

**Einsatz kapillarelektrophoretischer Methoden
für die Analytik von pharmazeutisch
interessanten Substanzen in
der biotechnologischen Produktion**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl. – Chem. Simona Frerichs, geb. Becker
geboren am 08.08.1973 in Langenfeld

Hannover, im Juni 2002

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Schügerl
Tag der Promotion: 10.06.2002

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuelle zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im Juni 2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis April 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich besonders für die interessante Aufgabenstellung, die guten Arbeitsbedingungen sowie den großen Forschungsfreiraum danken.

Prof. Dr. Dr. h. c. Schügerl danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie in Hannover danke ich für eine immer angenehme Atmosphäre, angeregte Diskussionen und die stets gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt

- Dr. Klaus Joeris für seine immer neuen und interessanten Ideen, seinen Spaß am Basteln (wie bekommen wir das Kohlendioxid aus dem Puffer) sowie die durch ihn erst mögliche Analytik von Aminosäuren in realem Medium und die Analytik von Immunkomplexen.
- Martina Weiß für die Erlaubnis, die oft einzige funktionierende pH-Elektrode in ihrem Labor mitnutzen zu dürfen, obwohl sie danach nicht immer die alte war.
- Torsten Weiß für die ersten Einweisungen in die Geheimnisse der Kapillarelektrophorese und der Kapillarbehandlung. Ohne ihn stände ich wahrscheinlich immer noch fragend vor den Geräten.
- Ralf Finke für die zur Verfügung gestellten Proben.
- Georg Renemann für seine tPA-Standard- und Realproben.
- Dirk Kosemund für seine ständige Bereitschaft, mir Auskunft über Derivatisierungsmethoden zu geben und für die Hydrolyseproben des Kartoffelproteins.
- Kerstin Plate für das Korrekturlesen und ihre kreativen Vorschläge zur Verbesserung.
- Der Firma BioVisioN für die Bereitstellung der Endostatinstandardproben.
- Der Bayer Corp., Berkeley, USA für bereitgestellte Proben und Chemikalien.

Ganz besonderen Dank auch an Jan-Gerd Frerichs, der mich während dieser Dissertation immer wieder motiviert hat und ohne den diese Arbeit wahrscheinlich immer noch nicht fertig wäre.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Einsatz kapillarelektrophoretischer Methoden für die Analytik von pharmazeutisch interessanten Substanzen der biotechnologischen Produktion

In der Biotechnologie werden verschiedenste analytische Methoden eingesetzt. In dieser Arbeit werden einige kapillarelektrophoretische Methoden entwickelt, welche die herkömmlichen bioanalytischen Verfahren ergänzen oder ersetzen können.

Zunächst wird eine Aminosäureanalytik entwickelt, die ohne vorherige Derivatisierung der einzelnen Aminosäuren auskommt und bei der die Analyten mit indirekter UV-Detektion erfasst werden. Es können 18 der 20 genetisch codierten Aminosäuren erfasst werden. Diese Analytik wird bei einem zell- und proteinfreien Medium eingesetzt und 14 Aminosäuren werden klar nachgewiesen.

Unter Einsatz unterschiedlicher Kapillaren und Puffern wird die Trennleistung der Kapillarelektrophorese und der Kapillargelelektrophorese bei verschiedenen Gemischen aus Peptiden, Peptiden und Proteinen und beim enzymatischen Abbau eines Proteins untersucht. Dabei ergibt sich, dass die Peptidgemische problemlos in kurzer Zeit mit der „fused silica“ Kapillare getrennt werden können, während für die Trennung des Protein-Peptid Gemischs eine neutrale Beschichtung der Kapillare nötig wird. Bei der Untersuchung des enzymatischen Abbaus eines Kartoffelproteins wird deutlich, dass die Kapillare hier alleinige Analysemethode nicht ausreicht, da zu viele Abbauprodukte entstehen, sondern dass eine Kombination verschiedener Analysemethoden sinnvoll wäre.

Die Produktkontrolle für ein am Institut hergestelltes tPA findet bisher über den ELISA-Test statt. Da dieser sehr zeitaufwendig ist, wird eine weitaus schnellere, automatisierbare Analytik mit der Kapillarelektrophorese aufgebaut. Es gelingen Kalibrationen mit Standards sowohl in wässriger Lösung als auch im Kultivierungsmedium mit Regressionskoeffizienten nahe 1, so dass die entwickelte Methode auf Realproben in Kultivierungsmedium übertragen und mit den Ergebnissen des ELISA-Tests verglichen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wird weiterhin eine Endostatinanalytik zur Produktkontrolle im Vergleich zu SDS-PAGE-Gelen entwickelt und mit Realproben getestet.

Bei der Entwicklung eines Immunoassays ist es möglich, mit Hilfe von laserinduzierter Fluoreszenz sowohl den Antikörper als auch den gebildeten Immunkomplex in weniger als 6 Minuten zu detektieren. Hier wird zusätzlich zur Komplexbildung nach der Inkubation im Eppendorfgefäß untersucht, wie sich Antikörper und Immunkomplex bei der Reaktion in der Kapillare bei verschiedenen Stopped Flow Zeiten verhalten. Mit einem kommerziell erhältlichen Modellsystem von Sigma wird ein Assay entwickelt, der auf ein Glykoprotein der Firma Bayer Corp., Berkeley, USA übertragen wird. Dieses Glykoprotein ist dem Modellsystem strukturell ähnlich, aber nicht mit diesem identisch.

Schlagworte: Kapillarelektrophorese, Aminosäuren, Immunoassay

Abstract

Application of capillary electrophoresis methods for analysis of pharmaceutically interesting substances in biotechnological production

In biotechnology various methods are used for analytical purposes. In this work, capillary electrophoresis (CE) is used for the development of new methods to supplement or substitute methods already known.

First, an analysis for amino acids is developed that can be carried out without prior derivatization of the single amino acids and that registers the analytes by indirect UV detection. By using this method 18-20 genetically encoded amino acids can be determined. The method is applied to cell and serum free medium. 14 amino acids can be determined.

By using different capillaries and buffers the separation power of capillary electrophoresis and capillary gel electrophoresis with different mixtures of peptides, peptides and proteins as well as the enzymatic reduction of a protein are examined. As a result, the peptide mixture could be separated with a fused silica capillary within short time without any problem. For separation of the protein-peptide mixture a neutral coverage of the capillary is necessary. Examination of the enzymatic reduction of potato protein leads to the result that more information is necessary due to the fact that too many degradation products could be detected that require a combination of different analytics.

For product control of a tPA produced at the Institut für Technische Chemie most commonly the ELISA test is used. Because this is very time consuming a much faster method using CE is shown. Additionally, this method can also be used for automatic analysis. Calibrations with liquid solutions and real cultivation media using standards showed very good regression coefficients. The method is applied to samples in cultivation medium and is compared to results with the ELISA test.

Further on, this work shows the development of an analysis for endostatine for product control in comparison to SDS-PAGE gels. The new method is tested with real samples. By using laser induced fluorescence for the development of immunoassays it is possible to detect the antibody as well as the immuno complex in less than 6 minutes. In addition to the formation of the complex after incubation in an Eppendorf vial this work examines how the antibody and immuno complex behave during reaction in the capillary at different stopped flow times. The results obtained are transferred to a glycoprotein produced by Bayer Corp.

Keywords: Capillary electrophoresis, amino acids, immunoassay

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Prinzip und Aufbau der Kapillarelektrophorese	3
2.1	Experimenteller Aufbau eines Kapillarelektrophoresesystems	3
2.2	Probeninjektion	4
2.3	Detektion	5
3	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	6
3.1	Elektrophoretische Beweglichkeit	6
3.2	Elektroosmotische Beweglichkeit	6
3.3	Bandenverbreiterung	8
4	Methoden der Kapillarelektrophorese	10
4.1	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	10
4.2	Kapillargelelektrophorese (CGE)	10
4.3	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)	11
4.4	Kapillarelektrochromatographie (CEC)	11
4.5	Kapillarisoelektrische Fokussierung (cIEF)	11
4.6	Affinitätskapillarelektrophorese (ACE)	12
5	Kapillarelektrophoretische Immunoassays	13
5.1	Der nicht kompetitive CEIA	14
5.2	Der kompetitive CEIA	15
5.3	On-line Immunoassay	16
6	Entwicklung einer Analytik für nicht-derivatisierte Aminosäuren	18
6.1	Einleitung	18
6.2	Trennung eines Aminosäurestandards	19
6.2.1	Veränderung der Pufferzusammensetzung	19
6.2.2	Optimierung der Trennbedingungen	19
6.2.3	Zuordnung der Peaks	22
6.2.4	Untersuchung von Medium	25
7	Peptid- und Proteinanalytik	28
7.1	Allgemeines	28
7.2	Trennung von vier in der Zusammensetzung sehr ähnlichen Peptiden	29
7.3	Kalibration eines Peptids über die Peakfläche	32
7.4	Verkürzung der Analysenzeiten	33
7.5	Trennung eines Gemisches aus Peptiden und Proteinen	34
7.6	Kapillarelektrophoretische Beobachtung des enzymatischen Abbaus von Kartoffelprotein	36
8	Analytik für den Gewebeplasminogen-Aktivator (tPA)	39
8.1	Grundlagen zum Gewebeplasminogen-Aktivator	39
8.2	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen des Gewebeplasminogen-Aktivators	41
8.2.1	Untersuchungen von tPA-Standards in wässrigem Medium	41

8.2.2	Untersuchung von tPA-Standards in Kultivierungsmedium	43
8.2.3	Vergleich der ermittelten Kapillarelektrophoresedaten mit den Daten der Referenzmethode ELISA	44
9	Entwicklung einer Endostatinanalytik	47
9.1	Endostatin	47
9.2	Analytik des Endostatins	49
9.2.1	SDS-PAGE-Gel	49
9.2.2	Kapillarelektrophoretische Analytik des Endostatin	50
9.3	Analytik der Realproben	52
10	Entwicklung eines Immunoassays	54
10.1	Therapeutische Anwendung des Glykoproteins	54
10.2	Analytik für den Immunkomplex aus Glykoprotein und seinem Antikörper	54
10.3	Übertragung des Immunoassays auf Fermentationsproben	59
11	Zusammenfassung und Ausblick	63
12	Anhang	71
12.1	Abkürzungsverzeichnis	71
12.2	Material und Methoden	73
12.2.1	Kapillarelektrophorese Beckman-Coulter P/ACE MDQ	73
12.2.2	Cary 50 Photometer der Firma Varian	75
12.2.3	Durchführung des ELISA (Testkit Imulyse™ tPA)	75
12.2.4	Durchführung des Fluorotag FITC Konjugationsset	77
12.3	Chemikalien und Puffer	79
13	Literaturverzeichnis	80

1 Einleitung und Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten hat die Herstellung biotechnologischer Produkte mit Hilfe gentechnisch veränderte Organismen stark zugenommen. Aus diesem Grunde wird die Bedeutung der Produktkontrolle und der Prozessbegleitung und –überprüfung immer wichtiger. Die Prozesskontrolle sollte dabei automatisch ablaufen und kann mit Analysegeräten wie HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) oder MS (Massenspektrometrie) durchgeführt werden. Auch die Kapillarelektrophorese mit ihren verschiedenen Funktionsmöglichkeiten, wie z.B. Kapillaronenelektrophorese und Kapillargelelektrophorese, spielt eine immer größere Rolle aufgrund ihrer Automatisierbarkeit gegenüber herkömmlichen zweidimensionalen Gelen, besser reproduzierbarer Ergebnisse und ihrer meist schnelleren Analysenzeiten. Inzwischen sind auch sehr viele variabel einsetzbare Kapillaren kommerziell erhältlich.

Die Kapillarelektrophorese wird in verschiedensten Bereichen der Biotechnologie genutzt, wie beispielsweise in der Analytik rekombinanter DNA-Moleküle [27] und beim Einsatz zur Kontrolle von verschiedenen Produkten aus Bakterien und Zellen [9].

Auch besteht die Möglichkeit, die Kapillarelektrophorese mit anderen Analysemethoden, wie z.B. HPLC, zu koppeln. Da die Organismen, in denen die Wirkstoffe produziert werden, von *Escherichia coli* oder anderen Bakterien bis hin zu Säugetierzellen reichen, wächst die Komplexität der Produkte, da in einer Fermentation mehrere glykosilierte Formen eines Proteins auftreten können, die unterschiedliche therapeutische Wirkungen haben. Hier werden besondere Anforderungen an die Analytik gestellt, die verschiedenen Glykolisierungsmuster zu erfassen [58].

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere Möglichkeiten zum analytischen Einsatz der Kapillarelektrophorese in der Biotechnologie untersucht. Es wird eine Aminosäureanalytik untersucht, die ohne vorherige Derivatisierung auskommt und somit schneller arbeitet und einen Aufarbeitungsschritt spart. Anhand dieser Analysemethode besteht die Möglichkeit, bei Kultivierungen den Zufütterungsprozess offline zu beobachten und Aminosäuren je nach Bedarf zuzufügen.

Des Weiteren wird untersucht, wie sehr sich Peptide in Größe, Form und Sequenz unterscheiden müssen, damit sie mit einer nicht vorbehandelten Kapillare und einem möglichst einfachen Puffer isoliert werden können.

Am Trennbeispiel verschiedener Proteine und Peptide wird aufgezeigt, welche Vorteile eine beschichtete Kapillare im Vergleich zu einer unbehandelten Kapillare aufweist.

In den letzten Abschnitten dieser Arbeit wird die Erfassung verschiedener tPA-Standards in Wasser und in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Medium beschrieben und überprüft, ob sich die daraus ergebenden Resultate auf eine reale Kultivierung übertragen lassen.

Des Weiteren werden Standardproben des von *E. coli* Bakterien hergestellten Endostatins sowie Kultivierungsproben untersucht.

Im letzten Abschnitt wird ein Immunoassay mit einem kommerziell erhältlichen Modellsystem von Sigma entwickelt. Die erhaltenen Ergebnisse werden auf ein Glykoprotein der Firma Bayer Corp. übertragen. Dieses Glykoprotein ist dem Modellsystem strukturell ähnlich, aber nicht identisch.

2 Prinzip und Aufbau der Kapillarelektrophorese

Die Trennung von Analyten in der Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) basiert auf dem Prinzip der Elektrophorese, nach dem unterschiedlich geladene Teilchen in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten wandern [50]. Seit der Einführung der Kapillarzonenelektrophorese durch Hertjen [39] hat die CE eine rasante Entwicklung durchlaufen. 1981 gelang Jorgenson & Lucass die erste Fluoreszenzdetektion in Kapillaren mit Innendurchmessern kleiner als 100 μm . Mit der Entwicklung weiterer empfindlicher Detektionssysteme und kommerziell erhältlicher, vollautomatischer Systeme hat sich die Kapillarelektrophorese als ergänzende und ersetzende Analysemethode zu HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) und GC (Gaschromatographie) in den biochemischen und medizinischen Laboratorien etabliert [120].

2.1 Experimenteller Aufbau eines Kapillarelektrophoresesystems

Fester Hauptbestandteil eines Kapillarelektrophoresesystems (Abb. 2.1) ist eine Hochspannungsquelle mit zwei Platinelektroden, die in zwei Gefäße mit Elektrolytlösungen eintauchen. Diese Gläschen sind durch eine Quarzglaskapillare miteinander verbunden. Die Kapillare ist austauschbar und kann somit zur Optimierung einer Trennung durch Variation in Länge, Durchmesser und eventueller Beschichtung angepasst werden. Die Kapillaren sind von einer Polyimidschicht umgeben, welche die Flexibilität erhöht und sie unempfindlicher gegenüber mechanischen Belastungen macht [22]. Der Innendurchmesser der Kapillaren liegt zwischen 10 μm und 100 μm und ihre Länge zwischen 20 cm und 100 cm. In speziellen Fällen können die Kapillaren auch noch länger sein [101]. Die Kapillaren werden in Kartuschen eingebaut, in denen sie teilweise von einem Plastikschlauch umgeben sind. Dieser wird während eines programmierten Laufes mit einer Kühlflüssigkeit gefüllt, welche die Kapillare umspült. Durch diese Flüssigkeit lässt sich zum einen die Trennung bei einer voreingestellten Temperatur durchführen, zum anderen führen die Kapillaren die bei dem Elektrolyseprozess entstehende Wärme an dieses Kühlmedium ab.

Die Analysenbestandteile werden nach der Trennung durch Licht verschiedener Wellenlängen angeregt und durch ein Fenster am Ende der Kapillare detektiert. Zur Aufnahme der Daten, die über einen A/D-Wandler an den Computer weitergeleitet werden, gibt es verschiedene Detektoren. Der UV-Detektor wird am häufigsten genutzt, weiterhin spielen

Fluoreszenz- und Photodiodenarraydetektoren eine große Rolle. Für andere analytische Fragestellungen bieten sich auch eine amperometrische Datenaufnahme oder ein an das Kapillarelektrophoresesystem angeschlossenes Massenspektrometer an.

Zur Spannungserzeugung werden Gleichstromhochspannungsquellen verwendet, bei denen je nach Einstellung der Strom entweder zur Kathode oder zur Anode (reversed mode) fließt. Es kann eine Spannung bis zu ± 30 kV angelegt werden; dabei fließen je nach Elektrolyt und Kapillarlänge resultierende Ströme zwischen ± 10 μA und ± 250 μA .

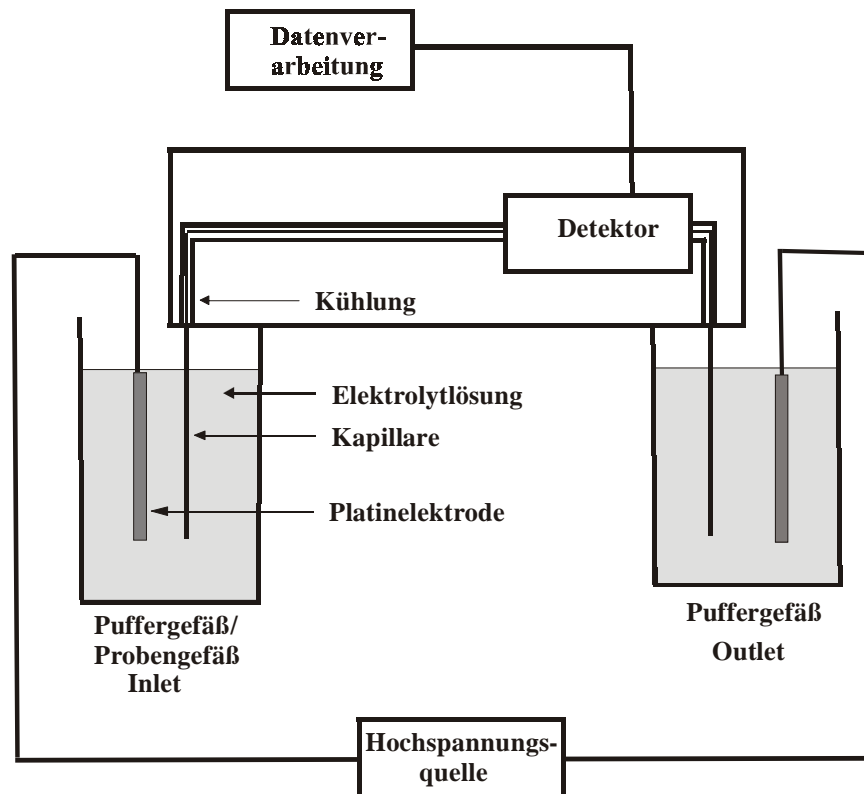


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Kapillarelektrophoresesystems

2.2 Probeninjektion

Die Probeninjektion kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die Druckinjektion ist die am häufigsten genutzte. Dabei wird für einen definierten Zeitraum (einige Sekunden) eine Druckdifferenz (wenige Millibar) zwischen den Gefäßen am Anfang und am Ende der Kapillare angelegt, durch die sich die Probenbestandteile in die Kapillare bewegen. Dabei entsteht ein laminares Strömungsprofil, und es lässt sich keine scharfe Startzone ausmachen.

Bei der elektrokinetischen Probeninjektion wird für einen kurzen Zeitraum eine Spannung zwischen 1 kV und 10 kV angelegt, durch welche die einzelnen Bestandteile der Probe

elektrophoretisch und elektroosmotisch in die Kapillare wandern. Bei dieser Methode kommt es durch die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Probe in der Kapillare.

2.3 Detektion

Die Kapillarelektrophorese lässt sich mit vielen Detektionsmöglichkeiten kombinieren. Die Detektion im ultravioletten Bereich von 190 nm bis 320 nm wird am meisten genutzt, höhere Wellenlängen bis 600 nm sind möglich. Allerdings gibt es kaum Analyten, die in diesem Wellenlängenbereich aktiv sind. Die UV-Detektion lässt sich auch indirekt nutzen. Dabei wird ein stark UV-aktiver Elektrolyt verwendet, und die Analyten hinterlassen negative Signale im Elektropherogramm. Die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)-Detektion wird oft eingesetzt, mit ihr lassen sich Probenbestandteile im Vergleich zur UV-Detektion in bis zu 300fach niedrigerer Konzentration detektieren. Allerdings müssen die meisten Analyten vor ihrer LIF-Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), gekoppelt werden, da natürliche Fluoreszenzaktivität selten vorkommt.

Weitere, seltener genutzte Detektionsmöglichkeiten sind Massenspektrometrie [5], Amperometrie [118], Konduktometrie [105] und on-line Radioaktivitätsmessungen [81].

