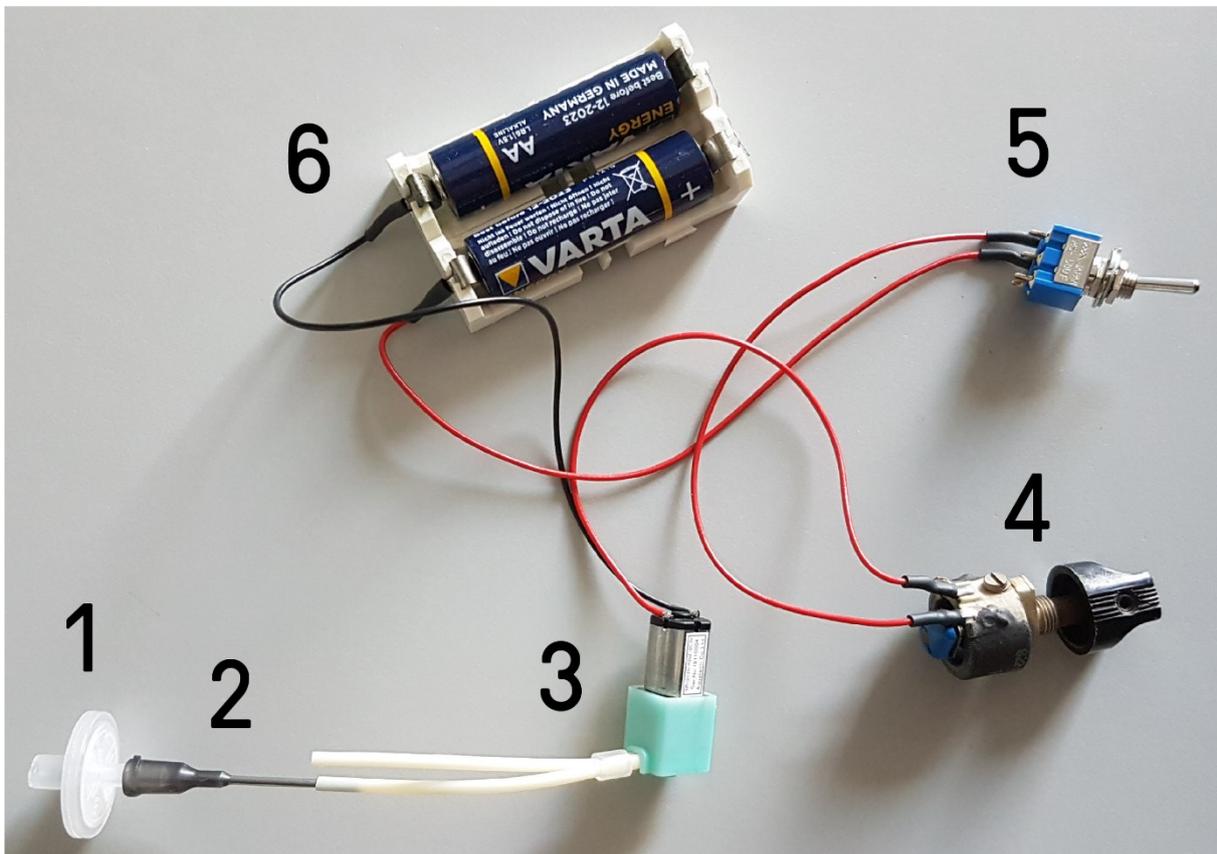


Abbildung 43: Versuchsaufbau zur Beladung von auf Beads immobilisierten Enzymen. 1: Machery Nagel Spritzenvorsatzfilter (Chromafil Xtra RC 13mm 0,45 μm). 2: VIEWEG Dosiernadel (Standard mit Gewinde Innendurchmesser 1,19 mm, 1''). 3: Aquatech Peristaltik-Pumpe (RP-Q1.2N-P20Z-DC3V 0.2ml/min). 4: Rosenthal Drehpotentiometer (822 WM 50 P4 47 Ω P). 5: Miyama Parts Kippschalter (MS 500-F 6A-125VAC). 6: Batterien mit Batterien Halter und Verbindungskabeln.

Bei diesem Versuchsaufbau wird ein Spritzenfilter (1) über eine Dosiernadel (2) in Flussrichtung an eine Peristaltik-Pumpe (3) angeschlossen. Die Pumpe ist über einen Drehpotentiometer (4) und einen Kippschalter (5) an eine Energiequelle (6) angeschlossen. Zur Beladung wird der Spritzenfilter angehoben und vertikal ausgerichtet. Der immobilisierte Enzym-Mix wird in das weibliche Ende des

Spritzenfilters pipettiert. Die Pumpe wird eingeschaltet und der immobilisierte Enzym-Mix angesaugt. Die Beads verteilen sich bei geringer Flussrate, die sich durch das Drehpotentiometer einstellen lässt, gleichmäßig auf der Filtermembran. Der immobilisierte Enzym-Mix wird schrittweise durch mehrmaliges Pipettieren vollständig auf den Filter gegeben. Solange die Pumpe eingeschaltet ist, muss der Filter vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein, damit keine Luft in den Filter gelangt. Die Luft verhindert die gleichmäßige Verteilung der Beads auf der Filtermembran. Wenn der immobilisierte Enzym-Mix vollständig eingefüllt ist, wird der Filter solange mit GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH 8,0) gespült, bis dabei keine Beads mehr aufgeschlemmt werden und die Beads auf der Filtermembran immobilisiert sind. Abschließend wird die Verteilung der Beads und der Filter auf potenzielle Lufteinschlüsse überprüft. Diese lassen sich mit bloßem Auge erkennen (Abbildung 44). Sollte eine ungleichmäßige Verteilung oder Lufteinschlüsse identifiziert werden, wird die Immobilisierung wiederholt. Danach werden die auf dem Filter immobilisierten Beads im Reaktor verwendet. Die Enzym-Konzentration wird dabei grundsätzlich auf Basis des Gesamtreaktorvolumens von 2,5 ml angegeben.

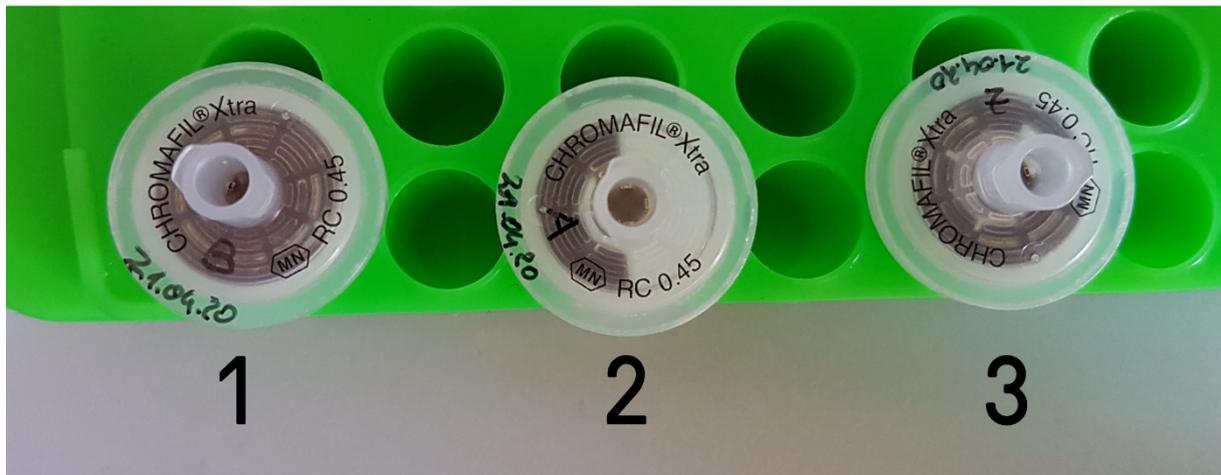


Abbildung 44: Beladung von Machery Nagel Spritzenvorsatzfiltern (Chromafil Xtra RC 13mm 0,45 µm) mit auf HisPur™ Ni-NTA Beads immobilisierten Enzymen. 1: Gleichmäßig und ohne Lufteinschlüsse im Spritzenfilter verteilte Beads mit immobilisierten MatB. 2: Ungleichmäßig und mit Lufteinschlüssen im Spritzenfilter verteilte Beads mit immobilisierten MatA. 3: Gleichmäßig und ohne Lufteinschlüsse im Spritzenfilter verteilte Beads mit immobilisierten CitZ.