3 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Die Trennung und Bewegung der Analyten in der Kapillarelektrophorese beruht auf der Überlagerung der elektrophoretischen Eigenbeweglichkeit der Substanzen und dem elektroosmotischen Fluss (EOF) und wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.1 Elektrophoretische Beweglichkeit

Im elektrischen Feld bewegen sich Ionen, abhängig von ihrer Ladung und ihrer Größe, mit einer konstanten Geschwindigkeit, die außerdem von dem pH-Wert und der Ionenstärke der Elektrolytlösung beeinflusst wird. Bei Erhöhung der Spannung wächst die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten und führt zu kürzeren Analysenzeiten. Dem entgegen wirkt die Reibungskraft, die abhängig ist von dem Stoke'schen Radius des Ions und der Viskosität des Elektrolyten. Die Analyten lassen sich im elektrischen Feld trennen, wenn sie sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit unterscheiden. Diese setzt sich aus elektrophoretischer (μ_{ep}) und elektroosmotischer (μ_{os}) Beweglichkeit zusammen (s. Kap. 3.2.1):

$$v = (\mu_{os} + \mu_{ep}) \cdot \frac{U}{L} \quad \text{mit} \quad \mu_{ep} = \frac{z \cdot F}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

U: Spannung; L: Länge der Kapillare von Beginn der Kapillare bis zum Detektionsfenster; z: effektive Ladung; F: Faraday Konstante; η : dynamische Viskosität; r: Stoke'scher Radius

3.2 Elektroosmotische Beweglichkeit

Befinden sich Feststoffpartikel in Kontakt mit wässrigen Elektrolytlösungen, so bildet sich an der Phasengrenze eine andere Verteilung der elektrischen Ladungsträger aus als im Inneren der festen bzw. flüssigen Phase. Dies ist entweder auf eine spezifische Adsorption von Anionen oder Kationen aus der Flüssigkeit an der Feststoffoberfläche oder auf die Dissoziation von Molekülgruppen zurückzuführen. Aufgrund der entstandenen Grenzflächenladung werden entgegengesetzt geladene Ionen angezogen, und es bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus. Nach dem Modell von Stern werden die an einer Festkörpergrenzfläche befindlichen Ladungsträger durch Gegenionen kompensiert, welche

sich sowohl in starrer Anordnung als auch diffus in der Flüssigkeit verteilt befinden. Eine Schicht von Gegenionen wird spezifisch adsorbiert, so dass die Ionen fest an die Festkörpergrenzfläche gebunden werden. Diese starre Schicht wird als Sternschicht oder auch Helmholtzschicht (stationäre Schicht) bezeichnet. Der andere Teil der Gegenionen ist diffus in der Flüssigkeit verteilt, und eine Wärmebewegung der Teilchen ist möglich. Es ergibt sich ein Potentialabfall, der im starren Teil der Doppelschicht linear, im diffusen Teil exponentiell verläuft.

Bei Anlegen eines elektrischen Feldes an eine mit Elektrolyt gefüllte Kapillare erfolgt eine Bewegung der Ionen der diffusen Doppelschicht (mobile Schicht) in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Resultierend aus der inneren Reibung erfolgt eine Bewegung der Flüssigkeit, der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF). Die beschriebenen Zusammenhänge sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

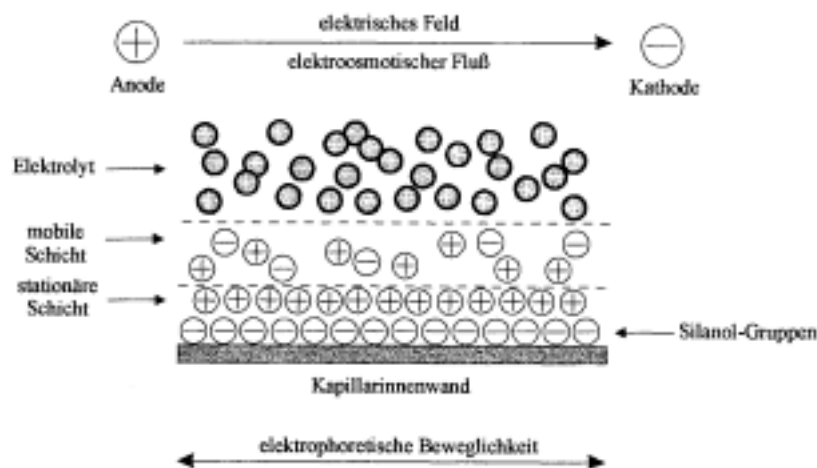


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des elektroosmotischen Flusses

In den meisten kapillarelektrophoretischen Trennungen überlagert der EOF die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten. Die Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses läßt sich in einer vereinfachten Form der Helmholtzgleichung darstellen:

$$v_{os} = \mu_{os} \cdot E = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{mit} \quad \mu_{os} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Der EOF ist somit direkt proportional zu der Dielektrizitätskonstante ϵ , der angelegten Feldstärke E und dem Zetapotential ζ sowie umgekehrt proportional zu der Viskosität η .

Bei Quarzkapillaren verringert sich der elektroosmotische Fluss mit wachsender Elektrolytkonzentration und bei der Zugabe organischer Komponenten und wächst mit dem Grad der dissoziierten Silanolgruppen, der vom pH-Wert des Elektrolyten abhängt [22].

Der EOF kommt bei allen elektrophoretischen Trennmethode vor, da die Oberflächenladung nicht vollständig eliminiert werden kann. Auf der einen Seite kann es zu konvektiven Vermischungen der elektrophoretischen Zone kommen, auf der anderen Seite spielt der EOF eine maßgebliche Rolle beim Transport durch die Kapillare. Aufgrund des immer vorhandenen EOFs ist der Detektor in der Kapillarelektrophorese meist auf der Kathodenseite platziert.

Kationen bewegen sich mit dem elektroosmotischen Fluss (Komigration), neutrale Teilchen werden im elektrischen Feld nur durch den EOF bewegt und nicht weiter aufgetrennt und selbst Anionen, die von sich aus zur Anode wandern, werden durch den EOF in Richtung Kathode geschwemmt, wenn ihre elektrophoretische Geschwindigkeit nicht größer als dieser ist. Sollte das der Fall sein, sind diese Anionen im normalen Modus nicht detektierbar und müssen durch Umpolung der Elektroden (reversed mode) erfasst werden.

Bei anderen Trennmethode, wie z.B. der MEKC (mizellare elektrokinetische Chromatographie, s. Kap. 4.3), wird der EOF ausschließlich dazu genutzt, ungeladene Teilchen zur Kathode zu transportieren. Werden anionische Mizellbildner genutzt, wandern die Probenbestandteile entgegen dem EOF, solange sie sich in der Mizelle befinden und mit ihm, wenn das nicht der Fall ist. Durch diese gegenläufige Verteilung kommt es zu der hohen Selektivität in der MEKC.

Durch chemische Modifikationen der Kapillarinnenfläche kann der elektroosmotische Fluss kontrolliert, verdrängt oder umgekehrt werden.

3.3 Bandenverbreiterung

Aufgrund des geringen Innendurchmessers herrscht in der Kapillare ein ideal turbulentes Strömungsprofil, dessen Beitrag zur Bandenverbreiterung im Vergleich zur Chromatographie vernachlässigbar ist. Die Bandenverbreiterung σ^2 ist nach Gleichung 3.3 abhängig von der Longitudinaldiffusion D , der elektrochemischen Mobilität μ und der Feldstärke E [44].

$$\sigma^2 = 2D \cdot t = \frac{2 \cdot D}{\mu \cdot E} = \frac{2 \cdot D \cdot L}{\mu \cdot U} \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

Durch eine Erhöhung der Spannung sollte es also zu einer Verringerung der Bandenverbreiterung kommen. Bei höherer Spannung fließen allerdings auch höhere Ströme, die aufgrund höherer Reibungskräfte zu einer erhöhten Produktion Joule'scher Wärme führen. Dadurch kommt es zu einem Temperaturgradienten in der Kapillare, der bei einer äußeren Thermostatisierung der Kapillare noch ausgeprägter ist. Die Viskosität des Elektrolyten wird durch die unterschiedlichen Temperaturen verändert und wirkt wiederum auf die elektroosmotischen Beweglichkeiten und Wanderungsgeschwindigkeiten der Probenbestandteile [55], was letztendlich zu einer Bandenverbreiterung führt.

Ein weiterer Grund für die Bandenverbreiterung liegt in der Beschaffenheit der nicht inerten inneren Kapillaroberfläche. Trotz der geringen Oberfläche werden Adsorptionseffekte beobachtet. Aufgrund der Dissoziation der Silanolgruppen, die schon ab einem pH-Wert von 1,5 beobachtet werden kann, liegen diese in negativ geladener Form vor. Positiv geladene Probenbestandteile lagern sich an die Kapillarwand an, und diese Adsorption führt zu asymmetrischen Peaks mit starkem „Tailing“. Bei wiederholter Injektion von z.B. Proteinen lässt sich eine Verschiebung in den Migrationszeiten erkennen, die auf eine Adsorption dieser an die Kapillarwand schließen lassen. Die Unterdrückung dieser Adsorption ist sehr wichtig für die Analytik von Proteinen. Durch eine kovalente Bindung einer hydrophilen Schicht an die Kapillarwand oder durch Zusätze, die bevorzugt adsorbiert werden, wie z.B. 1,3-Diaminopentan (DAP), kann diese Anlagerung minimiert werden.

Eine zu lange Injektionsdauer und die damit verbundene Überladung der Kapillare verursacht ebenfalls eine Bandenverbreiterung. Dieses Phänomen kann mit einem Prozess umgangen werden, der sich „sample stacking“ nennt. Dabei wird die Länge der Probenzone reduziert und dadurch eine verbesserte Sensitivität und höhere Auflösung erreicht. Das „stacking“ funktioniert, wenn die Probe in einer weniger konzentrierten Lösung vorliegt als der Trennpuffer. Unter diesen Umständen ist die Feldstärke in der Probenzone größer als in der restlichen, mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare. Die Analyten bewegen sich in der Probenzone schnell vorwärts, bis sie an die Grenzlinie der Elektrolytlösung gelangen. Dort werden sie aufgrund des geringeren Stroms langsamer. Durch diese Methode kann die Breite der Injektionszone bis um den Faktor 10 verringert werden, was zu scharfen Peaks führt [140].

4 Methoden der Kapillarelektrophorese

Analytische Bestimmungen mit der Kapillarelektrophorese können unter Ausnutzung der verschiedenen Analyteigenschaften oder durch Zusatz von Additiven zum CE-Puffer erzielt werden.

4.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die Kapillarzonenelektrophorese ist die einfachste und am häufigsten angewandte Methode der kapillarelektrophoretischen Trennung. Die Auftrennung der Probenbestandteile erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten, die bei konstanter Pufferzusammensetzung, konstantem pH-Wert und konstanter Spannung nur von ihrer Ladungsdichte abhängen. Diese ist definiert durch das Masse-/Ladungsverhältnis. Die elektrophoretische Trennung findet in niederviskosen, meist wässrigen Lösungen statt, denen keine stabilisierenden Medien wie z.B. Polyacrylamid zugesetzt werden. Weiteren Einfluss auf die Trennung hat der elektroosmotische Fluss, der in Richtung Kathode fließt. Dieser beschleunigt die kationischen Bestandteile der Probenlösung, gibt den neutralen Molekülen eine Bewegungsrichtung und treibt auch die negativ geladenen Bestandteile Richtung Kathode, obwohl ihr eigener Fluss sie in Richtung Anode bewegt (s. Kap. 3.2). Dadurch kommt es zuerst zu einer Detektion von Kationen, dann von neutralen Molekülen, die mit dieser Methode nicht weiter aufgetrennt werden können, und zum Schluss von anionischen Bestandteilen.

Die Einsatzgebiete der Kapillarzonenelektrophorese sind sehr vielfältig und reichen vom Nachweis anorganischer Ionen [31, 91] bis zur Untersuchung von DNA [132].

4.2 Kapillargelelektrophorese (CGE)

Die Kapillargelelektrophorese ist das kapillarelektrophoretische Analogon zur traditionellen Gelelektrophorese und hat durch das amerikanische Humangenomprojekt stark an Bedeutung gewonnen [17, 106]. Die Kapillare wird zur Trennung mit einer siebartigen Matrix, wie z.B. verknüpftes Polyacrylamid oder Agarose, gefüllt. Dadurch lassen sich biologische Makromoleküle wie Oligonukleotide, DNA-Fragmente und große Proteine, die ein ähnliches oder identisches Masse-/Ladungsverhältnis besitzen, größenbasiert trennen. Die

Vorteile gegenüber der herkömmlichen Gelelektrophorese sind die Vielfalt der möglichen Matrices, die on-line Detektion und die Automatisierung der Analysen.

4.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die mizellare elektrokinetische Chromatographie wird zur Trennung neutraler Moleküle genutzt, die in der normalen Kapillaronenelektrophorese nicht getrennt werden können. Dazu werden dem Puffer Detergenzien zugegeben, die mit den neutralen Molekülen mehr oder weniger starke, geladene Mizellen bilden. Im Falle des häufig genutzten Natriumdodecylsulfats wandern die Mizellen aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Durch die Verteilung der Analyten zwischen der wässrigen und der pseudostationären Phase kommt es zu einer Auftrennung der Probenbestandteile. Bindet ein neutraler Analyt nicht an das Detergenz, wandert er mit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses Richtung Kathode. Lagert sich dagegen ein anderer Analyt in eine Mizelle ein, summieren sich der EOF und die Wanderungsgeschwindigkeit der Mizelle zu einer resultierenden Geschwindigkeit, mit welcher der Analyt erst später zur Kathode gelangt.

Die MEKC wird häufig bei stark hydrophoben Substanzen wie aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen [111] angewendet, findet aber auch bei kleineren Molekülen wie Aminosäuren ihren Einsatz [22].

4.4 Kapillarelektrochromatographie (CEC)

Die Kapillarelektrochromatographie ist eine Hybrid-Technik, die durch Kombination von HPLC und CE entstanden ist. Dabei wird eine gepackte Kapillarchromatographiesäule in die Kapillarelektrophorese eingebaut und Spannung angelegt. Sowohl der elektroosmotische Fluss als auch die Wechselwirkung der Substanzen mit der gepackten Säule tragen zur Trennung der Analyten bei. Zur Anwendung kommt die CEC bei einer Vielzahl von aromatischen Verbindungen [4, 19].

4.5 Kapillarisoelektrische Fokussierung (cIEF)

Bei der kapillarisoelektrischen Fokussierung findet die Trennung der Analyten nach ihrem isoelektrischen Punkt statt. Dazu wird die Probe in einem Ampholytgemisch in die Kapillare injiziert. Eine starke Säure wird an der Anode platziert (Anolyt), eine starke Base dient

als Kathodenpuffer (Katholyt). Nach Anlegen der Spannung bildet sich in der Kapillare mit Hilfe der Ampholyten ein pH-Gradient aus, in dem die Probenbestandteile wandern, bis ihr isoelektrischer Punkt dem pH-Wert in der Kapillare entspricht. Nach einem Mobilisierungsschritt, der durch einen elektrokinetischen Effekt oder durch eine Druckdifferenz ausgelöst werden kann, werden die Analyten detektiert. Die notwendige Kompensation des elektroosmotischen Flusses wird durch die Beschichtung der Kapillare mit Polymeren wie Methylcellulose oder durch den Einsatz von hochviskosen Pufferlösungen erreicht [73].

4.6 Affinitätskapillarelektrophorese (ACE)

Bei der ACE werden die speziellen Interaktionen zwischen Biomolekülen ausgenutzt. Es können damit spezifische Bindungen zwischen den Molekülen quantifiziert und identifiziert werden. Eine Vielzahl interagierender Substanzen, eingeschlossen Detergentien [129, 21], Cyclodextrine [25, 52], Kronenether [56], Antibiotika [26], Peptide und Proteine [117] werden genutzt. Formell können auch alle MEKC- und chiralen Trennungen zur ACE gezählt werden.

Auch die im nächsten Kapitel beschriebenen Antikörper-Antigen-Reaktionen gehören in diese Gruppe. Die ACE läßt sich sehr gut mit der LIF-Detektion kombinieren, so dass auch sehr geringe Mengen an Analyt bis zu Konzentrationen von 10^{-10} mol/L detektiert werden können.

5 Kapillarelektrophoretische Immunoassays

Kapillarelektrophoretische Immunoassays (CEIA) sind seit 1993 als neue analytische Technik aufgekommen [94]. Die CEIA, kombiniert mit sensitiven Detektionsmethoden wie laserinduzierter Fluoreszenz (LIF), bietet viele Vorteile gegenüber konventionellen Immunoassays. CEIA kann schnelle Trennungen mit hoher Reproduzierbarkeit bei gleichzeitiger Erfassung verschiedener Analyten durchführen und ist automatisierbar.

Immunoassays sind Techniken, die auf einer spezifischen Immunreaktion zwischen Antikörper (Ak) und Antigen (Ag) beruhen und die Erfassung beider Substanzen in Lösung ermöglichen. Immunoassays sind aufgrund ihrer Selektivität, der niedrigen Detektionsgrenzen und der übergreifenden Einsatzmöglichkeiten sehr wichtige Techniken in klinischen, biopharmazeutischen und umweltchemischen Bereichen [36]. Die einzigartige Selektivität von Antikörpern macht es möglich, in Immunoassays Spuren von Analyten zu detektieren, auch wenn größere Mengen von strukturell oder chemisch ähnlichen Substanzen vorhanden sind. Die hohe Selektivität resultiert aus verschiedenen Labeling-Techniken wie Radioaktivität, Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder enzymveränderte Reaktanden. Dadurch sind Immunoassays speziell für Analysen von Bestandteilen in geringster Konzentration in komplexen Medien wie Blut und Urin, ohne oder mit nur geringer Aufarbeitung, geeignet.

Das gängigste Prinzip eines konventionellen Immunoassays ist die Immobilisierung des Ak (oder Ag) auf der festen Oberfläche einer Mikrotiterplatte, auf Glasfaser oder Plastikschläuchen. Die Proben enthalten den Analyten (Ag, wenn Ak immobilisiert ist oder umgekehrt), der in Kontakt mit der präparierten Oberfläche gebracht wird. Nach der Trennung von gebundener und freier Form von Antikörpern und Antigenen findet die Quantifizierung über den Umweg einer enzymatischen Aktivitätsmessung (enzym-verknüpfter Immunosorbent Assay, ELISA) oder durch Messung der Radioaktivität statt.

Die meisten konventionellen Immunoassays werden manuell durchgeführt. Ermüdende Prozesse, langsame Reaktionen, schlechte Reproduzierbarkeit und nicht spezifische Bindungen der Reaktanden an der stützenden Oberfläche sind die dabei auftretenden Probleme.

Die Kapillarelektrophorese mit ihrer hohen Selektivität und ihrer, durch Einsatz des LIF-Detektors, sehr niedrigen Nachweisgrenze kann freie Antikörper und Antigene sehr schnell von den gebundenen trennen und ist somit speziell für Immunoassays gut einsetzbar. Sie

kann immunologische Erkennung mit direkter Quantifizierung, kleinsten Maßstäben und Automatisierbarkeit verbinden und bietet damit große Vorteile für Immunoassays.

Zusätzlich zu ihrer Schnelligkeit und Sensitivität hat die CEIA weitere Vorteile gegenüber den konventionellen Immunoassays:

- CEIA verbraucht viel weniger Probe und Reagenzien,
- CEIA ist einfacher handhabbar und automatisierbar,
- mit CEIA besteht die Möglichkeit, mehrere Analyten gleichzeitig zu detektieren,
- CEIA ermöglicht die direkte Visualisierung der Bildung und des Zerfalls des Immunkomplexes,
- CEIA hat mehrere empfindliche Detektionsmöglichkeiten wie UV, LIF und massenspektrometrische Methoden.

Ein Nachteil der kapillarelektrophoretischen Immunoassays ist, dass sie immer nur eine Probe gleichzeitig bearbeiten können, so dass nur ein geringer Probendurchsatz stattfindet.

5.1 Der nicht kompetitive CEIA

Der nicht-kompetitive CEIA basiert auf der Trennung der Ag-Ak Komplexe von dem freien Ag und/oder Ak. Wenn die Analyte UV- oder Fluoreszenz-Licht absorbieren, lässt sich die Menge des gebildeten Komplexes direkt quantifizieren. In den meisten nicht-kompetitiven Immunoassays wird einer der beiden Reaktanden, entweder Ag oder Ak, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt, um die Empfindlichkeit zu steigern. Ein Überschuss des gelabelten Reaktanden wird zu dem System gegeben, um die Vollständigkeit der Reaktion zu gewährleisten (s. Abb. 5.1).

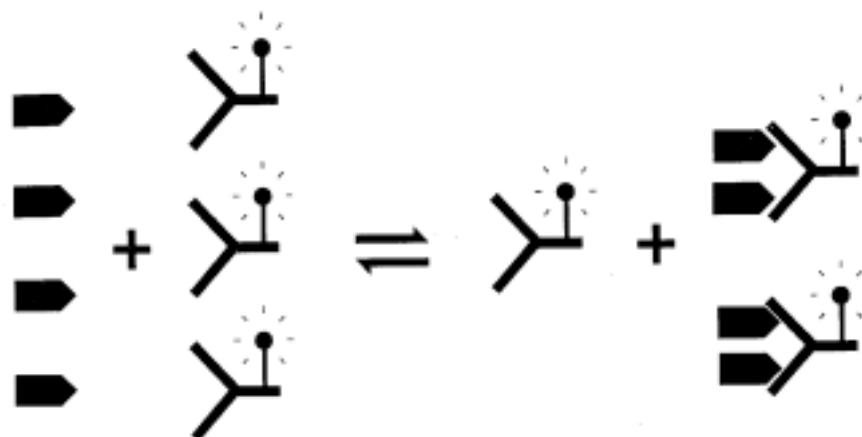
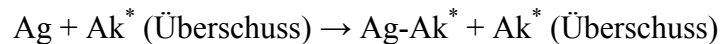
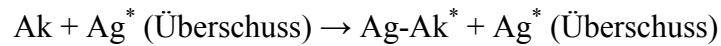


Abb. 5.1: Schematische Darstellung eines nicht kompetitiven Immunoassays [125]

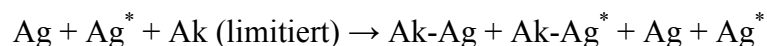
Wenn die Markierung nötig ist, um überhaupt detektierbare Edukte und Produkte zu erhalten, kann entweder der Antikörper oder das Antigen gelabelt werden. Dadurch gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten des nicht-kompetitiven Assays, je nachdem, ob Ag oder Ak markiert ist.



Ag^* und Ak^* sind die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antigene und Antikörper. Für die Analyse von Antikörpern in einer Probe wird ein Überschuss an gelabelten Ag zugegeben, die mit dem in der Probe vorhandenen Ak Ak-Ag^* -Komplexe bilden. Die Bildung des Komplexes sollte quantitativ und direkt abhängig von der Antikörpermenge in der Probe sein. Die CE-LIF zeigt im Elektropherogramm zwei scharfe Peaks, die dem gelabelten Antigen und dem Komplex entsprechen. Ist der Komplex stabil, ist es möglich, die Menge der Antikörper in der Mischung entweder durch die Menge des entstandenen Komplexes oder durch die Abnahme des Signals des markierten Antigens zu bestimmen.

5.2 Der kompetitive CEIA

Bei kompetitiven Immunoassays liegen beide Analyten (Ak und Ag) in der Probe vor, ein Reagenz ist nur in geringer Menge vorhanden. Das markierte Reagenz (Ag^* oder Ak^*) konkurriert mit dem Analyten (Ag oder Ak) um die Bindung an die limitierte Substanz (Ak oder Ag). In dem Fall, dass eine bekannte Menge des gelabelten Ag^* und eine limitierte Menge Antikörper mit dem Analyten (Ag) gemischt werden, lautet das Reaktionsschema:



Das Antigen in der Probe konkurriert mit dem mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Ag^* um die Komplexbildung mit der begrenzten Menge Antikörper. CE-LIF trennt die Mischung, und es entstehen zwei scharfe Peaks, die dem freien Ag^* (wenn noch vorhanden) und dem Ak-Ag^* Komplex entsprechen. Je mehr Ag in der Probe vorhanden ist, desto mehr freies markiertes Ag^* bleibt über und umso weniger Komplex zwischen Ak und Ag^* bildet sich. Durch Vergleich der beiden Peaks mit Standards kann der Antigengehalt in der Probe be-

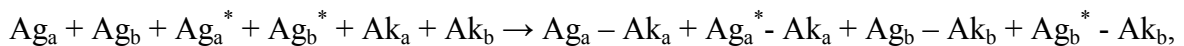
stimmt werden. Die Quantifizierung des Antikörpers kann dann auf dem selben Weg erfolgen wie bei den konventionellen Immunoassays.

Bei der Mischung einer bekannten Menge von gelabelten Antikörper (Ak^*), einer limitierten Menge von Antigenen und dem Analyten (Ak) lautet das Reaktionsschema:



Der Antikörper in der Probe konkurriert mit dem gelabelten Antikörper (Ak^*) um die Komplexbildung mit der begrenzten Menge Antigen. Die Kapillarelektrophorese mit LIF-Detektion trennt die Mischung und führt zu zwei scharfen Signalen im Elektropherogramm, die dem freien Ak^* (soweit vorhanden) und dem Ak^*-Ag Komplex entsprechen. Je mehr Antikörper in der Probe vorhanden ist, desto mehr Ak^* liegt frei vor und desto weniger markierter Komplex wird gebildet. Dadurch kann die Menge des Antikörpers über einen Vergleich der beiden Peaks mit Standards bestimmt werden.

Wie schon erwähnt, ist es möglich, mit der CEIA mehrere Analyten gleichzeitig zu bestimmen. Wenn z.B. zwei strukturell ähnliche Antigene gelabelt und mit Proben vermischt werden, die diese beiden Antigene erhalten, werden sie wie folgt mit den vorhandenen Antikörpern reagieren:



wobei Ag_a , Ag_b , Ag_a^* und Ag_b^* die freien und gelabelten Antigene sind. Ak_a und Ak_b sind die dazugehörigen Antikörper.

Das obige Reaktionsschema schließt Kreuzreaktivität zwischen den zwei verschiedenen Antikörpern und den verschiedenen Antigenen aus. Die CEIA – LIF sollte in ihrem Elektropherogramm vier scharfe Peaks aufzeigen, die den beiden gelabelten Antigenen und den mit diesen gebildeten Komplexen entsprechen.

5.3 On-line Immunoassay

In den meisten beschriebenen Immunoassays dient die CE nur als Mittel zur Trennung von Komplex und freiem Antigen und Antikörper, nachdem die Reaktion off-line durchgeführt worden ist. Um die CEIA zu automatisieren, gilt es, die Immunreaktion und die Probenanalyse on-line durchzuführen.

Tao et al. [109] nutzen ein Kapillarelektrophoresesystem, dem eine Mischkammer vorgeschaltet ist, in der der Ak und das gelabelte Ag mit den Antigenproben gemischt werden und reagieren können. Das Reaktionsgemisch wird durch einen kontinuierlichen Strom weitertransportiert, der nur während der Dauer der Injektion unterbrochen wird. Mit diesem on-line System ist es möglich, die Ag-Proben alle 5 Sekunden zu analysieren. Obwohl die Immunreaktion und die Analyseschritte wie bei den anderen CEIA unabhängig durchgeführt werden, gibt es doch einige Unterschiede.

Erstens werden Ag und Ak kontinuierlich gepumpt, so dass Vermischung und Reaktion kontinuierlich stattfinden, solange die Pumpen laufen. Zweitens ist die on-line Injektion unverzögert, so dass eine Verknüpfung mit schnellen Analysetechniken möglich ist. Allerdings ist dieses System nur für schnelle Reaktionen geeignet. Bei langsamen Reaktionen werden die Peaks breiter und ungenauer [38]. Außerdem ist bei der on-line Reaktion ein Verlust der Sensitivität zu verzeichnen. Sie ist bei on-line Prozessen bis zu dreimal schlechter als bei off-line CEIAs. Diese Verschlechterung der Sensitivität resultiert aus der Verdünnung der Reaktionspartner [109,110].

Liu et al. [66] haben eine alternative Möglichkeit für die on-line CEIA gefunden. Der Antikörper und die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antigenlösungen werden in einzelnen Probengefäßen vorgelegt und nacheinander in die Kapillare injiziert. Die Reaktion zwischen den injizierten Antikörpern und Antigenen sowie die Trennung von gelabeltem Antigen und Ag^{*}-Ak Komplex findet aufgrund ihrer verschiedenen Mobilitäten in der Kapillare statt.

Bei dieser Methode gibt es verschiedene Vorteile:

- Reaktion, Trennung und Detektion finden in einer Kapillare statt.
- Ak und Ag befinden sich in separaten Probengefäßen und stehen so für viele Proben zur Verfügung.
- Es entsteht nur wenig Abfall, und es findet keine Verdünnung der Probe statt.
- Die automatische Injektion durch die CE erhöht die Genauigkeit der Probeninjektion und verhindert manuelle Pipettierfehler.

Die Automatisierung der Kapillarelektrophorese macht den Einsatz der CEIA als Immunanalyser für klinische Diagnostik möglich. Als negativer Punkt muss der geringe Probenumsatz genannt werden, der durch Miniaturisierung der Anlagen und der damit zusammenhängenden Verkürzung der Analysezeiten kompensiert werden soll [54].

6 Entwicklung einer Analytik für nicht-derivatisierte Aminosäuren

6.1 Einleitung

Die Einsatzgebiete der Aminosäureanalytik lassen sich in zwei Bereiche einteilen. Zum einen die Nahrungsmittelindustrie und zum anderen die biomedizinischen Forschung.

Die Detektion von Aminosäuren erfolgt zumeist durch HPLC oder Dünnschichtchromatographie. In den letzten Jahren wurden die Einsatzgebiete der Aminosäureanalytik immer vielfältiger, und bei der Suche nach neuen, schnelleren Analysemethoden fand die Kapillarelektrophorese große Beachtung.

Von den 20 genetisch codierten, in L-Konfiguration vorkommenden Aminosäuren absorbieren 17 nicht im UV/VIS Bereich. Nur Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, die einen aromatischen Ring und damit ein π -Elektronensystem besitzen, können direkt detektiert werden. Thornton et al. [112] benutzten ein saures Puffersystem mit Alkylsulfonsäuren als Additive zur UV-Detektion bei 185 nm.

Eine weitere, häufig genutzte Möglichkeit ist die Derivatisierung der Aminosäuren mit UV-adsorbierenden (FMOC¹, OPA²) oder fluoreszierenden (DTAF³, FITC⁴) Substanzen. Nachteile dieser Methoden sind die Derivatisierungsdauer, die schlechte Langzeitstabilität der Derivate und die Signale des überschüssigen Farbstoffs im Elektropherogramm. Außerdem reagieren einige Derivatisierungsreagenzien an unterschiedlichen funktionellen Gruppen mit den Aminosäuren, so dass es zu mehreren Signalen für einen Analyten im Elektropherogramm kommen kann. Der große Vorteil dieser Methoden ist jedoch ihre im Vergleich zur UV-Detektion erhöhte Sensitivität.

Ein weiterer Ansatz ist die indirekte UV-Detektion von Aminosäuren. Die theoretischen und experimentellen Aspekte dieser Methode wurden erstmals von Bruin et al. [12] untersucht. Bei der indirekten UV-Detektion wird eine stark absorbierende Substanz als Puffer oder Pufferzusatz gewählt, die ein großes Hintergrundsignal erzeugt. Wandert jetzt ein nicht UV-absorbierender Analyt durch die Kapillare, erzeugt er einen Abfall des Hintergrundsignals und damit einen negativen Peak.

¹ 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

² ortho-Phthaldialdehyd

³ 5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein

⁴ Fluoresceinisothiocyanat

6.2 Trennung eines Aminosäurestandards

6.2.1 Veränderung der Pufferzusammensetzung

Zu Beginn der Untersuchungen wird ein in der Literatur von Soga et al. [101] beschriebenes Puffersystem benutzt. Dieses ist kommerziell über die Firma Agilent Technologies erhältlich. Es setzt sich aus 20 mM 2,6-Pyridindicarboxylsäure (PDC) und 0,5 mM Cetyltrimethylammoniumhydrid (CTAH) zusammen, das den elektroosmotischen Fluss umkehrt. Der pH-Wert beträgt 12,1 und die Aminosäuren liegen bei diesem pH-Wert als Anionen vor. Dadurch werden die Probenbestandteile im „reverse mode“ der Kapillarelektrophorese in Richtung Anode transportiert. In der Literatur werden neben den Aminosäuren auch noch organische Säuren, Kohlenhydrate und anorganische Anionen (u.a. auch Br^-) getrennt [101].

Da in den weiteren Versuchen nur Aminosäuren getrennt werden sollen, wird aus Kostengründen das CTAH durch den kationischen Mizellbildner Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ersetzt, der dieselbe Funktion hat.

6.2.2 Optimierung der Trennbedingungen

Ein großes Problem dieses Elektrolyten liegt darin, dass der sehr stark basische Puffer Kohlendioxid aus der Luft aufnimmt. Dadurch sinkt der pH-Wert ab, was durch partielles Absinken der Grundlinie im Bereich zwischen 7 und 20 Minuten im Elektropherogramm sichtbar wird (s. Abb. 6.1).

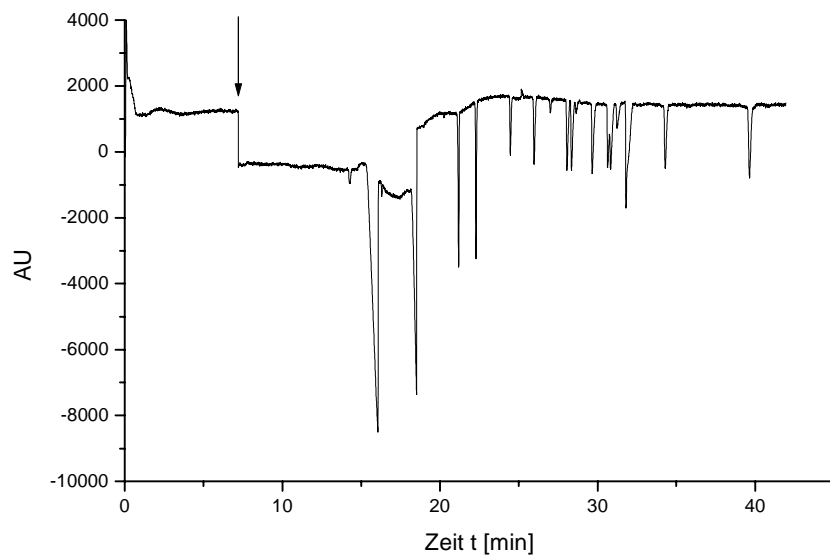


Abb. 6.1: Absinken der Grundlinie

Spannung: 20 kV reversed mode; Temperatur: 15°C; Kapillare: 50 μm x 108 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 20 mM PDC, 0,5 mM CTAB pH 12,1; Probe: Aminosäurestandard (Sigma) pH 12; Detektion: UV 350 nm indirekt

Um zu überprüfen, wie die Abnahme des pH-Werts des Puffers an der Luft verläuft, wird der Elektrolyt in einem der 2 mL Puffergefäße der Firma Beckman Coulter vorgelegt und der pH-Wert nach verschiedenen langen Zeiträumen gemessen.

Die Veränderung des pH-Werts gegen die Zeit wird in Abb. 6.2 dargestellt.

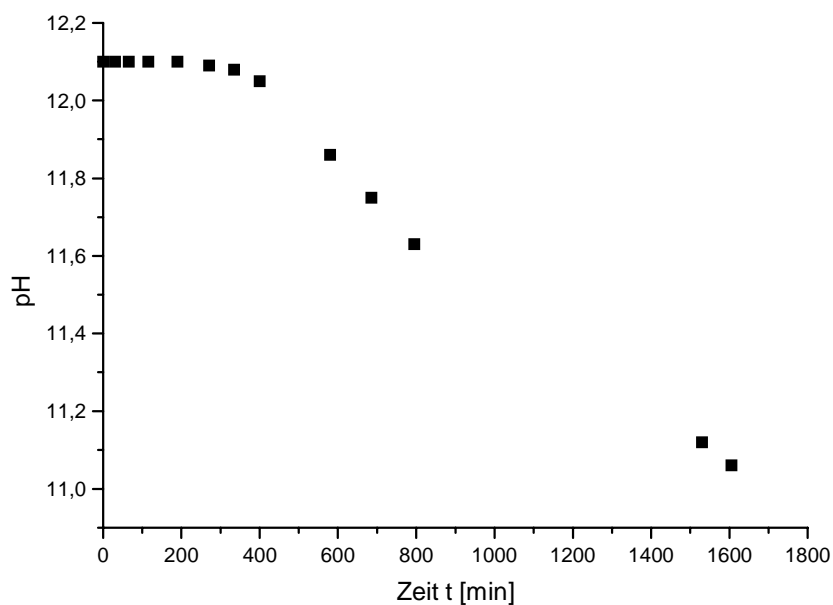


Abb. 6.2: Veränderung des Puffer pH-Werts in Abhängigkeit von der Zeit bei Raumtemperatur

Es ist erkennbar, dass nach ca. 3 Stunden der pH-Wert zu sinken beginnt. Da eine Analyse inklusive vor- und nachherigem Spülen ca. 50 Minuten dauerte, sind ohne weitere Maßnahmen nur zwei bis drei reproduzierbare Messungen möglich. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wird versucht, die Absorption des Kohlendioxids zu verhindern.

Es erweist sich als unmöglich, den Innenraum des Kapillarelektrophoresegerätes, in dem die Puffer stehen, unter Stickstoff zu setzen, da dieser nicht dicht geschlossenen ist. Durch das Gehäuse tritt Umgebungsluft in das Gerät ein, die zur Kühlung und für die pneumatischen Prozesse gebraucht wird. Der Stickstoffverbrauch wäre zu hoch, da ein ständiger Gasaustausch mit der Umgebungsluft stattfindet. Das direkte Einleiten des Stickstoffs in die Puffergefäße ist technisch sehr aufwendig, da die Puffergefäße während des Spülvorgangs bzw. bei Anlegen der Spannung angehoben werden und unter Vakuum an der Kapillare und den Elektroden hängen. Es müsste also ein Mechanismus entwickelt werden, der die freie Bewegung der Puffertabletts erlaubt und gleichzeitig bei Bedarf (wenn die Gläschen nicht unter Vakuum stehen) Stickstoff einleitet bzw. sich aus den Gläschen entfernt, wenn sie zu den Vakuumpositionen gefahren werden. Daher wird eine einfache aber effiziente Lösung entwickelt.

Während die Puffergefäße unter Vakuum stehen (während des Spülens und der Trennung), kann der Puffer kein Kohlendioxid aus der Luft absorbieren. Zwischen den Rändern der Gläschen der übrigen, nicht genutzten Puffergefäße und der Bodenplatte der Vakuumapparatur befindet sich ein Spalt von ca. 5 mm, durch den der Luftaustausch stattfinden kann. Dieser Spalt wird mit Hilfe von kleinen Gummiplättchen geschlossen, die an die Unterseite der Vakuumapparatur geklebt werden (Abb. 6.3). Durch diese Maßnahme kann das Absinken der Grundlinie für eine Dauer von bis zu zehn Messungen verhindert werden.

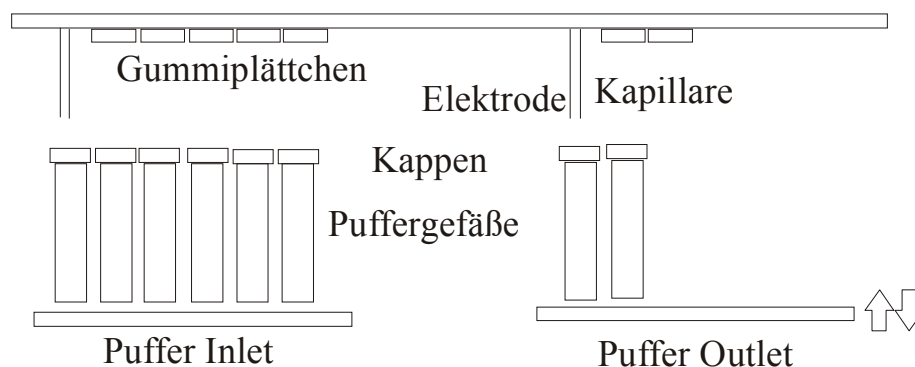


Abb. 6.3: Vorrichtung für den luftdichten Abschluss der Puffergefäße

6.2.3 Zuordnung der Peaks

Die Zuordnung der Peaks wird mit Hilfe des auf einen alkalischen pH-Wert (pH 12) eingestellten Aminosäurestandards von Sigma durchgeführt. Diese Standardlösung enthält alle Aminosäuren außer Asparagin, Glutamin und Tryptophan in einer Konzentration zwischen 1,25 μM (Cystein) und 2,50 μM (Rest). Die drei fehlenden Aminosäuren werden der Standardlösung in einer Konzentration von 2,50 μM zugegeben. Bei diesem komplexen Gemisch aus Analyten ähnlicher Größe, Gewicht und Masse-/Ladungsverhältnis ist die Zuordnung der Peaks nicht trivial.

Die einfachste Möglichkeit ist, die Probe zu spiken, d. h., eine Aminosäure wird in größerer Konzentration zum Standard zugegeben. Der dazugehörige Peak nimmt an Höhe und Fläche zu, und durch Vergleich der Elektropherogramme ist erkennbar, welches Signal zu der gespiketen Aminosäure gehört.

Eine weitere Methode ist das Ausschlussverfahren, in dem jeweils eine Aminosäure nicht zugegeben wird, so dass ein Peak fehlt. Durch Kombination der beiden Methoden gelingt eine fast vollständige Zuordnung der Peaks (Abb. 6.4).

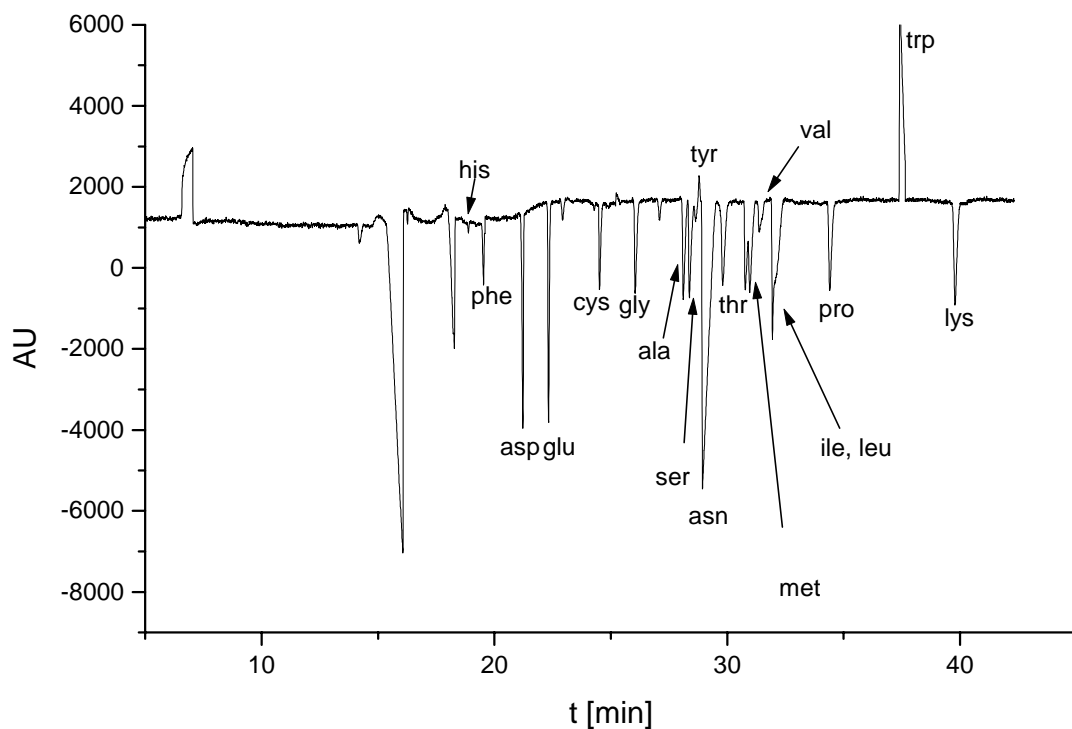


Abb. 6.4: Zuordnung der Aminosäuren zu den Peaks

Spannung: 20 kV reversed mode; Temperatur: 15°C; Kapillare: 50 μm x 108 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 20 mM PDC, 0,5 mM CTAB pH 12,1; Probe: AS-Standard (Sigma) in 0,1 M NaOH + Asn, Gln, Trp (je 2,50 μM); Detektion: indirekt UV 350 nm

In diesem Elektropherogramm können 18 Aminosäuren Peaks zugeordnet werden. Arginin und Glutamin lassen sich nicht zuordnen, Leucin und Isoleucin komigrieren aufgrund ihrer identischen Molmasse und ihren ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Es ist aber an der Schulter dieses Signals klar erkennbar, dass unter ihm eigentlich zwei Signale verborgen sind. Die Analysendauer beträgt 40 Minuten plus Spülzeit. Die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin erscheinen aufgrund ihres Phenylrestes im Elektropherogramm als positive Peaks. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 280 nm. Auch Phenylalanin besitzt einen Phenylrest, erscheint im Elektropherogramm aber als negatives Signal. Das lässt sich durch seine im Vergleich mit Tyrosin und Tryptophan nur geringe UV-Absorption bei einem Maximum von 280 nm erklären. Bei einer Detektion der Aminosäuren bei 350 nm reicht die natürliche UV-Absorption des Phenylalanins nicht mehr aus, um ein positives Signal zu erzeugen.