6.12.2 Präparation des Reaktors

Für jede Enzym-Reaktion im Reaktor wurde der Reaktor neu präpariert. Zunächst wurde ein 22 cm langer Saint-Gobain Sani-Tech® ULTRA-C-040-0 Peristaltik-Pumpen Schlauch in die Aquatech RP-QX1.5S-1Z-DC3V Peristaltik-Pumpe (Flussrate 1,1 ml/min) eingelegt. Am Ende des Peristaltik-Pumpen Schlauchs (in Flussrichtung nach der Pumpe) wird ein Schlauch/Filter Luer Adapter angeschlossen. Das

andere Ende des Peristaltik-Pumpen Schlauchs (in Flussrichtung vor der Pumpe) wurde über ein intern angefertigtes (ISAS e.V. Werkstatt) CE-Vial Anschlussstück an ein 1,5 ml Standard CE-Vial angeschlossen. Als nächstes wurden die „Flügel“ und die Kanüle einer Wing-Flo Flügelkanüle so abgetrennt, dass ein 19 cm langes Schlauchstück mit Luer-Lock Anschluss und Verschlusskappe verbleibt. Die Verschlusskappe wird anschließend entfernt. Der Schlauch wird am zugeschnittenen Ende über ein zweites CE-Vial Anschlussstück an das 1,5 ml Standard CE-Vial angeschlossen. Das 1,5 ml Standard CE-Vial wird mit 1 ml GEFI (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH 8,0) befüllt und die Pumpe eingeschaltet. Der GEFI wird durch den Schlauch gepumpt und verdrängt die vorhandene Luft. Wenn der Puffer am offenen Ende des Peristaltik-Pumpen Schlauchs am Schlauch/Filter Luer Adapter austritt, wird die Pumpe ausgeschaltet. Wichtig ist, dass der austretende Puffer am Ende des Adapters einen Konus bildet, um diesen ohne Lufteinschlüsse mit dem Filter zu verbinden. Bevor die zuvor mit Beads beladenen Filter (siehe Kapitel 6.12.1 *Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen*) und der Schlauch/Spritzenfilter Luer Adapter verbunden werden, wird mit einer Pipette etwas GEFI in das weibliche Ende des Spritzenfilters gegeben, sodass der überschüssige Puffer dort ebenfalls einen Konus bildet. Die Konusse werden anschließend miteinander luftfrei verbunden und die Verbindung zwischen Schlauch/Spritzenfilter Luer Adapter und Spritzenfilter geschlossen. Der Spritzenfilter wird angehoben, vertikal ausgerichtet und die Pumpe eingeschaltet. Die im Spritzenfilter und den Anschlussstücken verbliebene Luft wird dabei verdrängt. Sobald keine Luft mehr vorhanden ist wird die Pumpe ausgeschaltet. Die beiden anderen mit Beads beladenen Spritzenfilter werden anschließend auf die gleiche Art und Weise luftfrei angeschlossen. Zum Schluss wird der letzte Spritzenfilter an den Luer-Lock Anschluss der Flügelkanüle angeschlossen, die Pumpe eingeschaltet und die Luft im letzten Schlauchstück verdrängt. Zwischendurch wird ggf. GEFI im 1,5 ml Standard CE-Vial nachgefüllt, damit dieses nicht leerläuft und keine Luft angesaugt wird. Das durch Auslitern bestimmte Gesamtvolumen des Reaktors beträgt 2,5 ml. Der Füllstand im 1,5 ml Standard CE-Vial bei einem 2,5 ml Flüssigkeitsvolumen im Reaktor wurde zuvor markiert. Dieser Füllstand wird vor jeder Benutzung durch Hinzugabe oder Entnahme von GEFI bei ausgeschalteter Pumpe eingestellt. Die Peristaltik-Pumpen Schläuche werden zudem so verlegt oder ggf. mit Klebeband fixiert, dass diese nicht über den Reaktorrand bzw. über das 1,5 ml Standard CE-Vial hinausragen, um Kontakt mit Bauteilen der CE zu verhindern. Zudem wird darauf geachtet, dass die Schläuche nicht geknickt und gequetscht werden. Zum Schluss wird eine 5-minütige Dichtigkeitsprüfung durchgeführt, wobei die einzelnen Anschlusspunkte auf Flüssigkeitsaustritte hin untersucht werden. Anschließend ist der Reaktor einsatzbereit.

6.12.3 Zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor

Nach der Präparation des Reaktors (siehe Kapitel 6.12.2 *Präparation des Reaktors*) erfolgte die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor. Dazu wurde die Probengarage der CE auf 25 °C temperiert und der Reaktor in das *Inlet Sample Tray* eingesetzt. Der Edukt-Mix wurde separat in das *Outlet Sample Tray* gestellt. Die Reaktions-Referenz wird angesetzt (siehe Kapitel 6.9.6 *Zeitaufgelöste Reaktionen mit immobilisierten Enzymen*) und in das *Buffer Inlet Tray* gestellt. Anschließend folgt die erste Referenzmessung, wobei der Reaktor und alle beteiligten Mixe auf 25 °C temperiert werden. Nach der Referenzmessung werden der Reaktor und der Edukt-Mix entnommen. Aus dem 1,5 ml Standard CE Vial wird 1 ml GEFI entnommen und 1 ml Edukt-Mix hinzugegeben. Der Reaktor wird erneut in das *Inlet Sample Tray* eingesetzt und die Peristaltik-Pumpe gestartet (Abbildung 45). Die vorprogrammierte Messserie wurde sofort gestartet, wobei anschließend 36 Mal der Reaktions-Mix in zeitlichen Abständen von ca. 24,5 min und abschließend erneut der Reaktions-Referenz, automatisiert injiziert wurde. Nach der Messserie wird der Reaktor erneut präpariert (siehe Kapitel 6.12.2 *Präparation des Reaktors*).



Abbildung 45: Präparierter und für die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im *Inlet Sample Tray* eingesetzter Reaktor.

6.12.4 Untersuchung zur Stabilität der Enzym-Immobilisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität der Enzym-Immobilisierung näher untersucht. Es ist bekannt, dass die Immobilisierung von Proteinen über Histidin-Tags an Nickel NTA Beads nicht auf einer kovalenten Bindung basiert (siehe Kapitel 3.7.2 *Stabilität der Enzym-Immobilisierung*). Daher ist davon auszugehen, dass zwischen Medium und Beads ein Gleichgewicht zwischen freiem und immobilisiertem Protein besteht. Zur Klärung wurde eine Charge an immobilisiertem Enzym drei Mal in einer 15 stündigen Reaktion im Reaktor verwendet, wobei der Reaktor zwischen den Reaktionen gereinigt und mit frischen Edukt-Mix befüllt wurde.

Zur Untersuchung der Stabilität der Immobilisierung wurden MatB, MatA und CitZ zunächst separat auf Beads immobilisiert (siehe Kapitel 6.11.2 *Immobilisierung der Enzyme auf Beads*), auf die Spritzenfilter des Reaktors (siehe Kapitel 6.12.1 *Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen*) gegeben, der Reaktor präpariert (siehe Kapitel 6.12.2 *Präparation des Reaktors*) und eine zeitaufgelöste Enzymreaktion (siehe Kapitel 6.12.3 *Zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor*) im Reaktor durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die gebrauchten Batterien gegen neue Batterien ausgetauscht, das Reaktions-Gemisch aus dem 1,5 ml Standard CE Vial entnommen und 1 ml Reinstwasser hinzugegeben. Die Peristaltik-Pumpe wurde für 1 Minute eingeschaltet und der Reaktor durchspült. Daraufhin wurde 1 ml Reaktionsgemisch aus dem 1,5 ml Standard CE Vial entnommen und erneut 1 ml Reinstwasser hinzugegeben. Nach insgesamt 10, 15 und 20 Spülvorgängen wurde zur Dokumentation des Reinigungsfortschritts der Reaktor in die CE gestellt und eine Messung mit der Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt. Anschließend wurde erneut eine zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor durchgeführt, wobei die gleichen auf Spritzenfiltern immobilisierten Enzym-Mixe genutzt wurde. Nach der zweiten Reaktion folgte erneut die Reinigung des Reaktors mit 20 Spülvorgängen (nach den ersten Spülvorgängen festgelegter Standard). Zum Schluss wurde eine dritte zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor mit den gleichen auf Spritzenfiltern immobilisierten Enzym-Mixen durchgeführt.

6.12.5 Sequenzielle Zugabe von immobilisierten Enzymen

Bei der sequenziellen Zugabe von immobilisierten Enzymen im Reaktor wurde zunächst der Reaktor präpariert (siehe Kapitel 6.12.2 *Präparation des Reaktors*). Wesentliche Unterschiede bei der Präparation des Reaktors ergeben sich allerdings bei der Zugabe der mit immobilisierten Enzymen beladenen Filter. Zunächst wurde der zuvor mit immobilisierten MatB beladene Filter (siehe Kapitel 6.12.1 *Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen*) und zwei leere Filter im Reaktor eingesetzt. Der Reaktor wurde anschließend vollständig präpariert und eine zeitaufgelöste Messung der Reaktion (siehe Kapitel 6.12.3 *Zeitaufgelöste Enzym-Reaktion im Reaktor*) gestartet. Dabei wurden allerdings 12 anstatt der üblichen 36 Messungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode (siehe Kapitel 6.7.1 *Standard CZE-UV/Vis Methode*) durchgeführt. Nach den 12 Messungen wurde der Reaktor geöffnet und der zweite Filter (in Flussrichtung hinter dem Filter mit MatB) entnommen. Der Reaktions-Mix, der sich im zweiten Filter befindet, wurde zur späteren Wiederverwendung mit einer Einmalspritze in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurde der zweite Filter mit immobilisierten MatA beladen. Nachdem der Filter mit immobilisierten MatA beladen war, wurde die restliche Flüssigkeit im Filter mit Hilfe einer zweiten Peristaltik-Pumpe (siehe Kapitel 6.12.1 *Beladen von Spritzenfiltern mit immobilisierten Enzymen*) abgesaugt. Ein Teil des zuvor entnommenen Reaktions-Mixes wurde anschließend in das weibliche Anschlussstück des Filters pipettiert, sodass der überstehende Reaktions-Mix einen Konus bildet. Die Pumpe des Reaktors wurde kurz eingeschaltet, sodass sich am männlichen Anschlussstück des mit immobilisierten MatB beladenen Filters ebenfalls ein Flüssigkeitskonus bildet. Die beiden Filter wurden luftfrei verbunden. Der mit immobilisierten MatA beladene zweite Filter wurde angehoben, vertikal ausgerichtet und mit eingeschalteter Reaktorpumpe die restliche Luft im Filter verdrängt. Gleichermaßen wurde der dritte leere Filter verbunden. Der übriggebliebene, zuvor entnommene Reaktions-Mix, wurde in das CE-Vial des Reaktors gegeben. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass das Reaktionsvolumen gleichblieb und kein Reaktions-Mix mit bereits fortgeschrittener Reaktion verloren ging. Erneut wurden 12 zeitaufgelöste Messungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt, der dritte Filter mit immobilisierten CitZ beladen und gleichermaßen in den Reaktor eingebaut. Zum Schluss wurden 36 zeitaufgelöste Messungen mit der Standard CZE-UV/Vis Methode durchgeführt.

6.13 Datenverarbeitung

Aufgrund der hohen Anzahl an zu verarbeitenden Daten wurde die Auswertung automatisiert mit Hilfe von programmierten R Skripten durchgeführt.

6.13.1 Ausgabe von elektrophetischen Daten

Die Elektropherogramme zu den CZE-UV/Vis und CZE-LIF Messungen werden mit Hilfe der Karat 9.0 Software als ASCII-Datei exportiert und mit Hilfe eines intern geschriebenen und freundlicherweise von U. Münchberg (ISAS e.V.) bereitgestellten Skripts in R (The R Foundation for Statistical Computing, Version 3.5.3) weiterverarbeitet. Die Daten zu den Elektropherogrammen (Signale bei einer Wellenlänge von 210 nm, Strom und Spannung) werden extrahiert und in geordneter Form als Text-Datei zur weiteren Verarbeitung in Origin (Version 2018G) ausgegeben.

6.13.2 Berechnung von Analyt-Konzentrationen

Die Peakflächen der CZE-UV/Vis Elektropherogramme werden mit Hilfe der Karat 9.0 Software integriert, die Peakzeiten und Peakflächen als ASCII-Datei exportiert und mit Hilfe von intern geschriebenen und freundlicherweise von U. Münchberg (ISAS e.V.) bereitgestellten Skripten in R (The R Foundation for Statistical Computing, Version 3.5.3) weiterverarbeitet. Die Peakflächen werden in zeitkorrigierte Peakflächen umgerechnet und auf die zeitkorrigierte Peakfläche des internen Standards normiert (siehe Kapitel 2.1.2 *Elektrophorese*). Die erhaltenen zeitkorrigierten, relativen Peakflächen werden anschließend unter Verwendung der externen Kalibrierfunktionen (siehe Kapitel 3.2.4 *Linearität, Arbeitsbereich und Kalibrierung*) in Konzentrationswerte umgerechnet. Zusätzlich werden aus den mithilfe der Karat Software exportierten *Activity-Logs* die Messzeitpunkte der Einzelmessungen von zeitaufgelösten Enzym-Reaktionen extrahiert und den Einzelmessungen zugeordnet. Dadurch werden bei den zeitaufgelösten Messungen die Analyt Konzentrationen zu definierten Zeitpunkten (Beginn der Einzelmessung) erhalten. Die weitere Berechnung erfolgte ggf. in Excel (Version 2016) und die graphische Darstellung von Ergebnissen in Origin (Version 2018G).

7 Referenzen

1. Gomes, E. S., Schuch, V. & Lemos, E. G. de M. Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 1007–1034 (2013).
2. Arias, E. United States life tables, 2002. *Natl. Vital Stat. Rep.* 53, 1–38 (2004).
3. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P T J.* 40, 277–283 (2015).
4. Lee Ventola, C. The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. *P T* 40, 344–352 (2015).
5. Thanner, S., Drissner, D. & Walsh, F. Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio* 7, 1–7 (2016).
6. Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft & Bundesministerium für Bildung und Forschung. *Dart 2020.* 37 (2020).
7. World Health Organization (WHO). WHO Model List of Essential Medicines. http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_en.pdf (2013). Letzter Zugriff: 13.07.2020.
8. Plackett, B. Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature* 586, S50–S52 (2020).
9. Nature Biotechnology Editorial. Wanted: a reward for antibiotic development. *Nat. Biotechnol.* 36, 555–555 (2018).
10. Spellberg, B. & Gilbert, D. N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin. Infect. Dis.* 59, S71–S75 (2014).
11. Inoue, H. & Minghui, R. Antimicrobial resistance: translating political commitment into national action. *Bull. World Health Organ.* 95, 242–242 (2017).
12. Jin, S. & Sonenshein, A. L. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* 176, 4680–4690 (1994).
13. Federal Ministry of Health Federal Ministry of Food Agriculture Federal Ministry of Education and Research. *Avoiding Antibiotic Resistance DART 2020 Fourth interim report 2019.* (2019).
14. Office of The Assistant Secretary for Planning and Evaluation, U.S. Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture, U. S. D. of D. NATIONAL ACTION PLAN FOR COMBATING ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA. <https://aspe.hhs.gov/system/files/pdf/264126/CARB->

- National-Action-Plan-2020-2025.pdf (2020). Letzter Zugriff: 25.10.2022.
15. Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Bekanntmachung Förderrichtlinie zur 3. Auswahlrunde des Forschungspreises „Nächste Generation biotechnologischer Verfahren“. <https://www.bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-1091.html> (2015). Letzter Zugriff: 25.10.2022.
 16. Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI). Leibniz Research Cluster Bio/synthetische multifunktionale Mikroproduktionseinheiten – neuartige Wege der Wirkstoffentwicklung. <https://www.leibniz-research-cluster.de/de/leibniz-research-cluster.html>. Letzter Zugriff: 27.06.2020.
 17. Gomes, E. S., Schuch, V. & Lemos, E. G. de M. Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 1007–1034 (2013).
 18. Staunton, J. & Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* 18, 380–416 (2001).
 19. Nivina, A., Yuet, K. P., Hsu, J. & Khosla, C. Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. *Chem. Rev.* 119, 12524–12547 (2019).
 20. De Simone, A., Naldi, M., Bartolini, M., Davani, L. & Andrisano, V. Immobilized Enzyme Reactors: an Overview of Applications in Drug Discovery from 2008 to 2018. *Chromatographia* 82, 425–441 (2019).
 21. Zhu, Y., Chen, Q., Shao, L., Jia, Y. & Zhang, X. Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. *React. Chem. Eng.* 5, 9–32 (2020).
 22. Chen, H., Kim, H. U., Weng, H. & Browse, J. Malonyl-CoA Synthetase, Encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, Is Essential for Growth and Development of Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 2247–2262 (2011).
 23. Kim, Y. S. & Kang, S. W. Steady-state kinetics of malonyl-CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* and evidence for malonyl-AMP formation in the reaction. *Biochem. J.* 297, 327–333 (1994).
 24. Pohl, N. L. u. a. Remarkably Broad Substrate Tolerance of Malonyl-CoA Synthetase, an Enzyme Capable of Intracellular Synthesis of Polyketide Precursors. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5822–5823 (2001).