Da die ersten Aminosäuresignale erst nach 17 Minuten erscheinen, wird versucht, die Analysenzeit durch eine kürzere Kapillare oder durch höhere Spannung zu verringern. Dadurch verschlechtert sich aber in beiden Fällen die Auflösung. Da die Methode ohne vorherige Derivatisierung der Aminosäuren auskommt, ist sie aber dennoch schneller als die HPLC Methode, die inklusive OPA-Derivatisierung 70 Minuten dauert.

Die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten von den isoelektrischen Punkten der Aminosäuren (Tab. 6.1) ist in Abbildung 6.5 dargestellt.

Tab. 6.1: Isoelektrischer Punkte der Aminosäuren

Aminosäure	Isoelektrischer Punkt
Alanin	6,00
Arginin	11,15
Asparagin	5,41
Asparaginsäure	2,77
Cystein	5,02
Glutamin	5,65
Glutaminsäure	3,22
Glycin	5,97
Histidin	7,47
Isoleucin	5,94
Leucin	5,98
Lysin	9,59
Methionin	5,74
Phenylalanin	5,48
Prolin	6,30
Serin	5,68
Threonin	5,64
Tryptophan	5,89
Tyrosin	5,66
Valin	5,96

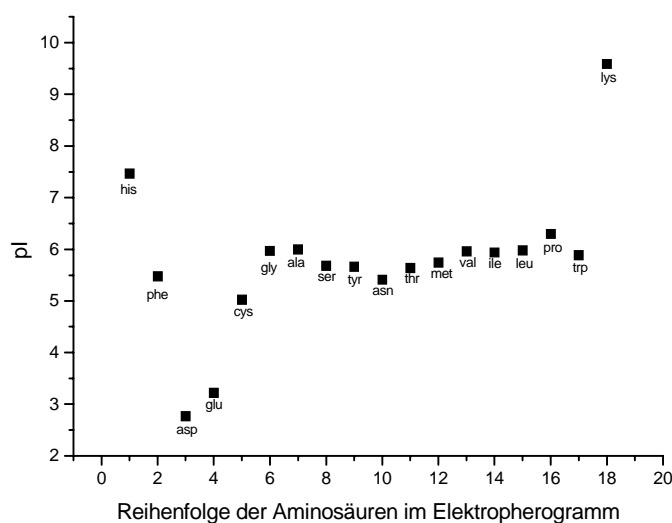


Abb. 6.5: Reihenfolge der detektierten AS im Elektropherogramm

Nach Abbildung 6.5 lässt sich sagen, dass die Reihenfolge der Aminosäuren, ausgenommen Histidin und Phenylalanin, im Elektropherogramm von ihren isoelektrischen Punkten abhängig ist. Alle Aminosäuren liegen in dem auf basischen pH-Wert eingestellten Standard in negativer Form vor und wandern deswegen in dem ebenfalls basischen Elektrolyten in Richtung Anode. Als Tendenz lässt sich aus obiger Abbildung ableiten, dass die Aminosäuren mit den niedrigsten isoelektrischen Punkten (Asparaginsäure, $pI=2,77$ und Glutaminsäure, $pI=3,22$) am schnellsten zur Anode wandern, und die letzte detektierte Aminosäure Lysin mit dem isoelektrischen Punkt $pI=9,59$ am langsamsten. Diese Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten von den isoelektrischen Punkten könnte der Grund sein, warum sich Arginin ($pI=11,15$) mit dieser Methode nicht detektieren lässt. An seinem isoelektrischen Punkt liegt das Arginin in seiner neutralen Form vor, die positiven und negativen Ladungen kompensieren sich. Der pH-Wert des Elektrolytpuffer ist wahrscheinlich nicht basisch genug, um alle Arginin-Moleküle mit einer negativen Ladung zu versehen, so dass die Aminosäure entweder überhaupt nicht oder in Richtung Kathode wandert und somit den Detektor nicht erreicht. Der Großteil der Aminosäuren, deren isoelektrische Punkte zwischen 5 und 6,5 liegen, sind nicht alleine nach ihren isoelektrischen Punkten zu ordnen, bei ihrer Wanderungsgeschwindigkeit spielen zusätzlich auch ihre Größe und Struktur eine Rolle.

Die beiden Aminosäuren Histidin ($pI=7,47$) und Phenylalanin ($pI=5,48$) lassen sich nicht in dieses Schema einordnen und werden gleich zu Beginn des Elektropherogramms detektiert.

Nach der Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden Aminosäuren wird die Reproduzierbarkeit dieser Methode überprüft. Dazu werden die Migrationszeiten, Höhen und Flächen von drei verschiedenen Aminosäuren, von denen eine am Anfang, eine in der Mitte und eine am Ende des Elektropherogramms detektiert wird, über fünf Messungen verglichen. Es werden folgende Abweichungen erhalten:

Tab. 6.2: Relative Standardabweichungen (RSD) von Migrationszeit, Peakfläche und Peakhöhe

	RSD der Migrationszeit [%]	RSD der Peakfläche [%]	RSD der Peakhöhe [%]
Asp	1,90	7,80	4,69
Ala	0,29	6,50	5,37
Lys	1,65	4,35	5,64

Die Standardabweichungen für die HPLC werden nur für die Peakflächen bestimmt und liegen dort bei unter 5%, sind also nur etwas geringer als bei der kapillarelektrophoretischen Methode.

Ein großer Vorteil der entwickelten Methode im Vergleich zur HPLC-Analytik und zu anderen kapillarelektrophoretischen Methoden liegt darin, dass keine Derivatisierung mehr durchgeführt werden muss und dass keine störenden Signale des Derivatisierungsreagenzes mehr vorkommen, wie es z.B. bei einer Derivatisierung mit DTAF oder FITC der Fall ist [88].

Ein Nachteil ist, dass im Vergleich zu den derivatisierten Aminosäuren nur relativ große Konzentrationen an Analyt erfasst werden können, was an der indirekten UV-Detektion liegt. Bei sehr geringer Konzentration einer oder mehrerer Aminosäuren kann es passieren, dass sie unter der Nachweisgrenze liegen und nicht mehr detektiert werden können.

Es muss also je nach Konzentration der vorhandenen Aminosäuren entschieden werden, ob die Methode mit der indirekten UV-Detektion einsetzbar ist oder ob doch eine Derivatisierungsreaktion zur Detektion der Analyten durchgeführt wird.

6.2.4 Untersuchung von Medium

Da die entwickelte Methode gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert, wird ihre Anwendbarkeit auf Realproben, wie z.B. Medium untersucht. Bei diesem handelt es sich um ein Serum- und proteinfreies Medium für CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen, das von der Bayer Corp. Berkeley, USA, zur Kultivierung eines Glykoproteins genutzt wird. Die Aminosäuren sind in verschiedenen Konzentrationen vorhanden und werden unterschiedlich schnell von den Zellen verstoffwechselt. Aufgrund der entwickelten Methode sollte es möglich sein, zumindest qualitativ beurteilen zu können, welche Aminosäuren bevorzugt verbraucht werden und nachgefüttert werden müssen und ob sich eventuell neue Signale entwickeln, die das Entstehen von Abfallprodukten oder des gewünschten Produkts verdeutlichen. In den beiden folgenden Spektren (Abb. 6.5 und 6.6) sind Elektropherogramme von Mediumsproben zu Beginn und zum Ende der Produktion dargestellt.

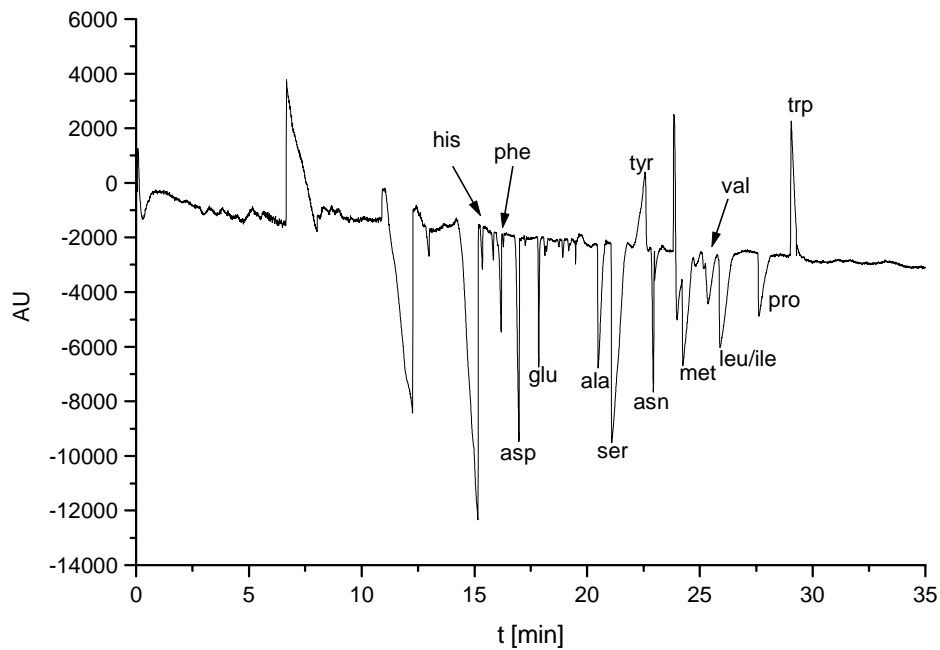


Abb. 6.5: Medium vor Beginn der Kultivierung

Spannung: 20 kV reversed mode; Temperatur: 15°C; Kapillare: 50 μm x 108 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 20 mM PDC, 0,5 mM CTAB pH 12,1; Detektion: indirekt UV 350 nm

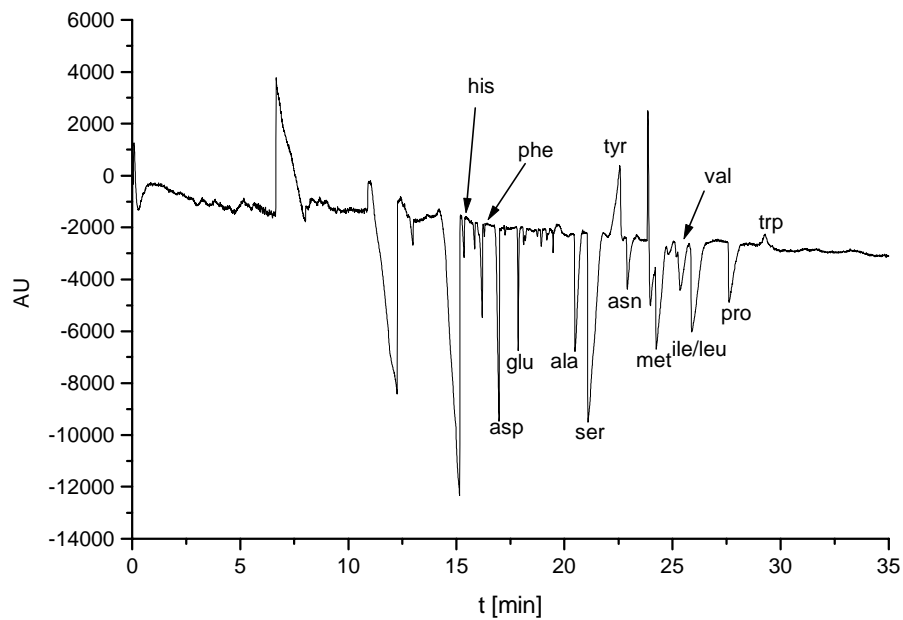


Abb. 6.6: Medium nach Beendigung der Kultivierung

Spannung: 20 kV reversed mode; Temperatur: 15°C; Kapillare: 50 μm x 108 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 20 mM PDC, 0,5 mM CTAB pH 12,1; Detektion: indirekt UV 350 nm

Die Zuordnung der Aminosäuren gelingt in diesen Elektropherogrammen sehr gut. Es sind nicht alle Aminosäuren, die im Standard vorliegen, vorhanden, sondern nur die detektier-

ten. Beim Vergleich der beiden Elektropherogramme ist deutlich zu erkennen, dass die Signale des Asparagins und des Tryptophans abgenommen haben, also diese beiden Aminosäuren verbraucht worden sind.

Bei der Aufnahme von Elektropherogrammen über den ganzen Kultivierungsverlauf lässt sich somit feststellen, welche Aminosäuren zu welchem Zeitpunkt am schnellsten verbraucht werden.

7 Peptid- und Proteinanalytik

7.1 Allgemeines

Peptide repräsentieren eine sehr große und komplexe Gruppe von Biomolekülen, die in allen Lebensbereichen von Organismen eine wichtige Rolle spielen. Sie können als Hormone, Neurotransmitter und Koenzyme agieren oder als dem Organismus von außen zugeführte Enzyminhibitoren, Drogen, Toxine und Antibiotika wirken.

Aufgrund der 20 genetisch codierten Aminosäuren und der Bildung von Peptidbindungen untereinander gibt es eine unendliche Vielzahl von natürlichen und auch synthetischen Peptiden. Abhängig von der Zahl, der Folge und der räumlichen Anordnung der verknüpften Aminosäuren unterscheiden sich die Peptide in ihrer Größe, Masse, Wasserlöslichkeit, Bindungsstärke und elektrischen Ladung.

Diese Eigenschaften erlauben eine kapillarelektrophoretische Trennung aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität, ihrer Ladung, ihrer Wasserlös- bzw. -unlöslichkeit und aufgrund bestimmter Interaktionen mit anderen Biomolekülen [75, 16, 14].

Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Peptides ist eine komplexe Funktion seiner Eigenschaften, wie Ladung, Größe und Struktur, der Eigenschaften des Mediums, wie pH-Wert und Temperatur und der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Elektrolyt.

Peptide sind amphotere Substanzen, die mehrere verschiedene Typen ionogener Gruppen besitzen, wie z.B. die Carboxylgruppen am C-terminalen Ende des Peptides, die Seitenketten von Asparagin- und Glutaminsäure und die Aminogruppen am N-terminalen Ende des Peptides. Die effektive Ladung des Peptids ergibt sich demzufolge aus der Summe seiner ionogenen Gruppen.

Bei der Trennung von Peptiden müssen deren spezifische Eigenschaften berücksichtigt werden. In erster Linie spielt ihr amphoterer Charakter eine Rolle. Je nach pH-Wert und abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt können Peptide als Kationen oder Anionen getrennt werden. Als weiterer wichtiger Punkt muss die Tendenz längerer Peptide und Proteine berücksichtigt werden, an der Kapillarwand zu adsorbieren. Dadurch kann es zu starkem Tailing der Peaks oder zu einer Verlängerung der Migrationszeiten von Lauf zu Lauf kommen [47].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Art der Wechselwirkung zu unterbinden. Zum einen kann die Trennung in einem stark sauren Bereich durchgeführt werden, in dem die Dissoziation der Silanolgruppen verhindert wird, oder die Trennung wird im basischen

Bereich durchgeführt. Dabei muss der pH-Wert aber mindestens zwei Einheiten über dem isoelektrischen Punkt des Polypeptids oder Proteins liegen. Ist das der Fall, kommt es zur Abstoßung zwischen den negativ geladenen Silanolgruppen und dem negativ geladenen Peptid. Grenzen sind hier allerdings durch die Instabilität der meisten Peptide in stark saurer oder basischer Lösung gesetzt. Weitere Möglichkeiten sind das dynamische oder permanente „Coating“ der Kapillare, auf die aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Aufgrund der relativ starken Absorption der Peptidbindung im UV-Bereich bei niedrigen Wellenlängen wird die UV-Detektion zwischen 200 nm und 220 nm sehr häufig zur Peptidanalytik angewendet. Dabei wurde festgestellt, dass die Absorption der Peptide in diesem Bereich etwas über die Quantität der Peptidbindungen aussagt. Je länger ein Peptid ist und je mehr Peptidbindungen es besitzt, desto stärker ist seine Absorption im Vergleich zu einem kürzeren Peptid bei gleicher Konzentration [3].

Genauere Einzelheiten über die Qualität und Quantität der getrennten Peptide und die Bestätigung über die Peakhomogenität und -identität lassen sich über die Detektion mit dem Photodiodenarraydetektor (PDA) erfahren [116].

Bei einer spezifischen sauren oder enzymatischen Hydrolyse von Proteinen entstehen sehr viele Peptidbruchstücke. Die Aufzeichnung dieser Bruchstücke wird „Peptide mapping“ genannt und liefert bei kontinuierlicher Probenahme und Aufarbeitung Aussagen über die laufende Reaktion [84, 115]. Auch in diesem Teilbereich lässt sich die Kapillarelektrophorese als gute Analyseverfahren einsetzen.

7.2 Trennung von vier in der Zusammensetzung sehr ähnlichen Peptiden

Je nach Aufbau eines Proteins und je nach Spezifität des Abbaus, kann es besonders bei der enzymatischen Hydrolyse dazu kommen, dass sehr ähnliche Peptidbruchstücke in der Lösung vorhanden sind. Sie gleichen sich in ihrer Struktur, ihrem räumlichen Aufbau oder ihrer Masse.

Um die Möglichkeiten der Kapillarelektrophorese in diesem Bereich zu untersuchen, werden vier Peptide eingesetzt. Dabei handelt es sich um Peptide, die nur die beiden Aminosäuren Glycin und Phenylalanin enthalten, die in unterschiedlicher Anzahl und Verknüpfungsreihenfolge vorliegen. Es sind Phe-Gly-Gly ($M=279,3$ g/mol), Gly-Phe-Phe ($M=369,4$ g/mol), Phe-Gly-Phe-Gly ($M=426,5$ g/mol) und Phe-Gly-Gly-Phe ($M=426,5$ g/mol). Die beiden Tetrapeptide haben die gleiche Molmasse.

Die Trennung der vier Peptide wird in unbeschichteten fused silica Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 μm und zwei verschiedenen Längen (28 cm und 60 cm) durchgeführt.

Die ersten Messungen finden aufgrund der größeren Bodenzahl in der 60 cm langen Kapillare statt. Durch Variation der Pufferkonzentration und des pH-Werts kann eine Trennung der vier Peptide erreicht werden, wobei je nach pH-Wert das Phe-Gly-Phe-Gly und das Phe-Gly-Gly-Phe oder das Phe-Gly-Gly und das Gly-Phe-Phe nicht bis zur Grundlinie getrennt werden konnten.

In der folgenden Graphik (Abb. 7.1) sind einige Trennversuche bei verschiedenen Pufferzusammensetzungen, pH-Werten und Spannungen zusammengestellt.

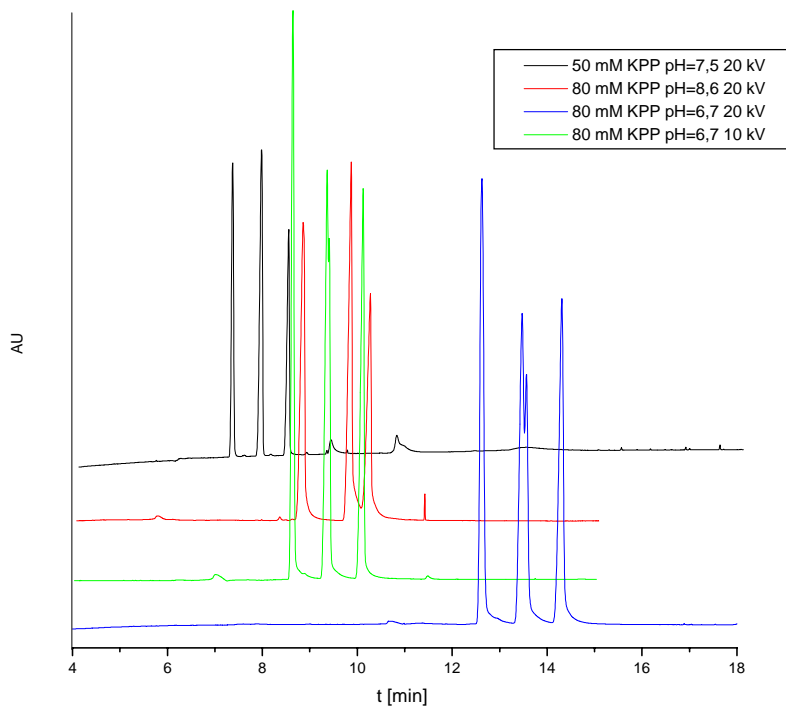


Abb. 7.1: Trennung der vier Peptide bei verschiedenen Pufferkonzentrationen, pH-Werten und Spannungen
Spannung: 10-20 kV; T=25°C; Kapillare: 75 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 50-80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,7-8,6; Probe: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je Peptid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; Detektion: UV 214 nm

In den beiden Elektropherogrammen, die bei pH-Werten von 8,6 bzw. 7,5 aufgenommen werden, findet zwischen Phe-Gly-Phe-Gly und Phe-Gly-Gly-Phe keine Trennung statt. Bei einer Pufferkonzentration von 80 mM, einem pH-Wert von 6,7 und einer Spannung von 20 kV ist eine Trennung der beiden mittleren Peaks zu erahnen, die sich in der Aufnahme

des Elektropherogramms bei nur 10 kV bestätigt. Da sich dadurch aber die Analysenzeit verlängert, werden weitere Variationen des pH-Werts durchgeführt.