25. Cuthbert, K. D. & Dyck, J. R. B. Malonyl-CoA decarboxylase is a major regulator of myocardial fatty acid oxidation. *Curr. Hypertens. Rep.* 7, 407–411 (2005).
26. Beeckmans, S. Some structural and regulatory aspects of citrate synthase. *Int. J. Biochem.* 16, 341–351 (1984).
27. Novo, P. & Janasek, D. Current advances and challenges in microfluidic free-flow electrophoresis—A critical review. *Anal. Chim. Acta* 991, 9–29 (2017).
28. Jender, M. u. a. Multiplexed Online Monitoring of Microfluidic Free-Flow Electrophoresis via Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 92, 6764–6769 (2020).
29. Sigma-Aldrich Co. LLC. Product Information Coenzyme A Assay Kit (MAK034). https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak034?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_mak034_-_srpRecs3-1. Letzter Zugriff: 01.02.2021.
30. MyBioSource Inc. Product Information Mouse malonyl coenzyme A ELISA Kit (MBS705127). <https://www.mybiosource.com/malonyl-coa-mouse-elisa-kits/malonyl-coenzyme-a/705127>. Letzter Zugriff 01.02.2021.
31. Sigma-Aldrich Inc. Product Information Citrate Synthase Assay Kit (CS0720). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cs0720?lang=en®ion=US>. Letzter Zugriff 01.02.2021.
32. Sigma-Aldrich Co. LLC. Product Information Acetyl-Coenzyme A Assay Kit (MAK039). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak039bul.pdf>. Letzter Zugriff: 01.02.2021.
33. Sigma-Aldrich Co. LLC. Product Information Oxaloacetate Assay Kit (MAK070). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak070bul.pdf>. Letzter Zugriff: 01.02.2021.
34. Henk H. Lauer and Gerard P. Rozing. *High Performance Capillary Electrophoresis*. (Agilent Technologies, 2014).
35. Voeten, R. L. C., Ventouri, I. K., Haselberg, R. & Somsen, G. W. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. *Anal. Chem.* 90, 1464–1481 (2018).
36. Stolz, A. u. a. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications. *Electrophoresis* 40, 79–112 (2019).

37. Harstad, R. K., Johnson, A. C., Weisenberger, M. M. & Bowser, M. T. Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 88, 299–319 (2016).
38. Wätzig, H., Degenhardt, M. & Kunkel, A. Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. *Electrophoresis* 19, 2695–2752 (1998).
39. Volmer, D. *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung.* (Springer Spektrum, 2001).
40. Whatley, H. & Chapman, J. Technical Information T-1860A Precision in Capillary Electrophoresis.
[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Electroforesis/Electroforesis/CE/General/1860A\(T\).pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Electroforesis/Electroforesis/CE/General/1860A(T).pdf) (1998). Letzter Zugriff: 05.07.2020.
41. Beckmann Coulter. PA 800 plus Pharmaceutical Analysis System Methods Development Guide RUO-IDV-05-5330-A. 1–170 (2018).
42. Altria, K. D. Essential peak area normalisation for quantitative impurity content determination by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 35, 177–182 (1993).
43. Altria, K. D. Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards. *LC GC Eur.* 15, 588–594 (2002).
44. Altria, K. D. & Bestford, J. Main component assay of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: considerations regarding precision, accuracy, and linearity data. *J. Capillary Electrophor.* 3, 13–23 (1996).
45. Wielgos, T., Turner, P. & Havel, K. Validation of analytical capillary electrophoresis methods for use in a regulated environment. *J. Capillary Electrophor.* 4, 273–278 (1997).
46. Wätzig, H. & Dette, C. Precise quantitative capillary electrophoresis. Methodological and instrumental aspects. *J. Chromatogr. A* 636, 31–38 (1993).
47. Dose, E. V. & Guiochon, G. A. Internal Standardization Technique for Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 63, 1154–1158 (1991).
48. Petersen, N. J. & Hansen, S. H. Improving the reproducibility in capillary electrophoresis by incorporating current drift in mobility and peak area calculations. *Electrophoresis* 33, 1021–1031 (2012).

49. Nowak, P. M., Woźniakiewicz, M., Gładysz, M., Janus, M. & Kościelniak, P. Improving repeatability of capillary electrophoresis—a critical comparison of ten different capillary inner surfaces and three criteria of peak identification. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 4383–4393 (2017).
50. Sastre Toraño, J., Ramautar, R. & de Jong, G. Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *J. Chromatogr. B* 1118–1119, 116–136 (2019).
51. Hajba, L. & Guttman, A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *TrAC Trends Anal. Chem.* 90, 38–44 (2017).
52. de Jong, S. & Krylov, S. N. Pressure-Based Approach for the Analysis of Protein Adsorption in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 84, 453–458 (2012).
53. Lukacs, K. D. & Jorgenson, J. W. Capillary zone electrophoresis: Effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation. *J. High Resolut. Chromatogr.* 8, 407–411 (1985).
54. VanOrman, B. B., Liversidge, G. G., McIntire, G. L., Olefirowicz, T. M. & Ewing, A. G. Effects of buffer composition on electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *J. Microcolumn Sep.* 2, 176–180 (1990).
55. Gaš, B., Štědrý, M. & Kenndler, E. Peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 18, 2123–2133 (1997).
56. Ghosal, S. Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 214–228 (2004).
57. Houck, M. M. *Forensic Chemistry*. (Academic Press, 2015).
58. Glatz, Z. Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 841, 23–37 (2006).
59. Gattu, S. u. a. Advances in enzyme substrate analysis with capillary electrophoresis. *Methods* 146, 93–106 (2018).
60. Kappler, K. *Charakterisierung von Enzymreaktionen mittels Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie*. (Hochschule Rhein-Waal, 2018).
61. Soga, T. u. a. Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis–mass spectrometry using silanol mask technique. *J. Chromatogr. A* 1159, 125–133 (2007).
62. Soga, T. u. a. Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Multivalent Anions. *Anal. Chem.* 74, 6224–6229 (2002).

63. Geldart, S. E. & Brown, P. R. Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 828, 317–336 (1998).
64. Uhrová, M., Deyl, Z. & Suchánek, M. Separation of common nucleotides, mono-, di- and triphosphates, by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 681, 99–105 (1996).
65. Konermann, L. Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1827–1835 (2017).
66. Subirats, X., Bosch, E. & Rosés, M. Buffer considerations for LC and LC-MS. *Lc Gc North Am.* 27, 1000–1004 (2009).
67. Imre, S. u. a. With or Without Internal Standard in HPLC Bioanalysis. A Case Study. *J. Chromatogr. Sci.* 57, 243–248 (2019).
68. Altria, K. D. Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards. *LC GC Eur.* 15, 588–594 (2002).
69. Chao, B.-F., Chen, C.-J., Li, F.-A. & Her, G.-R. Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry using a pulsed electrospray ionization source. *Electrophoresis* 27, 2083–2090 (2006).
70. Yin, Y., Li, G., Guan, Y. & Huang, G. Sheathless interface to match flow rate of capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry using regular-sized capillary. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30, 68–72 (2016).
71. Höcker, O., Montealegre, C. & Neusüß, C. Characterization of a nanoflow sheath liquid interface and comparison to a sheath liquid and a sheathless porous-tip interface for CE-ESI-MS in positive and negative ionization. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 5265–5275 (2018).
72. Gebauer, P. & Boček, P. Predicting Peak Symmetry in Capillary Zone Electrophoresis: The Concept of the Peak Shape Diagram. *Anal. Chem.* 69, 1557–1563 (1997).
73. Gaš, B., Hruška, V., Dittmann, M., Bek, F. & Witt, K. Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 30, 1435–1445 (2007).
74. Hjertén, S. Zone broadening in electrophoresis with special reference to high-performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice. *Electrophoresis* 11, 665–690 (1990).

75. Hirokawa, T., Kabayashi, S. & Kiso, Y. Isotachophoretic determination of mobility and pka by means of computer simulation. *J. Chromatogr. A* 318, 195–210 (1985).
76. Sanichar, R. & Vederas, J. C. One-Step Transformation of Coenzyme A into Analogues by Transamidation. *Org. Lett.* 19, 1950–1953 (2017).
77. Buyske, D. A., Handschumacher, R. E., Schilling, E. D. & Strong, F. M. The Stability of Coenzyme A 1. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3575–3577 (1954).
78. Bioprozesstechnik. (Spektrum Akademischer Verlag, 2011). doi:10.1007/978-3-8274-2477-8.
79. Kim, H. J. & Winge, D. R. Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 627–636 (2013).
80. Edmondson, D. E. & Newton-Vinson, P. The Covalent FAD of Monoamine Oxidase: Structural and Functional Role and Mechanism of the Flavinylation Reaction. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 789–806 (2001).
81. Hanukoglu, I. Conservation of the Enzyme–Coenzyme Interfaces in FAD and NADP Binding Adrenodoxin Reductase—A Ubiquitous Enzyme. *J. Mol. Evol.* 85, 205–218 (2017).
82. Michaelis, L. & Menten, M. L. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitung* 49, 333–369 (1913).
83. Cornish-Bowden, A. One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspect. Sci.* 4, 3–9 (2015).
84. Ilko, D. & Holzgrabe, U. Influence of the capillary diameter on the separation efficiency and sensitivity: A systematic approach. *Electrophoresis* 33, 1494–1498 (2012).
85. Rasmussen, H. T. & McNair, H. M. Influence of buffer concentration, capillary internal diameter and forced convection on resolution in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 516, 223–231 (1990).
86. Verzola, B., Gelfi, C. & Righetti, P. G. Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 868, 85–99 (2000).
87. Graf, M., García, R. G. & Wätzig, H. Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries. *Electrophoresis* 26, 2409–2417 (2005).
88. Man, Y. u. a. Adsorptive BSA Coating Method for CE to Separate Basic Proteins. *Chromatographia* 76, 59–65 (2013).

89. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf (1995). Letzter Zugriff: 27.12.2020.
90. Food and Drug Administration (FDA). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf> (2015). Letzter Zugriff: 27.12.2020.
91. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29_Guideline.pdf (2005). Letzter Zugriff: 27.12.2020.
92. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens (ST/NAR/41). https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf (2009). Letzter Zugriff: 27.12.2020.
93. Deutsches Institut für Normung (DIN). DIN 32645:2008-11 Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. <https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/nmp/veroeffentlichungen/wdc-beuth:din21:110729574> (2008) doi:doi.org/10.31030/1465413. Letzter Zugriff: 27.12.2020.
94. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q 7 Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients (CPMP/ICH/4106/00). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-7-good-manufacturing-practice-active-pharmaceutical-ingredients-step-5_en.pdf (2000). Letzter Zugriff: 28.12.2020.
95. Wenz, C. u. a. Interlaboratory study to evaluate the robustness of capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide mapping. *J. Sep. Sci.* 38, 3262–3270 (2015).
96. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. <https://www.fda.gov/media/75643/download> (1994). Letzter Zugriff: 29.12.2020.

97. Thomas, B. R., Fang, X. G., Chen, X., Tyrrell, R. J. & Ghodbane, S. Validated micellar electrokinetic capillary chromatography method for quality control of the drug substances hydrochlorothiazide and chlorothiazide. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 657, 383–394 (1994).
98. Iqbal, J. Development of capillary electrophoresis-based assays for nucleoside and nucleotide metabolizing enzymes. (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2005).
99. Iqbal, J., Vollmayer, P., Braun, N., Zimmermann, H. & Müller, C. E. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Purinergic Signal.* 1, 349 (2005).
100. Funk, W., Dammann, V. & Donnevert, G. Phase I: Erstellung eines neuen Analysenverfahrens. in *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie* 9–55 (Wiley, 2005). doi:10.1002/9783527624508.ch2.
101. Dawson, R. M. C. *Data for Biochemical Research*. (Clarendon Press, 1989).
102. Oriental Yeast Co. LTD. Datasheet Coenzyme A (trilithium salt) from Yeast. <http://www.oycus.com/wp-content/uploads/2014/08/Co-A-Li.pdf>. Letzter Zugriff: 31.12.2020.
103. Oriental Yeast Co. LTD. Datasheet Coenzyme A (free acid) from Yeast. <http://www.oycus.com/wp-content/uploads/2014/08/Co-A.pdf>. Letzter Zugriff 31.12.2020.
104. Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. & Selvin, P. R. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Anal. Biochem.* 273, 73–80 (1999).
105. Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J. & Whitesides, G. M. Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* 56, 2648–2650 (1991).
106. Cline, D. J. u. a. New Water-Soluble Phosphines as Reductants of Peptide and Protein Disulfide Bonds: Reactivity and Membrane Permeability †. *Biochemistry* 43, 15195–15203 (2004).
107. De Spiegeleer, B. M. J., Sintobin, K. & Desmet, J. High performance liquid chromatography stability study of malonyl-coenzyme A, using statistical experimental designs. *Biomed. Chromatogr.* 3, 213–216 (1989).
108. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Product Information Acetyl Coenzyme A (C2:0) Lithium (A2181). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma->

- aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2181pis.pdf. Letzter Zugriff: 31.12.2020.
109. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Product Information Acetyl coenzyme A (C2:0) Sodium Salt (A2056). https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2056pis.pdf. Letzter Zugriff: 31.12.2020.
110. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Product Information Adenosine 5'-Triphosphate, ATP Disodium Salt (A6144). https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a6144pis.pdf. Letzter Zugriff: 31.12.2020.
111. HULETT, H. R. Non-enzymatic Hydrolysis of Adenosine Phosphates. *Nature* 225, 1248–1249 (1970).
112. Holbrook, K. A. & Ouellet, L. THE NON-ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ADENOSINE DIPHOSPHATE. *Can. J. Chem.* 35, 1496–1503 (1957).
113. Chen, C., Kramer, J. S., Brunst, S., Proschak, E. & Scriba, G. K. E. Capillary electrophoresis-based enzyme assays for β -lactamase enzymes. *Electrophoresis* 40, elps.201900104 (2019).
114. Glatz, Z., Bouchal, P., Janiczek, O., Mandl, M. & Česková, P. Determination of rhodanese enzyme activity by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 838, 139–148 (1999).
115. Wahl, C., Hirtz, D. & Elling, L. Multiplexed Capillary Electrophoresis as Analytical Tool for Fast Optimization of Multi-Enzyme Cascade Reactions - Synthesis of Nucleotide Sugars. *Biotechnol. J.* 11, 1298–1308 (2016).
116. Liu, X., Yang, J. & Yang, L. Capillary electrophoresis-integrated immobilized enzyme reactors. *Rev. Anal. Chem.* 35, 115–131 (2016).
117. Schmelz, S. & Naismith, J. H. Adenylate-forming enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 666–671 (2009).
118. Frieden, E. & Walter, C. Prevalence and Significance of the Product Inhibition of Enzymes. *Nature* 198, 834–837 (1963).
119. Yuwono, M. & Indrayanto, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* Bd. 32 243–259 (2005).
120. Wolfenden, R., Lewis, C. A. & Yuan, Y. Kinetic Challenges Facing Oxalate, Malonate, Acetoacetate, and Oxaloacetate Decarboxylases. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5683–5685 (2011).
121. Rej, R. Oxaloacetate: UV method. in *Methods of Enzymatic Analysis* 59–67 (1985).

122. KATANO, H., WATANABE, H., TAKAKUWA, M., MARUYAMA, C. & HAMANO, Y. Colorimetric Determination of Pyrophosphate Anion and Its Application to Adenylation Enzyme Assay. *Anal. Sci.* 29, 1095–1098 (2013).
123. McQuade, T. J. u. a. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis. *Anal. Biochem.* 386, 244–250 (2009).
124. Putnins, R. F. & Yamada, E. W. Colorimetric determination of inorganic pyrophosphate by a manual or automated method. *Anal. Biochem.* 68, 185–195 (1975).
125. Williamson, J. R. & Corkey, B. E. [65] Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. in *Methods in Enzymology Bd. 13* 434–513 (1969).
126. Srere, P. A. [1] Citrate synthase. in *Methods in Enzymology Bd. 13* 3–11 (1969).
127. Else, A. J., Barnes, S. J., Danson, M. J. & Weitzman, P. D. J. A new spectrophotometric assay for citrate synthase and its use to assess the inhibitory effects of palmitoyl thioesters. *Biochem. J.* 251, 803–807 (1988).
128. Lo, M.-C. u. a. A highly sensitive high-throughput luminescence assay for malonyl-CoA decarboxylase. *Anal. Biochem.* 376, 122–130 (2008).
129. Kroeger, J. K., Zarzycki, J. & Fuchs, G. A spectrophotometric assay for measuring acetyl-coenzyme A carboxylase. *Anal. Biochem.* 411, 100–105 (2011).
130. Cao, E., Chen, Y., Cui, Z. & Foster, P. R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 684–690 (2003).
131. Gilliland, S. E. & Lara, R. C. Influence of Storage at Freezing and Subsequent Refrigeration Temperatures on β -Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*[†]. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 898–902 (1988).
132. Pearce, R. E. u. a. Effects of Freezing, Thawing, and Storing Human Liver Microsomes on Cytochrome P450 Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 331, 145–169 (1996).
133. Storey, K. B. & Storey, J. M. Biochemistry of Cryoprotectants. in *Insects at Low Temperature* 64–93 (Springer US, 1991). doi:10.1007/978-1-4757-0190-6_4.
134. Goldfarb, A. R., Saidel, L. J. & Mosovich, E. The ultraviolet absorption spectra of proteins. *J. Biol.*