Der pH-Wert wird dabei jeweils um 0,1 Einheiten erniedrigt. Es werden weitere Spektren bei pH-Werten von 6,5 und 6,4 und dem 80 mM KPP-Puffer aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

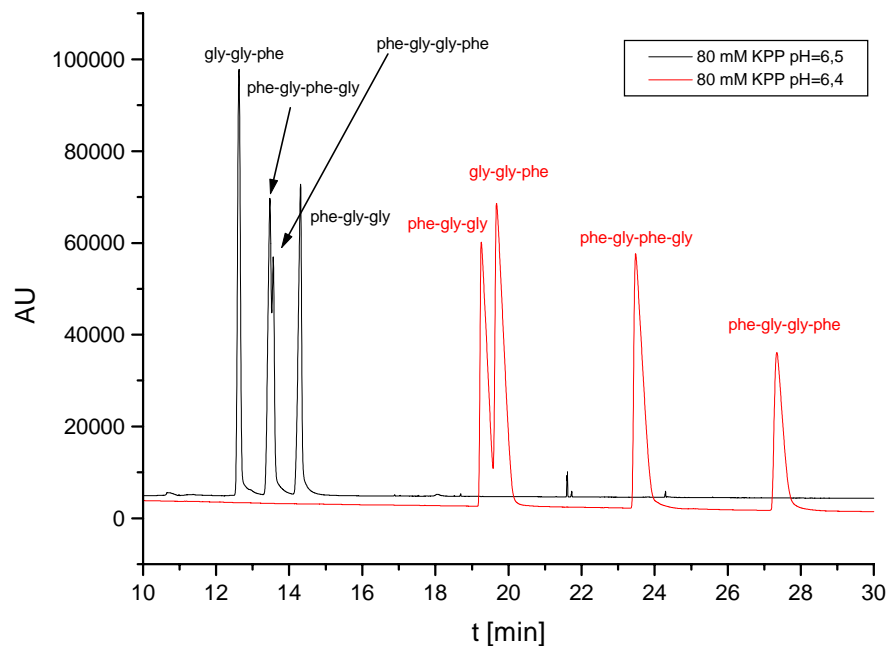


Abb. 7.2: Trennung der vier Peptide bei verschiedenen pH-Werten

Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 75 μ m x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,4-6,5; Probe: 100 μ g/mL je Peptid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; Detektion: UV 214 nm

Die Erniedrigung des pH-Werts um ein Zehntel beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit des Phe-Gly-Gly sehr stark. Bei einem pH-Wert von 6,5 migriert es an letzter Stelle, bei einem pH-Wert von 6,4 hat es sich bis auf die erste Position vorgeschoben. Des Weiteren ist zu bemerken, dass bei einem pH-Wert von 6,5 die Trennung von Phe-Gly-Gly-Phe und Phe-Gly-Phe-Gly nur ansatzweise erreicht wird, aber eine klare Trennung zwischen diesem „Doppelpeak“ und den beiden Tripeptiden möglich ist. Bei einem pH-Wert von 6,4 bietet sich das gegenteilige Bild, hier besteht eine klare Trennung zwischen den beiden Tetrapeptiden, während die beiden Tripeptide nicht bis ganz auf die Grundlinie getrennt werden können.

Die Trennung bei einem pH-Wert von 6,4 dauert ungefähr doppelt so lange wie die bei einem pH-Wert von 6,5.

Wird eines der Peptide für weiter Untersuchungen benötigt und muss deswegen isoliert werden, ist aufgrund der sehr unterschiedlichen Migrationszeiten der Peptide bei verschiedenen pH-Werten eine fraktionierte Sammlung möglich. Soll eines der beiden Tripeptide gesammelt werden, bietet sich die Trennung bei einem pH-Wert von 6,5 an, soll eines von den Tetrapeptiden isoliert werden, sollte die Trennung bei pH 6,4 durchgeführt werden.

7.3 Kalibration eines Peptids über die Peakfläche

Um den Einfluss der Konzentration eines der Peptide auf die anderen drei zu untersuchen, wird eines in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, so dass auch gleich eine Kalibrationsgerade mit aufgenommen werden kann. Es wird die Methode mit einem 80 mM KPP-Puffer und einem pH-Wert von 6,5 gewählt. Die Konzentrationen von Phe-Gly-Gly werden in einem Bereich von 0,05 mg/mL bis 5 mg/mL variiert und damit ein sehr großer Konzentrationsbereich abgedeckt. Die anderen Peptide werden immer in der gleichen Konzentration (0,5 mg/mL) eingesetzt. Das Ergebnis der Kalibration wird in Abb. 7.3 dargestellt.

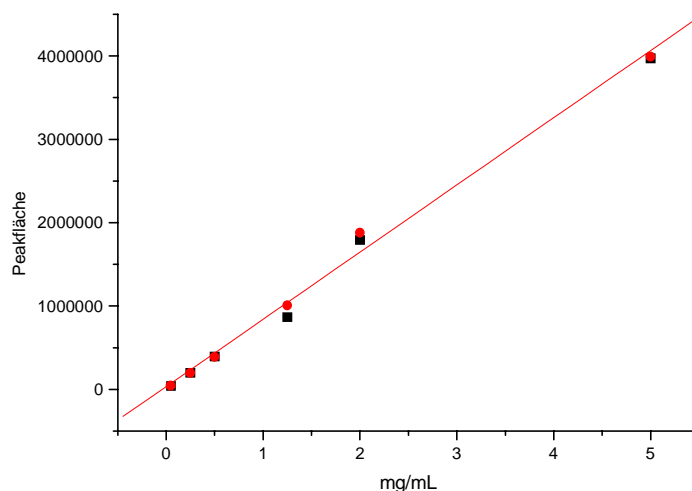


Abb. 7.3: Aufnahme einer Kalibrationsgeraden mit verschiedenen Konzentrationen an Phe-Gly-Gly; Doppelbestimmung

Die Peakflächen des Phe-Gly-Gly wachsen proportional mit den eingesetzten Mengen Peptid und es ergibt sich eine Kalibrationsgerade mit einem Regressionskoeffizienten $r^2=0,99751$. Die Peakflächen der anderen Signale werden durch die Variation des Tripeptids nicht beeinflusst, und die Qualität der Trennung bleibt erhalten.

7.4 Verkürzung der Analysenzeiten

Da eine Analyse der Peptide je nach Methode 15 bis 30 Minuten dauert, wird eine kürzere Kapillare (30 cm) mit dem gleichen Innendurchmesser (75 μm) zur Verringerung der Trenndauer eingesetzt. Das Ergebnis der Trennung mit einem 80 mM KPP-Puffer bei pH 6,5 ist in Abb. 7.4 dargestellt.

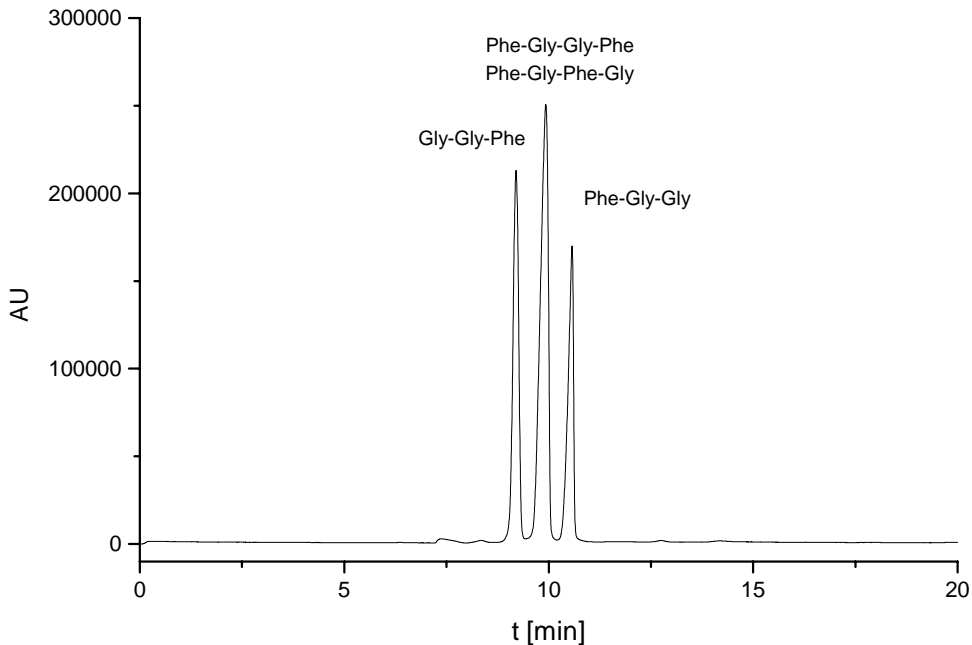


Abb. 7.4: Trennung der vier Peptide in einer 30 cm langen Kapillare
Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare 75 μm x 30 cm fused silica; 5 s Druckinjektion;
CE-Puffer: 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5; Probe: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je Peptid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; Detektion: UV 214 nm

In der kürzeren Kapillare ist die Trennung zwar nach 12 Minuten beendet, aber es ist nicht möglich, Peaks aller vier Peptide zu erhalten. Entweder komigrieren wie im oberen Beispiel die Tetrapeptide oder die Tripeptide. Außerdem liegen die Migrationszeiten der Peptide näher beieinander, so dass auch eine fraktionierte Sammlung eines Peptids schwieriger ist.

Auch mit anderen Puffersystemen und anderen pH-Werten kann keine vollständige Auftrennung der vier Peptide erreicht werden.

Als weitere Puffer wurden basischer Boratpuffer, neutraler Kaliumphosphatpuffer (50 mM), Citratpuffer mit Zusätzen von Urea und HPMC sowie Kaliumphosphatpuffer mit SDS-Zusatz eingesetzt. Da sie aber alle unbefriedigende bis schlechte Ergebnisse lieferten, wird hier nicht weiter auf sie eingegangen.

7.5 Trennung eines Gemisches aus Peptiden und Proteinen

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen von Peptiden werden Trennversuche zwischen Proteinen und Peptiden durchgeführt. Als Proteinstandards werden hier α -Lactalbumin mit einer Molmasse von 14400 g/mol und Bovine Serum Albumin (BSA) mit einer Molmasse von ca. 65700 g/mol eingesetzt. Die Peptide sind L-Leu-Gly-Gly ($M=245,28$ g/mol), Triglycin ($M=189,17$ g/mol), Gly-Tyr ($M=238,25$ g/mol) und Gly-L-Leu ($M=188,23$ g/mol). Die Trennung wird in einer fused silica Kapillare durchgeführt. Die Kapillare hat eine Länge von 60 cm und einen Innendurchmesser von 50 μm . Der eingesetzte Elektrolyt ist 80 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2, um Wechselwirkungen der Proteine mit der Kapillarwand zu verhindern (s. Kap. 3.3). Bei der Trennung des Gemischs in der fused silica Kapillare können nur die vier Peptide detektiert werden. Die beiden Proteine sind in dem Zeitraum, über den an die Kapillare Spannung angelegt wird, nicht bis zum Detektorfenster gewandert, sondern werden erst im nachfolgenden Spülschritt mit 0,1 molarer Natronlauge von der Kapillare entfernt. Die vier Peptide lassen sich gut trennen. In der nachfolgenden Abbildung 7.5 liegen alle Peptide in dem Gemisch in ungefähr der gleichen Konzentration (ca. 10 μM) vor.

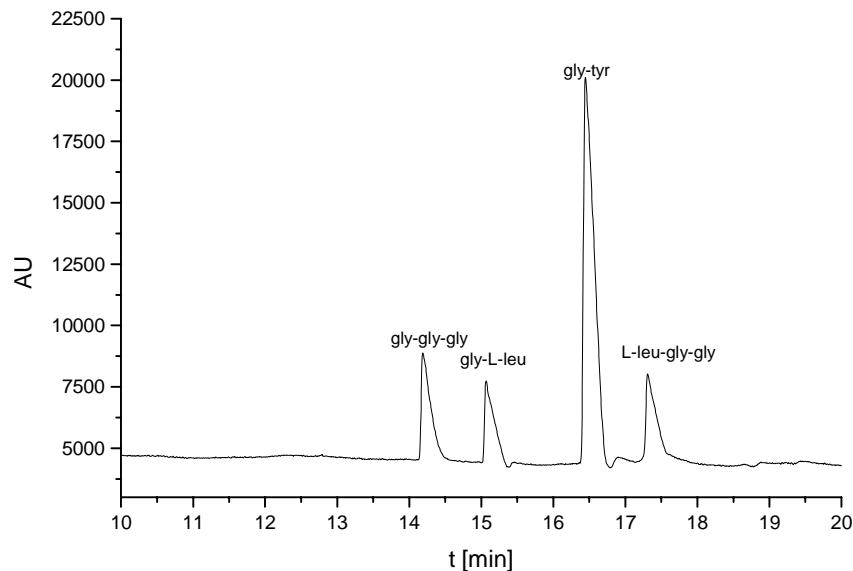


Abb. 7.5: Trennung von vier Peptiden und zwei Proteinen

Spannung: 16 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2; Proben: 3 mg/mL BSA; 3 mg/mL α -Lactalbumin, 2,27 mg/mL L-Leu-Gly-Gly, 1,89 mg/mL Gly-Gly-Gly, 2,38 mg/mL Gly-Tyr, 1,88 mg/mL Gly-Leu in 0,2 N Salzsäure; Detektion: UV 214 nm

Dass das Signal des Glycintyrosins wesentlich höher als das der anderen drei Peptide ist, lässt sich durch den vorhandenen aromatischen Ring erklären. Aber auch die anderen Peptide lassen sich aufgrund ihrer Peptidbindungen bei der eingestellten Wellenlänge von 214 nm detektieren. Die Zuordnung der Peaks findet wiederum durch das Spiken mit den einzelnen Probenbestandteilen statt.

Aufgrund der trotz des stark sauren Puffers vorhandenen Wechselwirkungen der Proteine mit der Kapillarwand ist keine Trennung in der fused silica Säule möglich, ohne dass diese zuvor modifiziert wird. Da die Modifizierung einer Kapillare, im speziellen eine Beschichtung mit geeigneten Chemikalien, z.B. Polyacrylamid, nicht immer reproduzierbar gehandhabt werden kann, wurde die Trennung des selben Gemischs in einer käuflichen neutralen Kapillare durchgeführt. Neutrale Kapillaren sind mit Polyacrylamid beschichtet und besitzen dadurch eine hydrophile Oberfläche. Die Adsorption der Proteine an die Kapillarenwand wird somit weitgehend verhindert. Diese Kapillare ist nur in einer Länge von 38 cm bei der Firma Beckman-Coulter zu erhalten, so dass die Trennung, die vorher in einer 60 cm langen Kapillare stattgefunden hat, jetzt in einer um ca. 40% kürzeren Kapillare ablaufen muss. Der Innendurchmesser beträgt wie zuvor 50 μm . Die Trennung wird mit einem 20 mM Citratpuffer bei einem pH-Wert von 3 durchgeführt. Im Vergleich zum vorherigen Puffersystem ist dieser Puffer schwächer konzentriert, besitzt aber einen höheren pH-Wert und verbessert dadurch die Stabilität der Proteine. In der nächsten Graphik (Abb. 7.6) wird das erhaltene Elektropherogramm dargestellt.

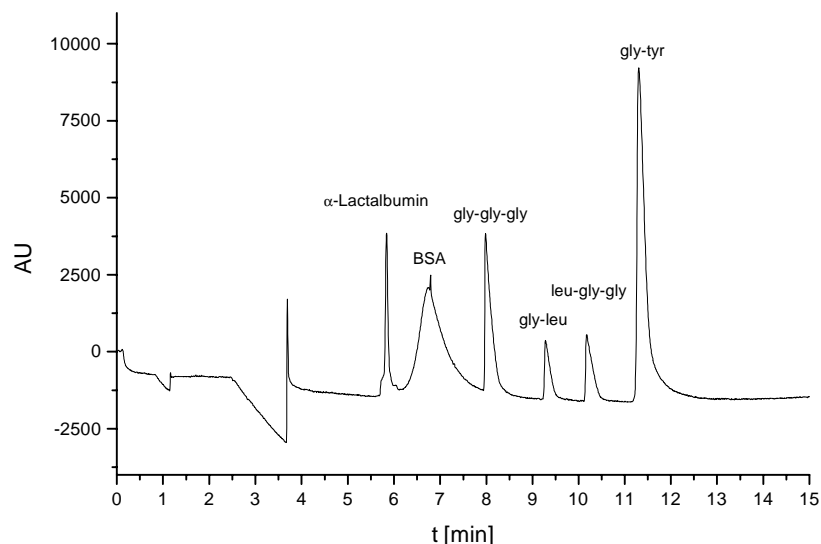


Abb. 7.6: Trennung von vier Peptiden und zwei Proteinen

Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 38 cm neutrale Kapillare; CE-Puffer: 20 mM Citratpuffer pH 3; Proben: 3 mg/mL BSA; 3 mg/mL α -Lactalbumin, 2,27 mg/mL L-Leu-Gly-Gly, 1,89 mg/mL Gly-Gly-Gly, 2,38 mg/mL Gly-Tyr, 1,88 mg/mL Gly-Leu in 0,2 N Salzsäure, Detektion: UV 214 nm

Es findet eine vollständige Auftrennung der sechs Probenbestandteile statt, wobei der BSA-Peak sehr breit ist. Dies lässt entweder auf doch vorhandene Wechselwirkungen mit der Kapillarwand schließen oder auf einen Zerfall des Produkts. In weiteren Messungen wird deutlich, dass sich das BSA nach mehreren Messungen zersetzt.

Bei dem Vergleich der beiden Elektropherogramme fällt auf, dass Gly-Tyr und L-Leu-Gly-Gly ihren Platz getauscht haben. Das lässt sich darauf zurückführen, dass die Wechselwirkungen der Peptide mit der Kapillarwand unterschiedlich sind.

7.6 Kapillarelektrophoretische Beobachtung des enzymatischen Abbaus von Kartoffelprotein

In einem Projekt mit der Amino GmbH und der Technischen Universität Hamburg-Harburg wird die Hydrolyse von Kartoffelproteinen, die meist unter sauren Bedingungen abläuft, mit verschiedenen Enzymen untersucht. Ziel ist zum einen, ein umweltfreundlicheres Verfahren als die saure Hydrolyse zu entwickeln und zum anderen, neue, eventuell wirtschaftlich relevante Zwischenprodukte zu finden.

In einem Reaktor werden 12 g Kartoffelprotein in 200 mL bidestilliertem Wasser bei 45°C vorgelegt, der pH-Wert auf 9 eingeregelt und die Reaktion mit dem Enzym Savinase gestartet. Das Substrat-/Enzym-Verhältnis beträgt 100:1. Bei der Hydrolyse wird das Kartoffelprotein über mehrere Tage bis zu den einzelnen Aminosäuren abgebaut. In verschieden großen Zeitabständen werden aus dem Reaktor Proben gezogen, die dann kapillarelektrophoretisch betrachtet werden.

Die Analyse findet wiederum in der neutralen Kapillare statt, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen, Peptidbruchstücken und Kapillarwand möglichst zu unterbinden.

Die Proben werden vor der Injektion in die Kapillare abzentrifugiert und durch einen 0,2 µm Filter gegeben, um alle noch vorhandenen Schwebstoffe (noch nicht abgebautes Protein) zu entfernen. Außerdem werden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 0,2 N Salzsäure angesäuert, um die vorhandenen Substanzen in ihrer kationischen Form vorliegen zu haben und gleichzeitig die Konzentration der Probenbestandteile zu verringern.

Zu Beginn des Abbaus sollten noch einige große Bruchstücke des Proteins vorhanden sein, die mit laufender Hydrolysedauer immer kleiner und weniger werden sollten. Ist der Abbau abgeschlossen, sollten im Elektropherogramm kaum noch Signale vorhanden sein, da alle Aminosäuren außer Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan nicht UV-absorbierend sind. In den nächsten Abbildungen (Abb. 7.7 a-d) sind exemplarisch einige Elektropherogramme dargestellt.

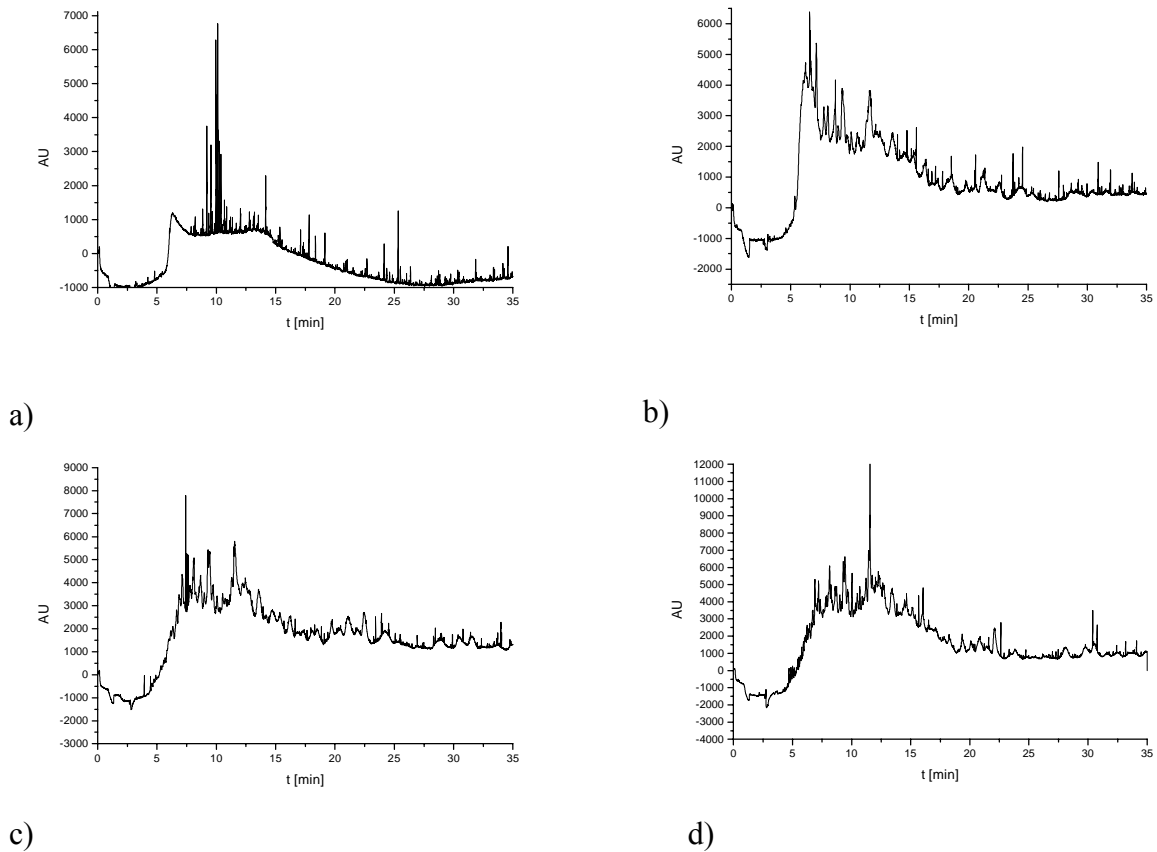


Abb. 7.7 a-d: Abbau des Kartoffelproteins mit dem Enzym Savinase zu verschiedenen Zeitpunkten (von oben links nach unten rechts nach 2,5 h; 5,5 h; 23 h, 35 h)
 Spannung: 20 kV; Temperatur: 20°C; Kapillare: 50 μm x 38 cm neutrale Kapillare; CE-Puffer: 20 mM Citratpuffer pH 3; Probe: Überstände des Abbaus von Kartoffelprotein mit Savinase in 0,2 N Salzsäure

In dem ersten Elektropherogramm (Abb. 7.7 a) sind deutlich erkennbare Peaks vorhanden. Die Grundlinie weist nur geringe Schwankungen auf. Bei den Untersuchungen in Kapitel 7.5 werden zunächst die beiden Proteine und erst im weiteren Verlauf die Peptide detektiert. Hier lässt sich dieselbe Beobachtung machen. Zu Beginn der Hydrolyse sind noch relativ große Proteinbruchstücke vorhanden, die dann in Abb. 7.7 a bei ca. 8-12 Minuten auftauchen, dahinter folgen die kleineren Bruchstücke. In den folgenden Elektropherogrammen (Abb. 7 b-d) sinkt die Anzahl der großen Peaks, die kleineren Signale nehmen zu und verschieben sich nach hinten. Die starken Schwankungen bzw. das starke Ansteigen der Grundlinie in den drei Elektropherogrammen (Abb. 7.7 a-d) lässt sich wahrscheinlich durch die große Konzentration an Peptiden erklären. Die Signale können aufgrund ihrer Vielzahl und ihrer dichten Folge nicht mehr annähernd grundliniengetrengt werden. Auch ist in den Elektropherogrammen erkennbar, dass der Abbau des Proteins nach 35 Stunden noch nicht beendet ist.

Aufgrund der erhaltenen Elektropherogramme lassen sich weder qualitative noch quantitative Aussagen machen, noch lässt sich ein Protein oder Peptid fraktioniert sammeln, da sie

zu dicht aufeinander folgen. Verbesserung könnten durch eine längere Kapillare oder durch mehrdimensionale Aufarbeitung der Proben erzielt werden, beispielsweise durch eine zweidimensionale Kombination von RP-HPLC und CZE zur Analyse des tryptischen Abbaus von tPA [128] oder zur Detektion der Phosphorylierung von menschlichem Pepsinogen [41]. Als dreidimensionales Beispiel sei hier die Kopplung von RP-HPLC, CZE und MS genannt, die zur kompletten Auftrennung und Identifikation der tryptischen Peptide der Ribonuklease B in 15 Minuten geeignet ist [64].

8 Analytik für den Gewebeplasminogen-Aktivator (tPA)

Am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover wird mit Hilfe von Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen der Gewebeplasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator, tPA) hergestellt. Zur Überwachung der Kultivierung und der produzierten Menge tPA werden verschiedene Analysemethoden eingesetzt [83], unter anderem die High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography (HPMAC), eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und on-line Fluoreszenzmessungen. Als Referenzmethode dient der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)-Test. Da dieser Test zeitaufwendig ist, wird mit der Kapillarelektrophorese eine einfachere, schnellere und automatisierbare Methode zur tPA-Analytik im Vergleich mit dem ELISA entwickelt.

8.1 Grundlagen zum Gewebeplasminogen-Aktivator

Der Gewebeplasminogen-Aktivator ist ein körpereigenes Protein, das bei der Auflösung von Blutgerinnseln eine wichtige Rolle spielt. Kleine Blutgerinnsel können sich aufgrund einer ganzen Reihe von Faktoren bilden. Werden sie vom Ort ihrer Entstehung in den Blutstrom gespült, können sie feinere Blutkapillaren verstopfen und dadurch die Versorgung wichtiger Organbereiche mit Blut und damit Sauerstoff unterbinden. Im schlimmsten Fall folgen daraus Herzinfarkt, Lungenembolie oder Hirnschlag, dabei kommt es ganz entscheidend auf die Zeitdauer an, während der die betroffenen Organe nicht mit Sauerstoff versorgt werden. Die zur Verstopfung führenden Gerinnsel müssen also schnellstmöglich aufgelöst werden.

Hier bietet sich mit dem tPA ein Protein an, das vom Körper selbst im Lauf der Evolution auf diese Fähigkeit hin optimiert worden ist. Die Aufgabe des tPA besteht darin, aus dem Vorläufer Plasminogen das Plasmin zu aktivieren. Plasmin wiederum spaltet das bei der Blutgerinnung entstehende Fibrin in lösliche Produkte und löst dadurch Blutgerinnsel auf.

Der Wirkstoff tPA ist seit 1987 auf dem Markt, seitdem wird großtechnisch tPA mit rekombinanten CHO-Zellkulturen produziert, die ein human-identisch glykosyliertes tPA exprimieren [2].

In klinischen Studien konnte man zeigen, dass tPA Vorteile gegenüber anderen Medikamenten besitzt, die prinzipiell die gleiche Wirkung haben. Es hat sich deshalb am Markt durchgesetzt.

1995 wurde weltweit rekombinantes tPA im Wert von ca. 300 Millionen US-Dollar verkauft, daher ist tPA eines der intensivst untersuchten Proteine [93].

tPA besteht aus 527 Aminosäuren (Abb. 8.1) mit einem Molekulargewicht von 59,05 kDa ohne Berücksichtigung der Kohlenhydratseitenketten und 68 kDa mit drei Zuckerresten. Natürlicherweise kommen zwei Hauptformen des tPA vor, die sich nur in der Art der Asn 184-Glykolisierung unterscheiden und chromatographisch voneinander getrennt werden können [80]:

- Typ I: endständige Aminosäuren Asn 117, Asn 184 und Asn 448 sind N-glykosidisch mit Oligosacchariden verbunden.
- Typ II: endständige Aminosäuren Asn 117 und Asn 448 sind N-glykosidisch mit Oligosacchariden verknüpft.

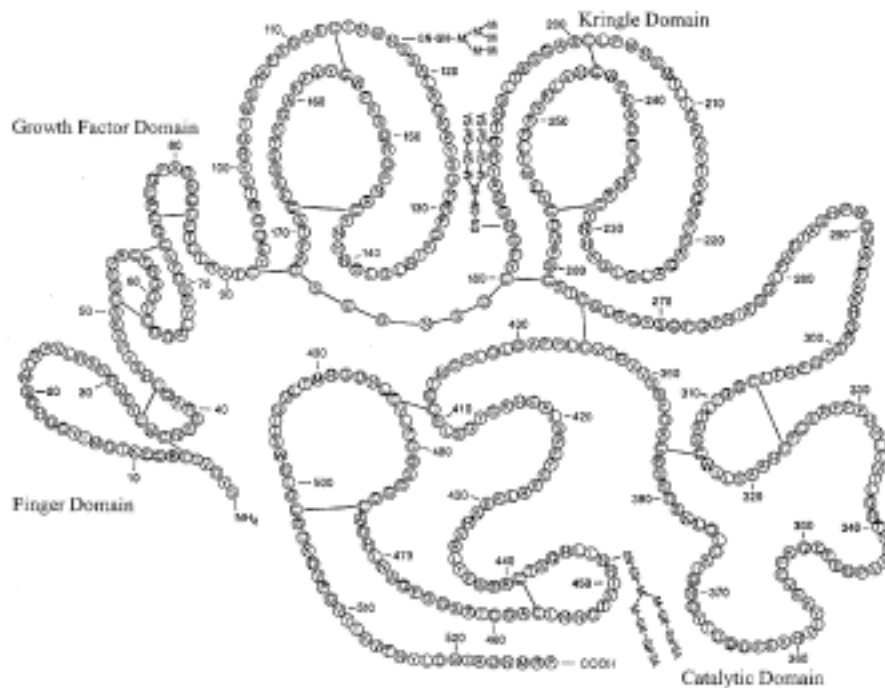


Abb. 8.1: Primärstruktur von tPA

Die räumliche Faltung des Proteinmoleküls wird durch die Aminosäuresequenzen und durch 17 strukturbestimmende Disulfidbrücken zwischen 34 verschieden positionierten Cystein-Aminosäuren bestimmt.

Aufgrund seiner Größe sollte es sich problemlos kapillarelektrophoretisch erfassen lassen.

8.2 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen des Gewebeplasminogen-Aktivators

8.2.1 Untersuchungen von tPA-Standards in wässrigem Medium

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den untersuchten Proben um Standards handelt, wird davon ausgegangen, dass im Elektropherogramm im optimalen Fall nur ein Signal auftritt. Bei Verunreinigung der Standards kann es zu weiteren kleinen Peaks kommen. Die Konzentrationen der Standards liegen zwischen 0 $\mu\text{g/mL}$ und 100 $\mu\text{g/mL}$, die bei der Produktion entstehenden liegen bei bis zu 20 $\mu\text{g/mL}$.

Da keine Trennleistung von verschiedenen Substraten erforderlich ist, wird eine möglichst kurze fused silica Kapillare (27 cm, 50 μm ID) gewählt, um die Analysezeiten gering zu halten. Zur höheren Genauigkeit werden Doppelbestimmungen zu jeder Konzentration durchgeführt. Als Puffersystem wird 80 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) mit pH 2 eingesetzt.

In Abbildung 8.2 sind die Elektropherogramme von drei verschiedenen tPA-Konzentrationen dargestellt.

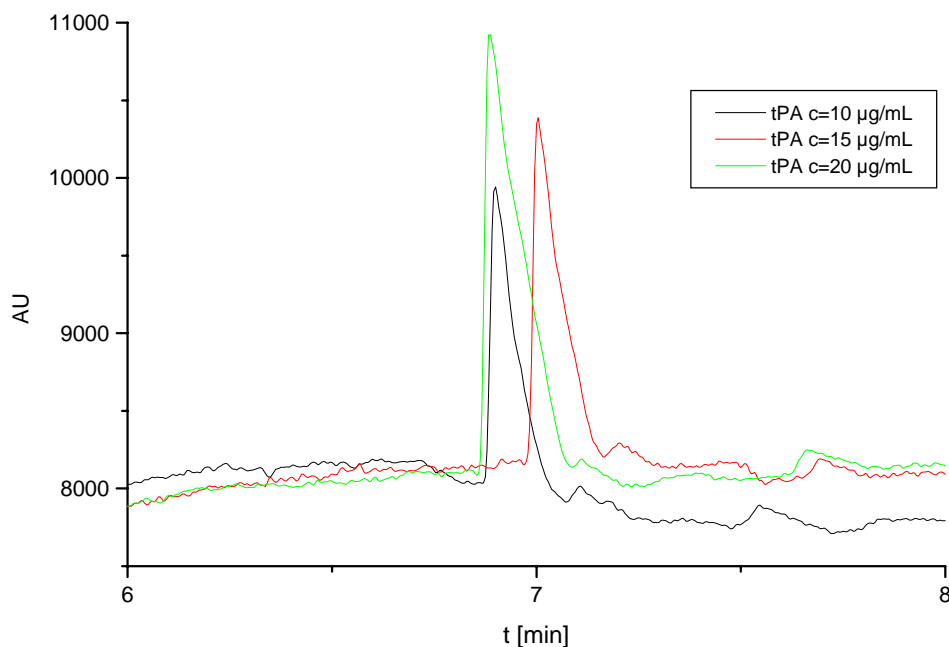


Abb. 8.2: Elektropherogramme verschiedener tPA-Konzentrationen
Stromstärke: 120 μA ; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2; Probe: tPA in bidest.; Detektion: UV 214 nm

Durch Auftragung der Peakflächen gegen die Konzentrationen ergibt sich Abbildung 8.3:

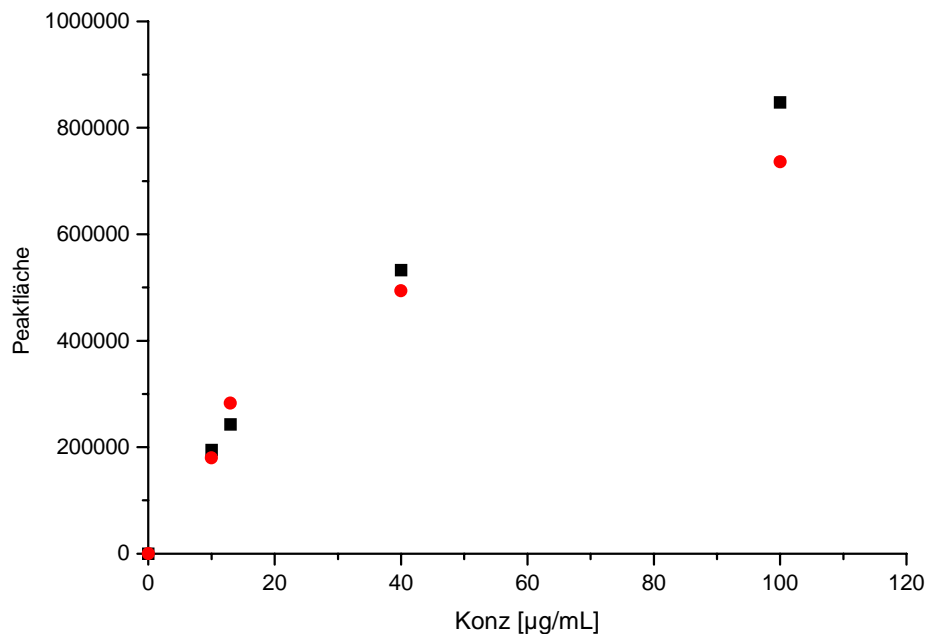


Abb. 8.3: Auftragung der Peakflächen gegen die Standardkonzentrationen des tPA in wässriger Lösung; Doppelbestimmung

Es ist deutlich erkennbar, dass die Signalflächen bei den geringeren Konzentrationen linear ansteigen, bei höheren Konzentrationen allerdings abflachen und sich einem Grenzwert nähern. Des weiteren ist erkennbar, dass die Doppelbestimmungen mit zunehmender Konzentration des tPA stärker voneinander abweichen. Das kann durch eine Überladung der Kapillare zustande kommen, die, wie schon in der Theorie (Kap. 3.3) beschrieben, zu einer Bandenverbreiterung führt und dann ungenaue oder falsche Messdaten liefert.

Da die in einer Kultivierung erreichten Mengen an tPA die 20 µg/mL Grenze nicht überschreiten, wird in diesem Bereich eine weitere Kalibration mit tPA-Standards in wässriger Lösung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Kalibration ist in Abb. 8.4 dargestellt.

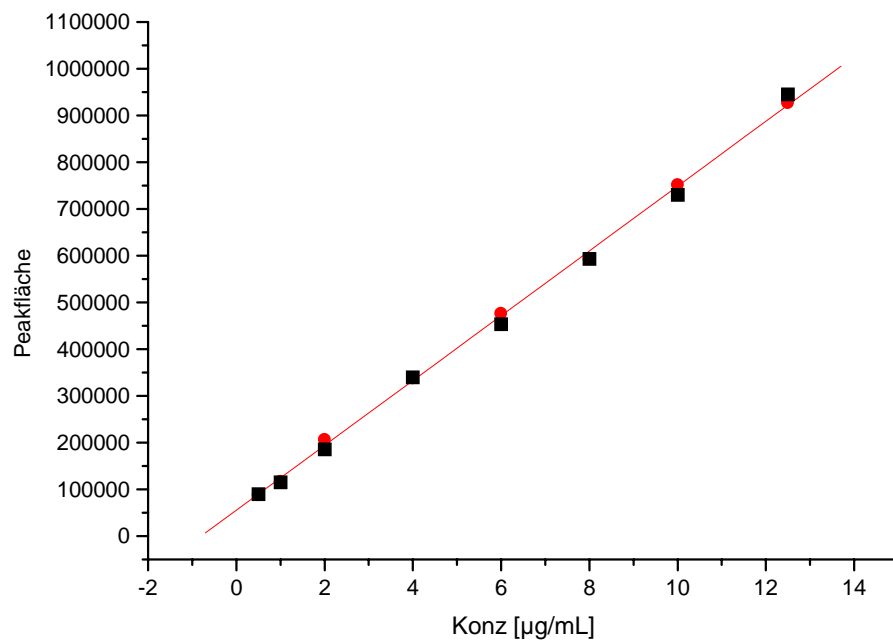


Abb. 8.4: Messdaten einer Kalibration von tPA in wässrigem Medium; Doppelbestimmung

In diesem Fall stimmen die Doppelbestimmungen sehr gut überein, und eine Kalibration kann durchgeführt werden. Die Kalibrationsgerade hat dabei einen Regressionskoeffizienten von $r^2=0,99953$. Aufgrund dieser guten Ergebnisse wird im nächsten Schritt der Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Aufnahme der Elektropherogramme untersucht.

8.2.2 Untersuchung von tPA-Standards in Kultivierungsmedium

Für die Analytik der tPA-Standards in Medium werden sowohl Kapillarabmessungen (27 cm, 50 µm ID) als auch die Pufferzusammensetzung (80 mM KPP, pH 2) beibehalten. Die Peakflächen von Standards mit Konzentrationen zwischen 1,5 µg/mL und 25 µg/mL werden ermittelt und gegen die Konzentrationen aufgetragen. Es ergibt sich folgender Zusammenhang (Abb. 8.5):

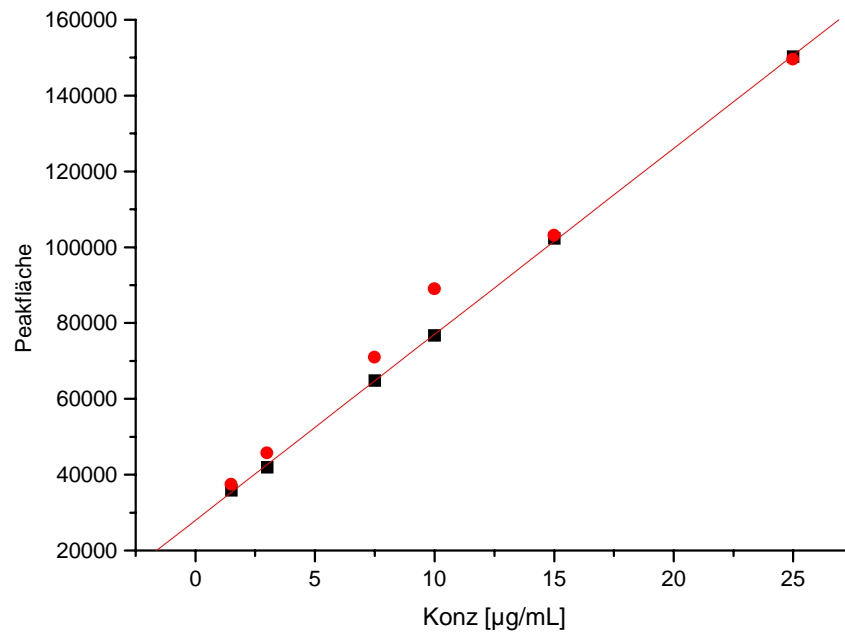


Abb. 8.5: Auftragung der Peakflächen gegen die tPA-Standardkonzentrationen in Kultivierungsmedium; Doppelbestimmung

Auch hier ergibt sich aus der Auftragung eine Gerade, die einen Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,9991$ hat und somit als Kalibrationsgerade genutzt werden kann.

Da die Kalibration mit der angewandten Methode sowohl in wässriger Lösung als auch im Medium problemlos durchführbar ist und eine hohe Genauigkeit aufweist, findet im nächsten Kapitel ein Vergleich der kapillarelektrophoretischen Messungen mit dem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) statt.

8.2.3 Vergleich der ermittelten Kapillarelektrophoresedaten mit den Daten der Referenzmethode ELISA

Zur Bestimmung des in den Kultivierungsproben enthaltenen tPA wird zunächst eine Kalibration über die Peakflächen in dem erwarteten Konzentrationsbereich durchgeführt. Im direkten Anschluss daran werden die Proben vermessen und auch deren Peakflächen bestimmt. Vor der Messung werden die Proben zur Entfernung der Zellrückstände mit einem Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Über den Wert des Achsenabschnitts und die Steigung der Kalibrationsgeraden lassen sich die entsprechenden Konzentrationen errechnen. Die Proben und die Vergleichsdaten werden freundlicherweise von Renemann [83] zur Verfügung gestellt.

Die Darstellung der beiden Datenreihen findet in Abbildung 8.6 statt:

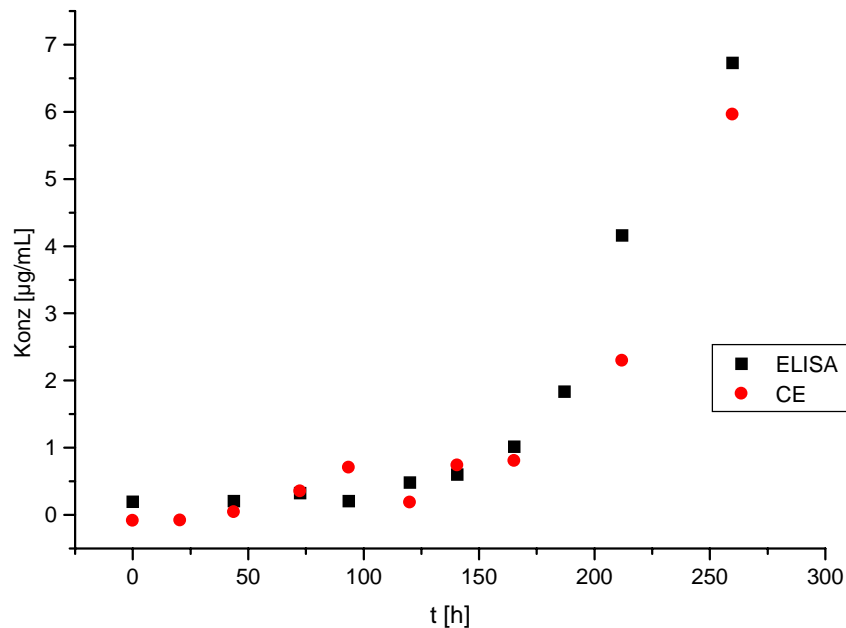


Abb. 8.6: Vergleich der mit ELISA und Kapillarelektrophorese erhaltenen Daten

Auf der x-Achse ist die Kultivierungsdauer in Stunden aufgetragen, auf der y-Achse die tPA-Konzentration. Die Werte stimmen nicht völlig überein, besitzen aber die gleiche Tendenz und die gleiche Größenordnung. Die größte prozentuale Abweichung liegt bei 93 Stunden. Dort beträgt sie 241%, wobei wahrscheinlich der kapillarelektrophoretisch ermittelte Wert um einiges zu hoch, der mit dem ELISA-Test erhaltene zu niedrig ist.