- Chem. 193, 397–404 (1951).
135. Garamella, J., Marshall, R., Rustad, M. & Noireaux, V. The All E. coli TX-TL Toolbox 2.0: A Platform for Cell-Free Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* 5, 344–355 (2016).
 136. Yang, T.-T. u. a. Improved Fluorescence and Dual Color Detection with Enhanced Blue and Green Variants of the Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* 273, 8212–8216 (1998).
 137. Basso, A. & Serban, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol. Catal.* 479, 110607 (2019).
 138. Truppo, M. D. & Hughes, G. Development of an improved immobilized CAL-B for the enzymatic resolution of a key intermediate to odanacatib. *Org. Process Res. Dev.* 15, 1033–1035 (2011).
 139. Gaboardi, M., Pallanza, G., Baratella, M., Castaldi, G. & Castaldi, M. Process for the preparation of sofosbuvir. (2018).
 140. Basso, A., Neto, W., Serban, S. & Summers, B. D. How to optimise the immobilization of amino transaminases on synthetic enzyme carriers, to achieve up to a 13-fold increase in performances. *Chim. OGGI-CHEMISTRY TODAY* 36, 40–42 (2018).
 141. Bruggink, A., Roos, E. C. & de Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Org. Process Res. Dev.* 2, 128–133 (1998).
 142. Thermo Fisher Scientific Inc. Product Information HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads (88831). https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011794_HisPur_NiNTA_Mag_Bead_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIUhpc1B1ciBOaS1OVEEgTWFnbnmV0aWMgQmVhZHM. Letzter Zugriff: 01.02.2021.
 143. Bornhorst, J. A. & Falke, J. J. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. in *Methods Enzymol Bd.* 2000 245–254 (2000).
 144. Mei, G., Di Venere, A., Rosato, N. & Finazzi-Agrò, A. The importance of being dimeric. *FEBS J.* 272, 16–27 (2004).
 145. Bisswanger, H. Enzyme assays. *Perspect. Sci.* 1, 41–55 (2014).
 146. Taura, F. u. a. A Novel Class of Plant Type III Polyketide Synthase Involved in Orsellinic Acid Biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front. Plant Sci.* 7, 1–15 (2016).
 147. Wang, Y. & Pfeifer, B. A. 6-Deoxyerythronolide B production through chromosomal localization

- of the deoxyerythronolide B synthase genes in *E. coli*. *Metab. Eng.* 10, 33–38 (2008).
148. Pilotelle-Bunner, A., Cornelius, F., Sebban, P., Kuchel, P. W. & Clarke, R. J. Mechanism of Mg²⁺ Binding in the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophys. J.* 96, 3753–3761 (2009).
 149. Smith, C. M. & Williamson, J. R. Inhibition of citrate synthase by succinyl-CoA and other metabolites. *FEBS Lett.* 18, 35–38 (1971).
 150. Mahlean, A. Purification and Some Properties of Citrate Synthase from *Penicillium spiculisporum*. *Eur. J. Biochem.* 29, 60–66 (1972).
 151. Cao, H. u. a. Enzymatic Production of Glutathione Coupling with an ATP Regeneration System Based on Polyphosphate Kinase. *Appl Biochem Biotechnol* 185, 385–395 (2018).
 152. Heida, T., Köhler, T., Kaufmann, A., Männel, M. J. & Thiele, J. Cell-Free Protein Synthesis in Bifunctional Hyaluronan Microgels: A Strategy for In Situ Immobilization and Purification of His-Tagged Proteins. *ChemSystemsChem* 2, 1–7 (2020).
 153. Shi, T., Han, P., You, C. & Zhang, Y. H. P. J. An in vitro synthetic biology platform for emerging industrial biomanufacturing: Bottom-up pathway design. *Synth. Syst. Biotechnol.* 3, 186–195 (2018).
 154. Wang, X. u. a. Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem* 2, 621–654 (2017).
 155. Opgenorth, P. H., Korman, T. P. & Bowie, J. U. A synthetic biochemistry molecular purge valve module that maintains redox balance. *Nat. Commun.* 5, 4113 (2014).
 156. Honda, K. u. a. In vitro metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD. *Metab. Eng.* 35, 114–120 (2016).
 157. Korman, T. P., Hill, J. A., Vu, T. N. & Tsai, S.-C. Structural Analysis of Actinorhodin Polyketide Ketoreductase: Cofactor Binding and Substrate Specificity ‡. *Biochemistry* 43, 14529–14538 (2004).
 158. Xie, X., Garg, A., Keatinge-Clay, A. T., Khosla, C. & Cane, D. E. Epimerase and Reductase Activities of Polyketide Synthase Ketoreductase Domains Utilize the Same Conserved Tyrosine and Serine Residues. *Biochemistry* 55, 1179–1186 (2016).

8 Anhang

Einzelstandards - UV/Vis Spektren der Analyten

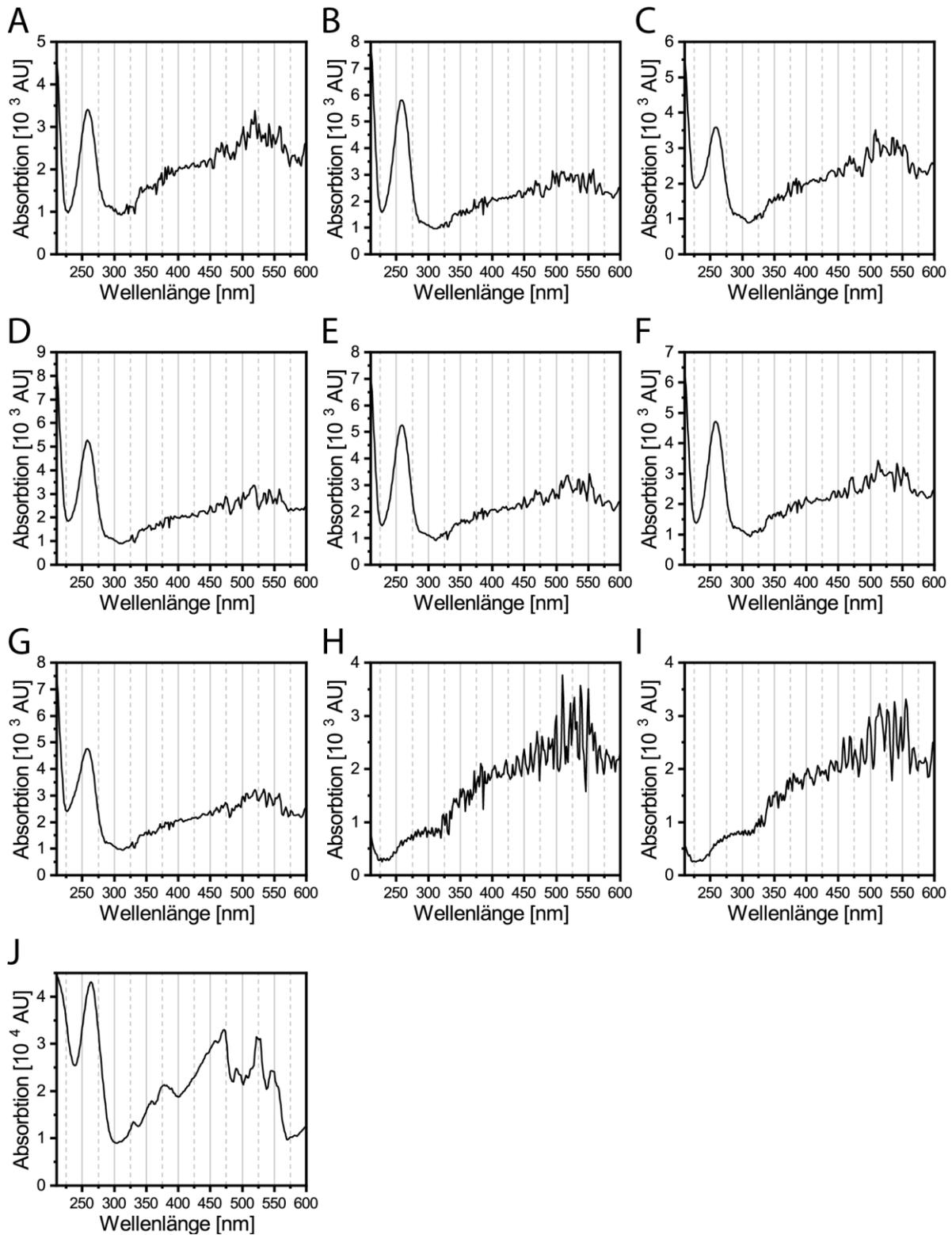


Abbildung 46: UV/Vis-Spektren der Analyten. Darstellung der UV/Vis Spektren von cAMP (A), AMP (B), AcCoA (C), CoA (D), ADP (E), ATP (F), MalCoA (G), Pufferpeak/TRIS (H), Hintergrundrauschen (I) und FAD (J).