Generell nehmen die prozentualen Abweichungen mit höheren Konzentrationen ab und liegen ab der 100. Stunde zwischen 10 % und 25 %. Diese Tatsachen lassen sich durch die verschiedenen Funktionsweisen der beiden Methoden erklären.

Beim ELISA wird ein „Sandwich“ aus immobilisiertem Antikörper, Antigen (tPA) und enzymgelabeltem Antikörper geformt. Die Detektion erfolgt über die Farbveränderung, die sich aus der Umsetzung von ortho-Phenyldiamin durch das Enzym Peroxidase ergibt.

Bei der kapillarelektrophoretischen Bestimmung findet die Detektion des Antigens direkt über seine UV-Aktivität statt und nicht über Farbänderungen. Reaktionen finden in der Kapillare nicht statt, außer der möglichen Anlagerung des Antigens, was aber aufgrund der sehr guten Kalibrationen ausgeschlossen werden kann. Bei sehr geringen Konzentrationen des tPA ist nur mit kleinen Peakflächen zu rechnen, und je kleiner die Signale, desto geringer ist das Signal-Rausch Verhältnis. Das Rauschen der Grundlinie wird in Bezug auf die

geringere Peakfläche größer und somit die Signalbestimmung ungenauer. Um die Genauigkeit und die Sensitivität zu verbessern, müsste der Analyt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und dann mit laserinduzierter Fluoreszenz vermessen werden. Da aber eine im Vergleich zum ELISA schnellere Analytik entwickelt werden soll, wird darauf verzichtet.

9 Entwicklung einer Endostatinanalytik

9.1 Endostatin

Am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover wird mit einem gentechnisch veränderten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstamm rekombinantes, humanes Endostatin XVIII hergestellt [30].

Endostatin XVIII ist ein Angiogenesehemmer (Angiogenese = Blutgefäßneubildung) und soll als Humantherapeutikum bei der Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden.

Bis jetzt gibt es zwei bekannte Arten von Endostatin. Die schon weiter erforschte Form, das Endostatin XVIII (Abb. 9.1), hat eine Größe von ca. 20 kDa, ist ein C1-Fragment des Kollagen XVIII und zirkuliert im menschlichen Blutkreislauf. Es bindet mit seinen Histidin (1, 3, 11)-Resten und seinem Asparaginsäurerest 76 an ein Zn^{2+} -Atom; Mutationsanalysen haben gezeigt, dass gerade diese Fähigkeit des Endostatins essentiell für seine anti-angiogenetische Aktivität ist [134].

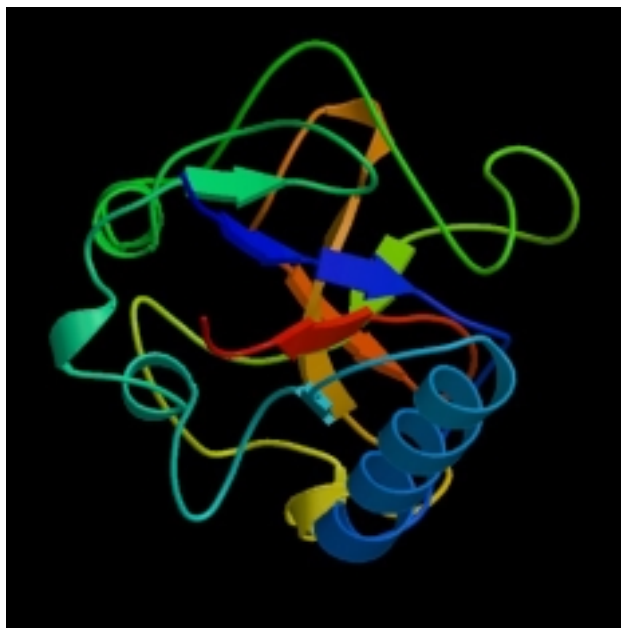


Abb. 9.1: Kristallstruktur des Endostatin XVIII aus der Röntgenstrukturanalyse in vereinfachter, spiralförmiger Darstellung [40]

Das zweite bekannte Endostatin ist das Endostatin XV, ein C1-Spaltprodukt des Kollagen XV. Das Endostatin XV bindet kein Zink, besitzt eine kristalline Struktur und unterscheidet sich auch in seinen Bindungseigenschaften und seiner Verteilung im Gewebe vom Endostatin XVIII [43, 92].

Sowohl Endostatin XV als auch XVIII verhindern die durch den basischen Fibroblast Wachstumsfaktor (FGF-2) oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) verursachte Angiogenese, aber es gibt starke Unterschiede in ihrer Wirkungsweise [43].

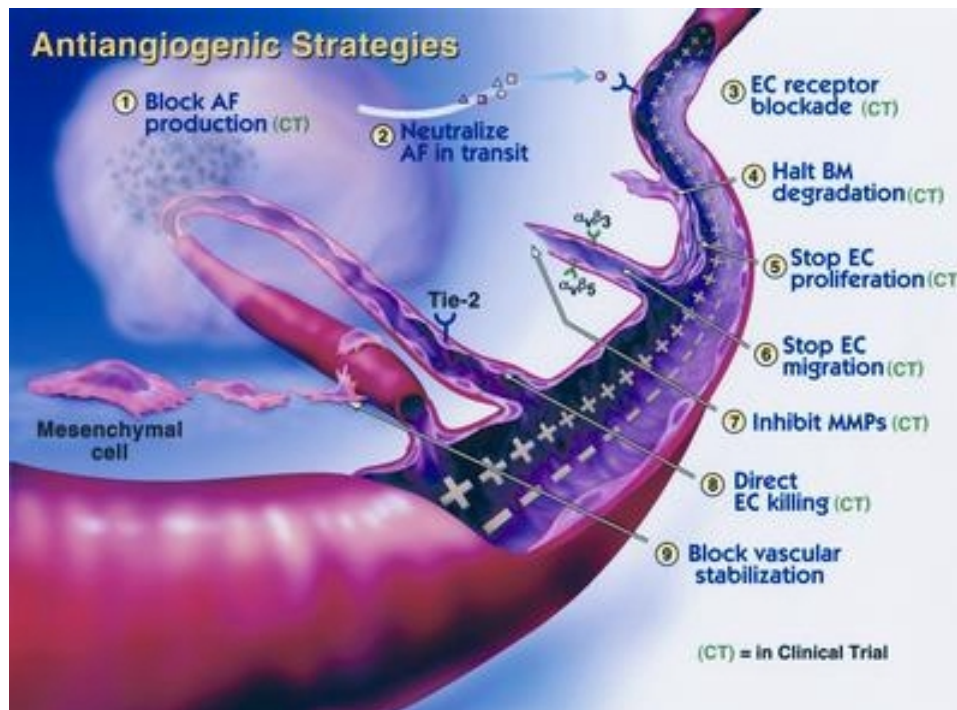


Abb. 9.2: Angriffsmöglichkeiten für Angiogenesehemmer

AF: Angiogenesefaktor, EC: Endothelzellen, BM: Basalmembran, MMP: Metallproteasematrix, Tie-2: Rezeptor Tyrosin Kinase [136]

Tumore brauchen zum Wachstum eine eigene Blutversorgung, die nach Ausschüttung bestimmter Proteine durch den Tumor vom umgebenden Gewebe in Richtung des Tumors aufgebaut wird. Die Bildung dieser neuen Blutgefäße wird Angiogenese genannt. Es gibt verschiedene Orte, an denen Angiogenesehemmer angreifen können (Abb. 9.2).

Das Endostatin XVIII verhindert die Bildung dieser Gefäße bzw. hungert die schon bestehenden Tumore aus, indem es die Freigabe der dazu nötigen Proteine verhindert. Das Endostatin wird im menschlichen Körper allerdings sehr schnell abgebaut, so dass häufige Infusionen zur optimalen Versorgung nötig wären.

Auf gentechnischem Weg entstandenes Endostatin [135] kann mit einer Hülle aus Alginat umgeben und in die Nähe des Tumors gebracht werden. Die Alginatschicht macht die Zellen einerseits unsichtbar für das Immunsystem, andererseits können immer geringe Mengen des Wirkstoffs entweichen und das ständige Aushungern des Tumors wäre über Monate gegeben.

In Tierversuchen mit Mäusen sind schon Schrumpfraten der Tumore bis zu 70% erreicht worden. Der Nachteil der Endostatinmethode ist, dass Tumore nicht vollständig ent-

fernt werden können und bei fehlender Endostatingabe auch wieder anfangen zu wachsen. Bei wiederholter zyklischer Anwendung ließ sich das Tumorwachstum in drei untersuchten Fällen aber endgültig unterdrücken. Bei dem Lewis-Lungenkarzinom waren sechs Zyklen (185 Tage), beim T241-Fibrosarkom (eine Bindegewebsgeschwulst) vier Zyklen und beim B16F10-Melanom nur zwei Zyklen bis zur dauerhaften Regression der Tumore nötig.

9.2 Analytik des Endostatins

Es werden zwei Möglichkeiten zur Endostatinanalytik vorgestellt, zum einen die Produktkontrolle mit dem SDS-PAGE-Gel und zum anderen die kapillarelektrophoretische Überprüfung.

9.2.1 SDS-PAGE-Gel

Endostatin ist nicht käuflich zu erwerben, es wird von der Firma BioVisioN AG (Hannover) in einer der am Institut hergestellten genau entsprechenden Form zur Verfügung gestellt. Es zeigt im SDS-PAGE Gel zwei Banden, ist also kein Reinstoff. Für die SDS-PAGE werden homogene Polyacrylamidgele (20%) der Firma Pharmacia verwendet, die mit Silbernitrat gefärbt werden. Als Standard werden mindestens eine, meist zwei Bahnen des Gels mit dem Low-Weight-Standard der Firma Sigma belegt. Dabei handelt es sich um eine genau definierte Mischung von 8 Proteinen mit Molekülmassen zwischen 6,5 kD und 66 kD: Aprotinin (6,5 kD), α -Lactalbumin (14,2 kD), Trypsin Inhibitor (20 kD), Trypsinogen (24 kD), Carbo Anhydrase (29 kD), Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (36 kD), Ovalbumin (45 kD), Albumin (66 kD).

Das mit Silbernitrat gefärbte SDS-Gel wird in Abbildung 9.3 dargestellt.

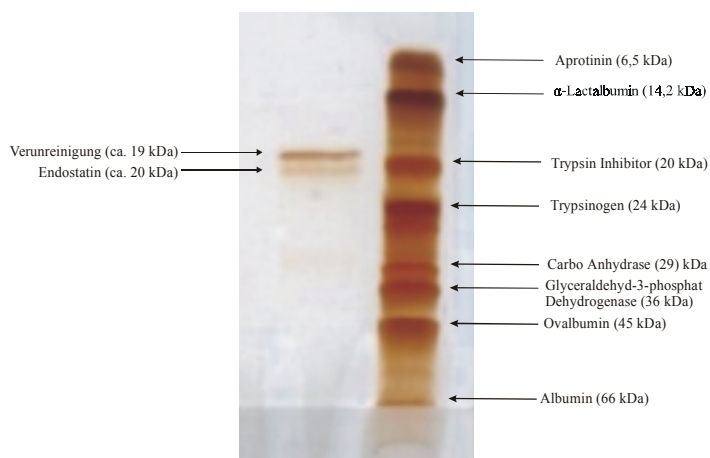


Abb. 9.3: Mit Silbernitrat angefärbtes SDS Gel zur Reinheitskontrolle des Endostatin-Standards der Firma BioVisioN AG

Auf dem Gel sind bei dem Endostatin-Standard deutlich zwei Banden zu erkennen, die stärkere bei ungefähr 19 kDa und die schwächere, die dem Endostatin entspricht, bei 20 kDa.

9.2.2 Kapillarelektrophoretische Analytik des Endostatin

Für die Analytik dieses Standards wird der Feststoff in zwei verschiedenen Puffern gelöst, zum einen in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und zum anderen in dem von Finke [30] genutzten Elutionspuffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff), um Vergleichsmöglichkeiten mit den Kultivierungsproben zu haben.

Die Messungen werden in einer 60 cm langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm und 40 mM Boratpuffer mit einem pH-Wert von 10,6 als Elektrolyten durchgeführt. Dafür werden 25 mg der Probe in 1 mL 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und auf verschiedene Konzentrationen verdünnt. In den folgenden beiden Abbildungen 9.4 und 9.5 ist ein Elektropherogramm mit Konzentrationen von 500 $\mu\text{g/mL}$ und 5 $\mu\text{g/mL}$ dargestellt.

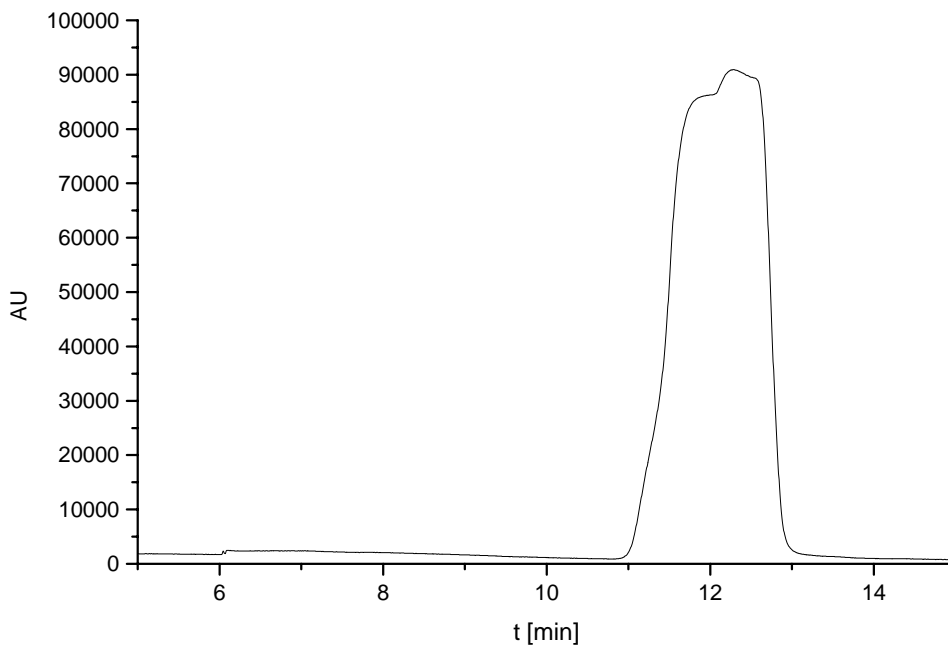


Abb. 9.4: Endostatin in der Konzentration 500 $\mu\text{g/mL}$

Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10,6; Probe: 500 $\mu\text{g/mL}$ Endostatin in 0,1%iger TFA; Detektion: UV 214 nm

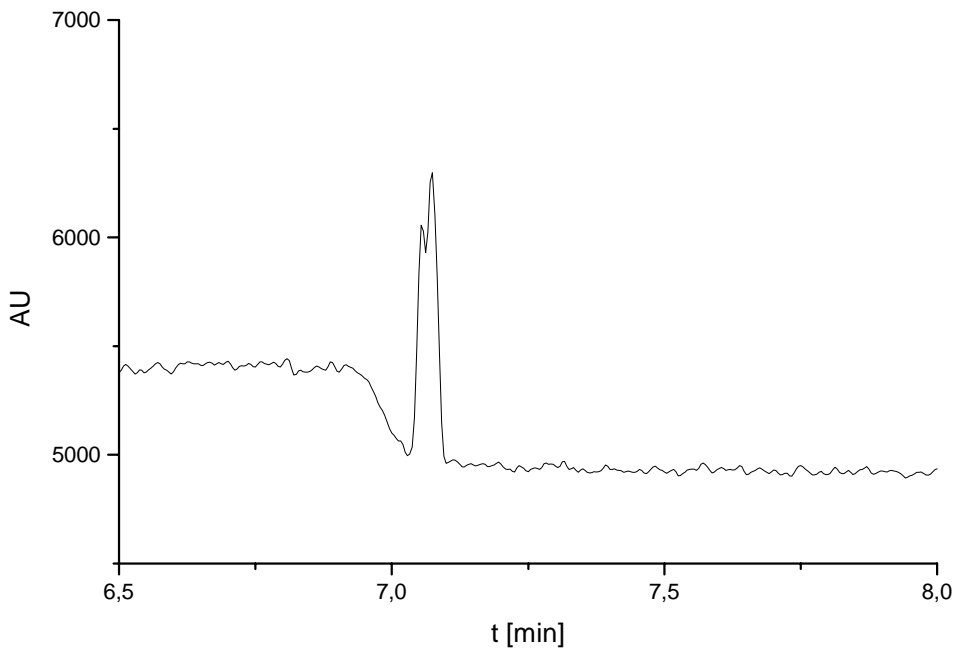


Abb. 9.5: Endostatin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$

Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10,6; Probe: 5 $\mu\text{g/mL}$ Endostatin in 0,1 % iger TFA; Detektion: UV 214 nm

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale in den beiden Elektropherogrammen jeweils zwei „Spitzen“ aufweisen, es sich also um zwei sehr dicht nacheinander migrierende Substanzen handelt. Im ersten Elektropherogramm ist die Konzentration des Standards sehr hoch. Dadurch wird der Peak sehr breit. Erst in sehr großer Verdünnung ließen sich beide Substanzen als Signal mit zwei Spitzen darstellen. Es ist unmöglich, beide Substanzen bis auf die Grundlinie zu trennen, um sie zu sammeln und mit dem Massenspektrometer näher zu spezifizieren.

Bei der Aufnahme des höher konzentrierten Standards passiert das Signal den Detektor nach 11 Minuten, bei der um den Faktor 100 geringer konzentrierten Probe wird das Endostatin schon nach 7 Minuten detektiert. Die Migrationszeiten weichen somit um 34 % voneinander ab. Das kann verschiedene Gründe haben. Bei so hohen Konzentrationen wie in Abb. 9.4 gezeigt, kann es, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, zu Bandenverbreiterung und damit zu diesem langgezogenen Peak kommen. Der wahrscheinlichere Grund ist aber, dass die Elektropherogramme nicht direkt hintereinander aufgenommen wurden. Zwischenzeitlich wurden andere in den beiden verschiedenen Puffersystemen gelöste Endostatinproben mit verschiedenen CE-Puffern aufgenommen. Durch die wechselnden pH-Werte und die verschiedenen, teilweise sehr hohen Salzkonzentrationen dieser Puffersysteme kann es in

der Kapillare zu strukturellen Veränderungen kommen, die eine solche Zeitverschiebung erklären.

Die in den Abbildungen 9.4 und 9.5 dargestellten Resultate stimmen mit dem am Institut der Technischen Chemie belegten und gefärbten SDS-Gel überein. In der kapillarelektrophoretischen Messung ist zwar das zweite Signal das stärkere, was sich aber durch unterschiedliche Detektionsmethoden beim Gel und in der Kapillarelektrophorese erklären lässt. Bei der Bestimmung der Banden auf dem Gel hat zuvor eine Reaktion mit Silbernitrat stattgefunden. Reagiert die Verunreinigung stärker mit dem Silbernitrat als das Endostatin, bildet es auch eine deutlichere Bande. Bei der Analytik mit der Kapillarelektrophorese findet vor der Trennung keine Reaktion statt, sondern nur die Menge und die UV-Absorptionsfähigkeit der Analyten spielt eine Rolle.

9.3 Analytik der Realproben

Leider ist es in den folgenden Versuchen mit den Kultivierungsproben von Finke [30] nicht möglich, ähnliche Signale zu erhalten. Ursachen dafür sind eine für die Erfassung mit der Kapillarelektrophorese zu geringe Konzentration des in den Proben vorhandenen Endostatins oder die Zersetzung des Endostatins in den sehr salzhaltigen Puffern (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff).

Bei Messungen des in diesem Puffersystem frisch gelösten Endostatins werden in den Elektropherogrammen nach ungefähr 24 Stunden sehr viele Abbauprodukte sichtbar (Abb. 9.6).

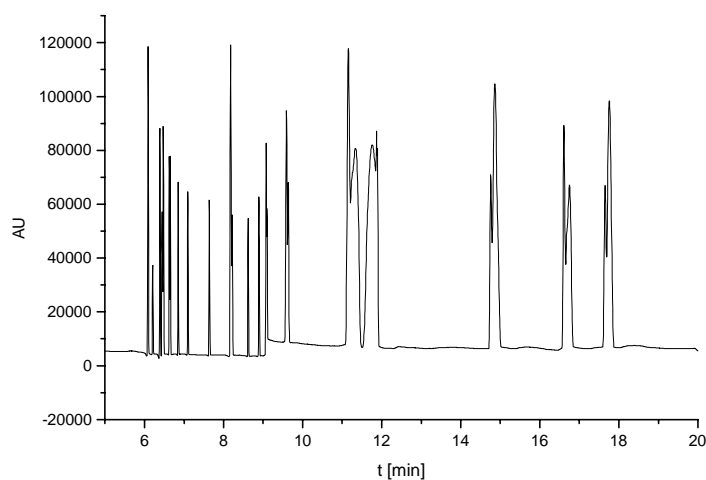


Abb. 9.6: Zersetzung des Endostatins im Elutionspuffer nach ca. 24 Stunden

Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 μm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10,6; Probe: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endostatin in Elutinspuffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff); Detektion: UV 214 nm

Bei einem längeren Verbleib des Endostatins in diesem Puffersystem kommt es möglicherweise zu einem vollständigen Abbau des Produkts, so dass keine Signale mehr detektiert werden können.