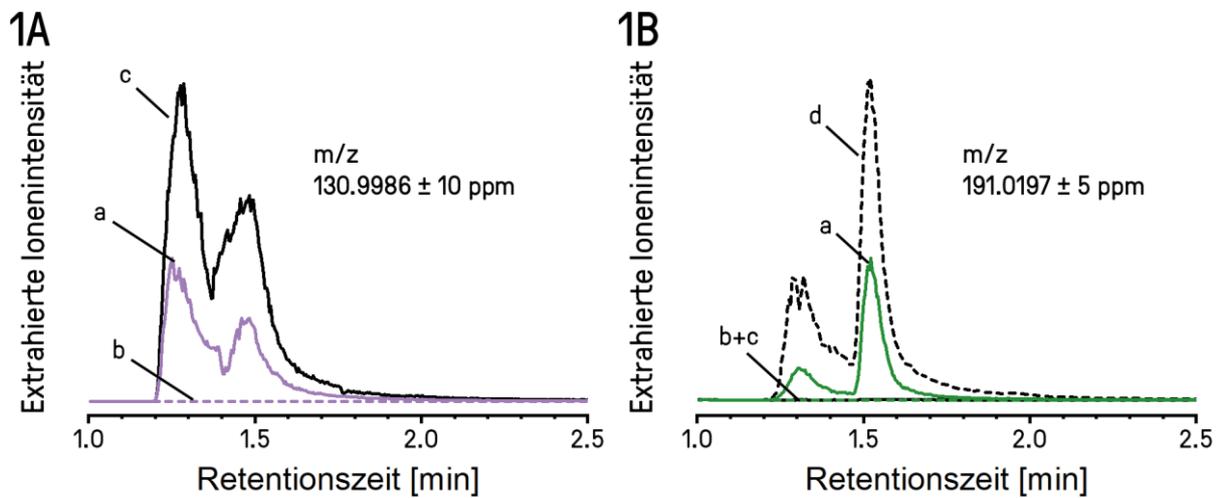
Massenspektrometrische Untersuchungen zur Stabilität von Oxallessigsäure

Abbildung 47: Massenspektrometrische Untersuchungen zur Stabilität von Oxallessigsäure. HPLC-HRMS Analysen von Oxallessigsäure (1A) und Citrat (1B) für die Reaktion von MatB/MatA/CitZ (siehe Kapitel 6.9.2) mit den Cofaktor CoA im standardmäßigen Reaktions-Mix (siehe Kapitel 6.9.3). Messungen in der Gegenwart (a) und in der Abwesenheit (b) von Oxallessigsäure sind als durchgezogene und gestrichelte Linien dargestellt. Referenzmessungen ohne Enzyme oder Inkubation (c) sind als schwarze Linie dargestellt. Für Citrat wurde eine zusätzliche Referenz mit einer 6 mM Citrat Zugabe (d) gemessen und ist als gestrichelte schwarze Linie dargestellt. Die Daten wurden freundlicherweise im Rahmen des Leibniz-Research-Clusters (LRC) Projekts von Dr. Julia Rautschek vom Leibniz-Institut für Naturstoff Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI) (Jena, Deutschland) bereitgestellt.

Ergänzende Daten zur Bestimmung der Präzision bei der Kalibrierung

Tabelle 40: Ergänzende Daten zur Bestimmung der Präzision bei der Kalibrierung. Bestimmung normierten und zeitkorrigierten Peakflächen der Replikate 1-5, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung und Mittelwert der relativen Standardabweichung zu den jeweiligen Konzentrationen der Analyten bei der Kalibrierung (siehe Kapitel 3.2.4 *Linearität, Arbeitsbereich und Kalibrierung*).

Analyt	Konzentration [mmol/L]	Normierte und Zeitkorrigierte Peakfläche					Mittelwert	Standardabweichung	Relative Standardabweichung [%]	Mittelwert Relative Standardabweichung [%]
		Replikate 1-5								
AMP	0,005	0,01037	0,01018	0,00897	0,00980	0,01207	0,01028	0,00114	11,05	1,71
	0,010	0,01954	0,02034	0,02013	0,01991	0,02076	0,02014	0,00046	2,28	
	0,025	0,04644	0,04424	0,04720	0,04664	0,04684	0,04627	0,00117	2,53	
	0,050	0,09477	0,09608	0,09553	0,09597	0,09500	0,09547	0,00058	0,60	
	0,075	0,14332	0,14410	0,14052	0,13916	0,14151	0,14172	0,00202	1,42	
	0,100	0,19120	0,19495	0,19180	0,19398	0,19173	0,19273	0,00164	0,85	
	0,250	0,49114	0,49014	0,49181	0,49158	0,48602	0,49014	0,00239	0,49	
	0,500	0,96911	0,97054	0,97048	0,97622	0,97308	0,97188	0,00281	0,29	
	0,750	1,44802	1,44331	1,44573	1,44574	1,44191	1,44494	0,00238	0,16	
	1,000	1,87914	1,88413	1,87694	1,89523	1,88489	1,88407	0,00708	0,38	
AcCoA	0,005	0,01126	0,01293	0,01010	0,01103	0,00960	0,01098	0,00128	11,67	2,31
	0,010	0,02390	0,02255	0,02348	0,02235	0,02093	0,02264	0,00115	5,09	
	0,025	0,05306	0,05324	0,05297	0,05095	0,05443	0,05293	0,00125	2,37	
	0,050	0,11014	0,11222	0,11155	0,10654	0,10574	0,10924	0,00294	2,69	
	0,075	0,16297	0,16305	0,16123	0,15982	0,15937	0,16129	0,00171	1,06	
	0,100	0,22672	0,22770	0,22022	0,22516	0,22193	0,22435	0,00318	1,42	
	0,250	0,56832	0,56255	0,56466	0,56961	0,55540	0,56411	0,00562	1,00	
	0,500	1,11953	1,10894	1,10879	1,11407	1,10504	1,11127	0,00562	0,51	
	0,750	1,66715	1,65581	1,65286	1,65474	1,64301	1,65471	0,00860	0,52	
	1,000	2,17746	2,17880	2,15753	2,17939	2,16607	2,17185	0,00968	0,45	
CoA	0,005	0,01217	0,01183	0,01136	0,01307	0,01443	0,01257	0,00121	9,65	2,01
	0,010	0,02318	0,02402	0,02472	0,02469	0,02443	0,02421	0,00064	2,63	
	0,025	0,05725	0,05812	0,06031	0,06244	0,06075	0,05977	0,00209	3,50	
	0,050	0,12003	0,11899	0,12183	0,12504	0,12546	0,12227	0,00291	2,38	
	0,075	0,17780	0,17585	0,17953	0,17698	0,17920	0,17787	0,00153	0,86	
	0,100	0,23789	0,24264	0,23824	0,24529	0,24231	0,24127	0,00315	1,31	
	0,250	0,58266	0,58295	0,58742	0,59430	0,59240	0,58795	0,00532	0,91	
	0,500	1,11480	1,10808	1,10781	1,12376	1,12155	1,11520	0,00740	0,66	
	0,750	1,63740	1,63837	1,64919	1,66681	1,64486	1,64733	0,01192	0,72	
	1,000	2,10547	2,11371	2,12618	2,12204	2,12760	2,11900	0,00930	0,44	
ATP	0,005	0,00954	0,00955	0,00658	0,00988	0,00917	0,00895	0,00135	15,06	2,98
	0,010	0,01604	0,02022	0,01723	0,01993	0,01799	0,01828	0,00178	9,74	
	0,025	0,04231	0,04319	0,04334	0,04571	0,04614	0,04414	0,00169	3,82	
	0,050	0,08558	0,08862	0,08874	0,08760	0,08598	0,08730	0,00147	1,68	
	0,075	0,12754	0,12726	0,12953	0,12536	0,12695	0,12733	0,00149	1,17	
	0,100	0,17438	0,17947	0,17430	0,18113	0,17754	0,17737	0,00304	1,71	
	0,250	0,45204	0,45050	0,45569	0,45789	0,45011	0,45325	0,00341	0,75	
	0,500	0,90280	0,90397	0,90188	0,90923	0,91096	0,90577	0,00407	0,45	
	0,750	1,34695	1,34519	1,35010	1,35098	1,35066	1,34877	0,00257	0,19	
	1,000	1,76799	1,77151	1,76195	1,78277	1,77383	1,77161	0,00768	0,43	
1,250	2,27821	2,26102	2,28227	2,27556	2,28013	2,27544	0,00843	0,37		
1,500	2,92564	2,94738	2,94874	2,94908	2,94028	2,90542	0,00994	0,34		

Analyt	Konzentration [mmol/L]	Normierte und Zeitkorrigierte Peakfläche Replikat 1-5					Mittelwert	Standardabweichung	Relative Standardabweichung [%]	Mittelwert Relative Standardabweichung [%]
MalCoA	0,005	0,01238	0,01043	0,01188	0,01032	0,01180	0,01136	0,00093	8,16	1,81
	0,010	0,02339	0,02345	0,02148	0,02317	0,02484	0,02327	0,00120	5,14	
	0,025	0,05421	0,05455	0,05569	0,05687	0,05414	0,05509	0,00117	2,12	
	0,050	0,11269	0,11184	0,11326	0,11477	0,11511	0,11353	0,00139	1,22	
	0,075	0,16716	0,16827	0,16568	0,16397	0,16507	0,16603	0,00170	1,02	
	0,100	0,23105	0,23638	0,23016	0,23334	0,22959	0,23210	0,00279	1,20	
	0,250	0,58309	0,57575	0,58070	0,58371	0,57285	0,57922	0,00474	0,82	
	0,500	1,15170	1,14733	1,13891	1,15069	1,14935	1,14760	0,00513	0,45	
	0,750	1,71543	1,70743	1,70734	1,70801	1,69826	1,70730	0,00609	0,36	
	1,000	2,28157	2,27556	2,26071	2,27984	2,26368	2,27227	0,00951	0,42	
1,250	2,93041	2,89758	2,93731	2,90801	2,91189	2,91704	0,01640	0,56		
1,500	3,15747	3,16826	3,17249	3,18427	3,17737	3,40090	0,01006	0,30		

Ergänzende Daten zur Bestimmung des Detektionslimits

Tabelle 41: Ausreißertest und F-Test nach MANDEL. Zusammenstellung der Daten zum Ausreißertest (F-Test) und Signifikanztest (Anpassungstest) nach MANDEL. Es wurden keine Ausreißer gefunden. Für CoA wurde ein quadratisches Modell, für die Analyten AMP, ATP, AcCoA und MalCoA hingegen ein lineares Modell als optimal bestimmt. Für die Vergleichbarkeit der Daten zu den anderen Analyten wurde auch bei CoA ein lineares Modell genutzt zumal die Bestimmtheitsmaße aus Kapitel 3.2.5 *Detektionslimit* eine hohe Anpassungsgüte bei der linearen Regression aufzeigen. Bei genauerer Betrachtung der Daten lassen sich keine signifikanten Gründe gegen eine Verwendung eines linearen Modells finden. Die Bestimmung eines optimalen quadratischen Regressionsmodells scheint hier zufallsbedingt und der Art der statistischen Auswertung geschuldet zu sein. Entsprechend wurde auf Basis der Daten entschieden für alle Analyten eine lineare Regression durchzuführen. Bei der Verwendung eines linearen Modells ist allerdings mit einer marginal höheren Fehlerbehaftung der bestimmten Nachweis, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von CoA auszugehen. Die Daten dienen zur Ergänzung der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.5 *Detektionslimit*)

Lineare Regression	AMP	ATP	CoA	AcCoA	MalCoA
Steigung	0,002±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000
Achsenabschnitt	0,000±0,000	-0,001±0,000	-0,002±0,001	-0,002±0,000	-0,001±0,000
Korrelationskoeffizient R	0,9993	0,9997	0,9989	0,9996	0,9996
x-Mittelwert	16,500	16,500	16,500	16,500	16,500
Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert	742,500	742,500	742,500	742,500	742,500
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 95%)	Nein PW=4,86 KW=5,59	Nein PW=4,31 KW=5,59	Nein PW=3,89 KW=5,59	Nein PW=2,72 KW=5,59	Nein PW=2,20 KW=5,59
Reststandardabweichung S_y	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,363	0,244	0,444	0,264	0,277
Vertrauensbereich von Steigung a	0,002-0,002	0,002-0,002	0,002-0,003	0,002-0,002	0,002-0,002
Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b	-0,002- 0,001	-0,002-0,000	-0,004-0,000	-0,003-(-0,001)	-0,002-0,000

Quadratische Regression	AMP	ATP	CoA	AcCoA	MalCoA
Koeffizient A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Koeffizient B	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Koeffizient C	0,001	0,000	0,001	-0,001	0,000
Korrelationskoeffizient R	0,9998	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997
Reststandardabweichung S_y	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,216	0,247	0,243	0,260	0,242

F-Test nach Mandel	AMP	ATP	CoA	AcCoA	MalCoA
Optimales Regressionsmodell	Linear PW=9,93 KW=5,59	Linear PW=0,53 KW= 5,59	Quadratisch PW=15,4 KW=5,59	Linear PW=1,00 KW=5,59	Linear PW=2,63 KW=5,59

Ergänzende Daten zur Reaktion von CitZ

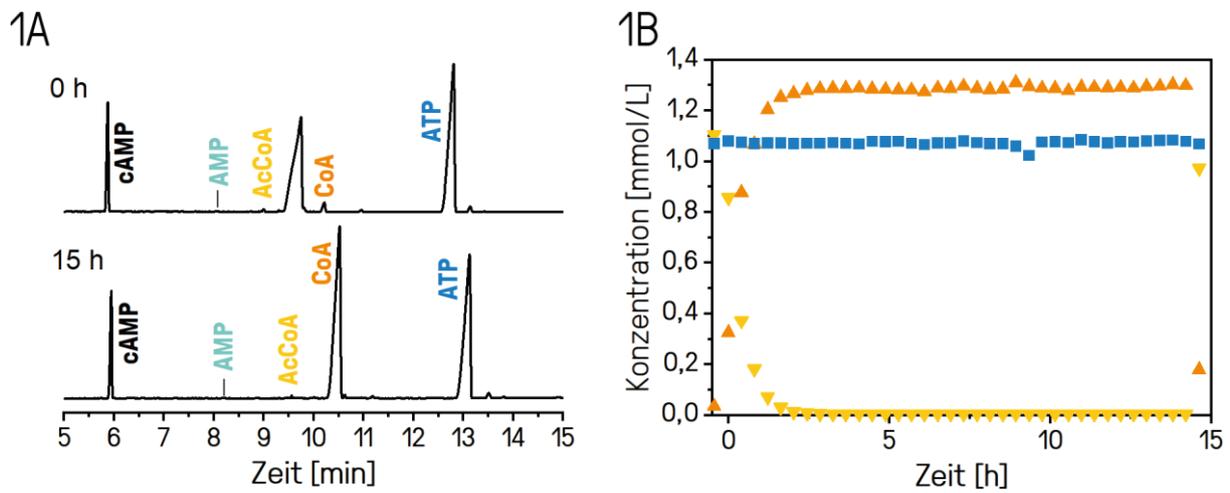


Abbildung 49: Ergänzende Daten zur Reaktion von CitZ. Darstellung der Elektropherogramme zu den Zeitpunkten 0 h und 15 h (1A) zur zeitaufgelösten Enzym-Reaktion (siehe Kapitel 6.9.5) von CitZ (1B) im standardmäßigen Reaktions-Mix mit frisch angesetzter OxAc. Die zeitaufgelöste Enzym-Reaktion erfolgte als Singlikat. Legende: ATP (■), CoA (▲) und AcCoA (▼). Die Daten dienen zur Ergänzung der Reaktionen von CitZ (siehe Kapitel 3.4.3 *Reaktion von CitZ*) und der Diskussion der Reaktionen von MatB/MatA/CitZ (siehe Kapitel 3.4.4 *Reaktion von MatB/MatA/CitZ*).