10 Entwicklung eines Immunoassays

Das Prinzip des Immunoassays und seine Bedeutung in der Kapillarelektrophorese ist in Kapitel 4 eingehend beschrieben worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Bildung und die Stabilität des Immunkomplex zwischen einem therapeutisch interessanten Glykoprotein und seinem Antikörper untersucht. Das Projekt wird in Zusammenarbeit mit der Bayer Corporation, Berkeley, CA, USA durchgeführt.

10.1 Therapeutische Anwendung des Glykoproteins

Das biotechnologisch produzierte Glykoprotein (GP) wird in der Krebstherapie eingesetzt. Eine Anwendung in der HIV-Therapie wird zur Zeit untersucht. Leider können keine näheren Angaben über das bei Sigma kommerziell erhältliche Modellsystem und das diesem strukturell ähnliche, aber nicht identische Glykoprotein gemacht werden.

10.2 Analytik für den Immunkomplex aus Glykoprotein und seinem Antikörper

Die immunochemische Reaktion zwischen GP und anti-GP wird kapillarelektrophoretisch mit laserinduzierter Fluoreszenz an einem kommerziell erhältlichen Modellsystem untersucht. Der Antikörper ist mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinsothiocyanat (FITC) gekoppelt. Dadurch entstehen bei Bildung des Komplexes zwei Signale im Elektropherogramm, eines durch den frei vorliegenden Antikörper und das andere durch den gebildeten Immunkomplex. Das Antigen selbst kann nicht detektiert werden, da es unmarkiert ist und nicht fluoresziert.

Zur Trennung von Antikörper und Immunkomplex werden verschiedene Puffersysteme getestet. Eine Grundlinienauftrennung der Signale (Abb. 10.1) ist mit einem 100 mM Tricine Puffer mit einem pH-Wert von 8,3 möglich.

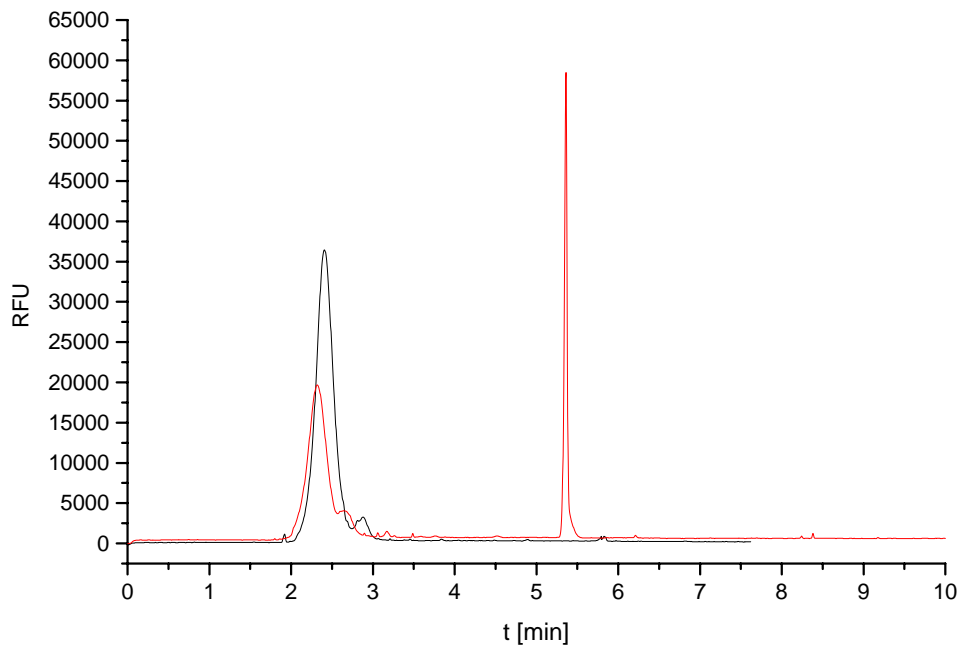


Abb. 10.1: Elektropherogramme des FITC- markierten anti-GP vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) der Reaktion mit GP

Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 27 cm x 75 µm fused silica; 5 s Druckinjektion; stopped flow 2 min bei 5°C; 100 mM Tricine Puffer pH 8,3; Probe: 5×10^{-8} g/mL Glykoprotein; Detektion: LIF

Das vor der Reaktion aufgenommene Elektropherogramm zeigt ein deutliches Signal des Antikörpers bei zwei Minuten, dem ein sehr kleines Signal (Verunreinigung) bei ungefähr 2,8 Minuten folgt. Nach der Reaktion mit dem Glykoprotein nimmt das erste Signal, das des anti-GP, ab und ein neuer Peak entsteht bei 5,3 Minuten, der Immunkomplex. Bei Variation der Antigenkonzentration verändern sich auch Peakhöhen und -flächen der beiden Signale, so dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Signalen nachzuweisen ist. Die Reaktion wird im Stopped Flow Modus durchgeführt, da der Immunkomplex in wässriger Lösung nach kurzer Zeit zerfällt. Dies wird in Abb. 10.2 deutlich, wo der Zerfall des Immunkomplex nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur dargestellt wird.

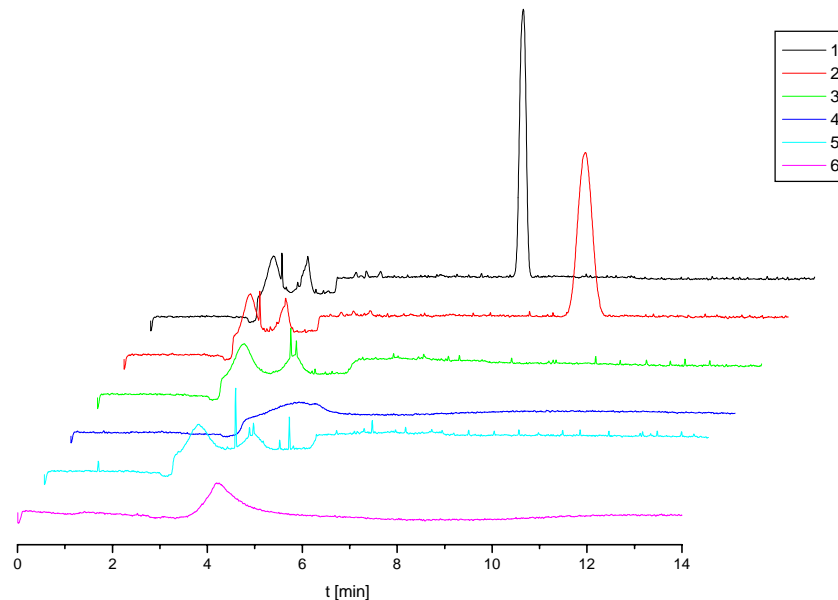


Abb. 10.2: Zerfall des Immunkomplex in wässriger Lösung

Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 27 cm x 75 µm fused silica; 5 s Druckinjektion;
 100 mM Tricine Puffer pH 8,3; Probe: 5×10^{-8} g/mL Glykoprotein; Detektion: LIF
 Inkubation: 30 Minuten bei RT in einem 2 mL Eppendorfgefäß (abgedunkelt)

Bei der ersten Messung (Elektropherogramm 1 in Abb. 10.2) nach einer halben Stunde hat der gelabelte Antikörper fast ganz abreagiert, und es ist ein deutlicher Immunkomplexpeak zu sehen, der allerdings fünf Minuten später detektiert wird als bei der Stopped Flow Methode. Im weiteren Verlauf wird alle 20 Minuten eine neue Probe injiziert. Bei dem zweiten Elektropherogramm ist noch ein Produktsignal zu erkennen, das aber schon kleiner und noch weiter nach hinten verschoben ist. Schon bei der dritten Messung, also nach 40 Minuten, kann kein Immunkomplex mehr in der Lösung nachgewiesen werden.

Bei der Stopped Flow Methode werden beide Analyten abhängig von ihrer Mobilität, d.h., die langsamere zuerst, nacheinander in die Kapillare injiziert. Durch kurzzeitiges Anlegen der Spannung (0,5 min) wird eine Durchmischung der beiden Analyten erreicht. Die Spannung wird dann für verschieden lange Zeiträume (0, 2, 5, 8 Minuten) unterbrochen, die Substanzen können miteinander reagieren und bei wiederangelegter Spannung den Detektor passieren.

Im Vergleich zu der Inkubation im Eppendorfgefäß bringt die Stopped Flow Methode einige Vorteile mit sich. Durch die automatische Injektion der beiden Substanzen werden manuelle Pipettierfehler umgangen und die Analyten sind, wenn sie getrennt in einem Puf-

fersystem vorliegen, stabiler als nach einer Reaktion, bei der der gebildete Immunkomplex in dem Puffer wieder zerfällt.

Die Zuverlässigkeit des entwickelten Immunoassays wird durch Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten, Peakhöhen und Peakflächen des Antikörpers und des Immunokomplexes untersucht. Zum einen werden Antikörper und Antigen in einem Eppendorfgefäß bei Raumtemperatur eine halbe Stunde inkubiert und zum anderen wird die Kapillare als Reaktionsraum [97] genutzt. Die Reaktionen werden Stopped Flow in jeweils zehn Messzyklen nacheinander durchgeführt. Die Messungen nach der Inkubation im Eppendorfgefäß sind nicht reproduzierbar (Kap. 10.2). Dies ist möglicherweise auf die geringe Stabilität des anti-GP bei höheren Temperaturen und auf den Zerfall des Komplexes in dem nicht physiologischen Puffersystem zurückzuführen. Deswegen wird hier auf eine Darstellung dieser Werte verzichtet.

Schon frühere Untersuchungen haben ergeben, dass bei einer Inkubation unter Standardbedingungen deutlich schlechtere Reproduzierbarkeiten gefunden werden als bei Verwendung der Stopped Flow Technik durch Spannungsunterbrechung [87, 88]. Die Ergebnisse der Stopped Flow Reaktionen sind in Abb. 10.3 dargestellt.

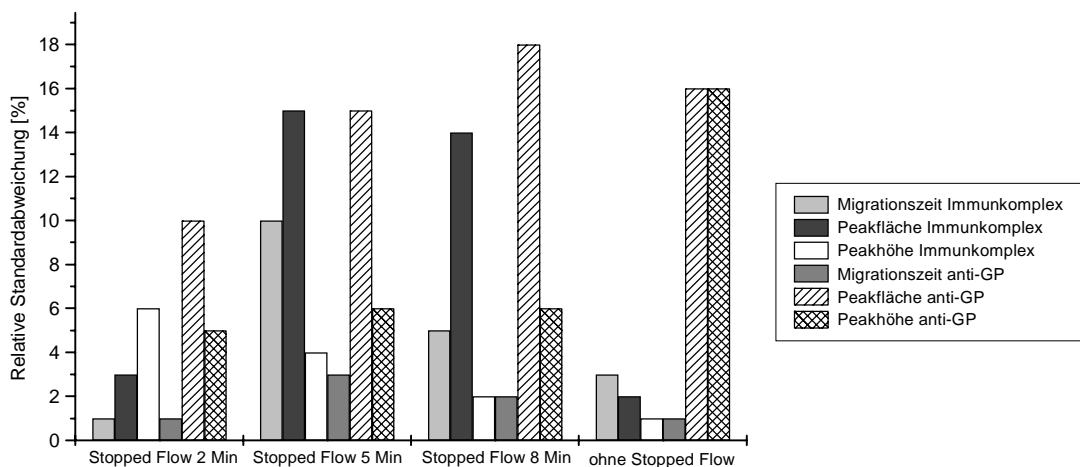


Abb. 10.3: Relative Standardabweichung der Peakhöhen, -flächen und Migrationszeiten für das anti-GP und den Immunkomplex über zehn Messzyklen

Für die Reaktion zwischen dem Glykoprotein und seinem Antikörper scheint die Methode mit der zweiminütigen Reaktionspause am geeignetsten zu sein. Sie weist insgesamt die geringsten Standardabweichungen auf (unter 6 % für die Parameter des Immunkomplex und unter 10 % für die des anti-GP). Auch die Messungen ohne Reaktionszeit zwischen Injektion und Trennung zeigen nur sehr geringe Abweichungen (unter 3 %) bei Migrationszeit, Peakhöhe und -fläche für den Immunkomplex und der Migrationszeit des anti-GP,

weisen aber sehr große Schwankungen (17 %) bei der Peakhöhe und -fläche des Antikörpers auf. Bei den Versuchen mit den Stopped Flow Zeiten von 5 bzw. 8 Minuten nehmen auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten bei den Immunkomplexen zu, so dass diese Zeiten als zu lang erscheinen. Diese bei steigender Reaktionszeit zunehmenden Fehler lassen sich möglicherweise auf die längere Verweildauer in dem nicht physiologischen Puffersystem in der Kapillare zurückführen. Die durchschnittlichen Peakflächen der Immunkomplexe unterscheiden sich bei den verschiedenen Stopped Flow Zeiten um weniger als 5 % (Abb. 10.4). Als Tendenz lassen sich bei zunehmender Verweilzeit abnehmende Peakflächen erkennen, wobei die bei einer Stopped Flow Zeit von zwei Minuten erhaltenen Werte diesem Trend nicht folgen. Das liegt möglicherweise daran, dass diese Werte an einem anderen Tag aufgenommen worden sind als der Rest. Durch die relativ großen Abweichungen in den einzelnen Messzyklen lassen sich nur statistische Schwankungen der Peakflächen nachweisen, aber keine Aussage über die Beeinflussung der Reaktion durch die verschiedenen Stopped Flow Zeiten machen.

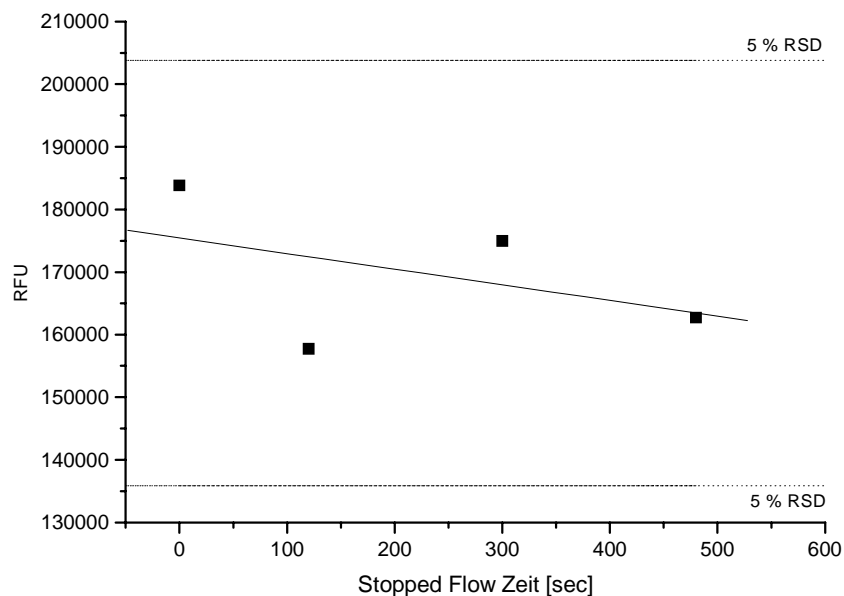


Abb. 10.4: Einfluß der Stopped Flow Zeit auf die Peakflächen der Immunkomplexe

Die beobachteten Migrationszeiten des Immunkomplex zeigen einen Anstieg bei zunehmender Stopped Flow Zeit, während die Migrationszeiten des Antikörpers gleich bleiben.

10.3 Übertragung des Immunoassays auf Fermentationsproben

Der mit einem kommerziell erhältlichen Modellsystem von Sigma entwickelte Immunoassay wird auf Fermentationsproben aus einer Perfusionkultur der Bayer Corp. übertragen.

Das produzierte Glykoprotein ist dem Modellsystem strukturell ähnlich, ist aber nicht mit diesem identisch.

Der von Bayer genutzte Antikörper liegt nur in nicht gelabelter Form vor und muss vor dem kapillarelektrophoretischen Einsatz mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-isothiocyanat gekoppelt werden. Diese Kopplung wird mit dem Fluorotag FITC Konjugationsset von Sigma (Kap. 12.2.4) [96] durchgeführt. Ein Elektropherogramm dieses selbst gelabelten Ak ist im Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen Ak in Abb. 10.5 dargestellt.

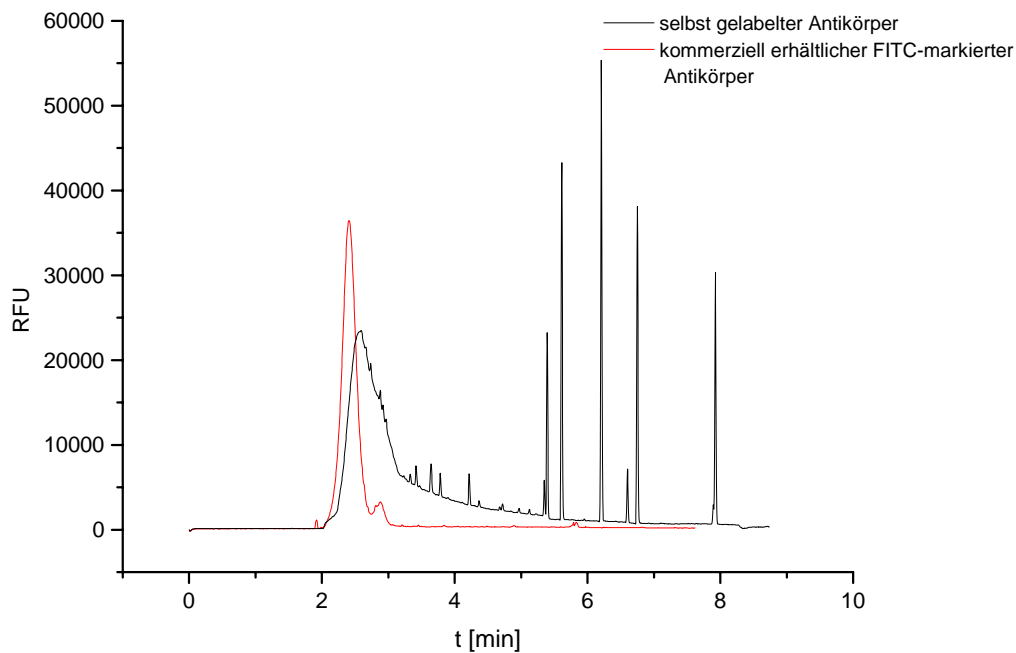


Abb. 10.5: Unterschiede der Elektropherogramme der verschiedenen Antikörper
Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 27 cm x 75 µm fused silica; 5 s Druckinjektion;
100 mM Tricine Puffer pH 8,3; Detektion: LIF

Das Signal des mit dem Fluorotag FITC Konjugationsset markierten Antikörpers zeigt, trotz zweifacher Aufreinigung über eine Sephadex-Säule, im Vergleich zu dem Antikörper von Sigma ein sehr starkes Tailing und weitere nicht identifizierbare Signale auf.

Das zu untersuchende Medium weist auch einen sehr starken Peak auf. Dieser entspricht dem bei der Kultivierung vorhandenen „Green Fluorescent Protein“ (GFP) und stammt noch aus der Zelllinienentwicklung. Der GFP-Peak ist in Abb. 10.6 dargestellt.

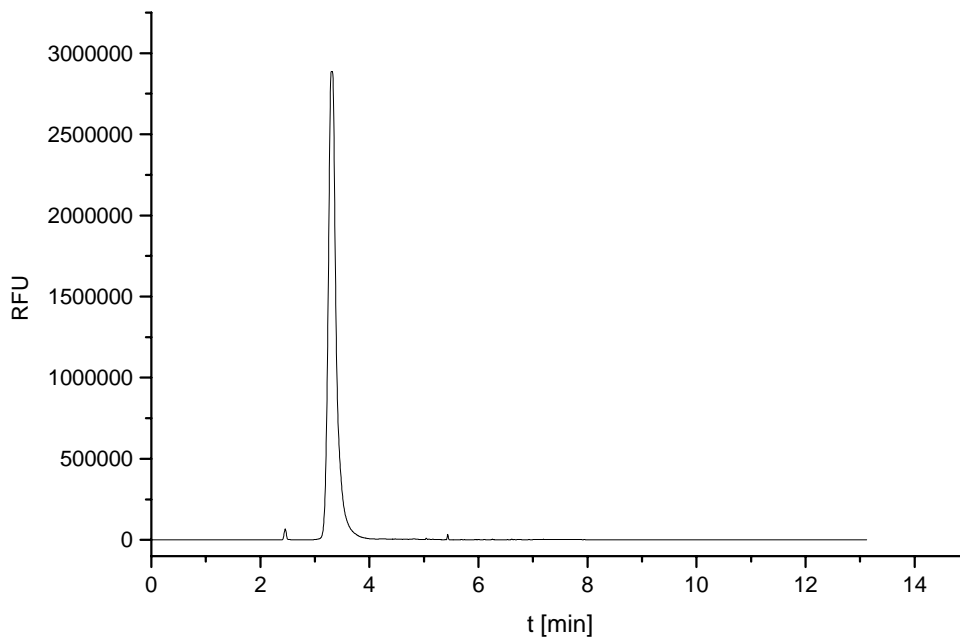


Abb. 10.6: Signal des GFP in der Mediumsprobe

Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 27 cm x 75 µm fused silica; 5 s Druckinjektion; 100 mM Tricine Puffer pH 8,3; Detektion: LIF

Beim Vergleich der Abbildungen 10.5 und 10.6 ist zu erkennen, dass das Signal des GFP bei gleicher Verdünnung um eine Zehnerpotenz größer ist als das des Antikörpers. Bei einer Injektion beider Analyten überdeckt der Peak des GFP das Signal des Antikörpers. Der eigentliche Antikörperpeak ist nicht mehr erkennbar, nur die darauffolgenden kleinen Peaks (Abb.10.7). Somit kann nicht festgestellt werden, ob die Peakfläche durch eine mögliche Reaktion mit dem Antigen kleiner wird. Außerdem ist in Abbildung 10.7 kein Signal des Immunkomplex zu erkennen.

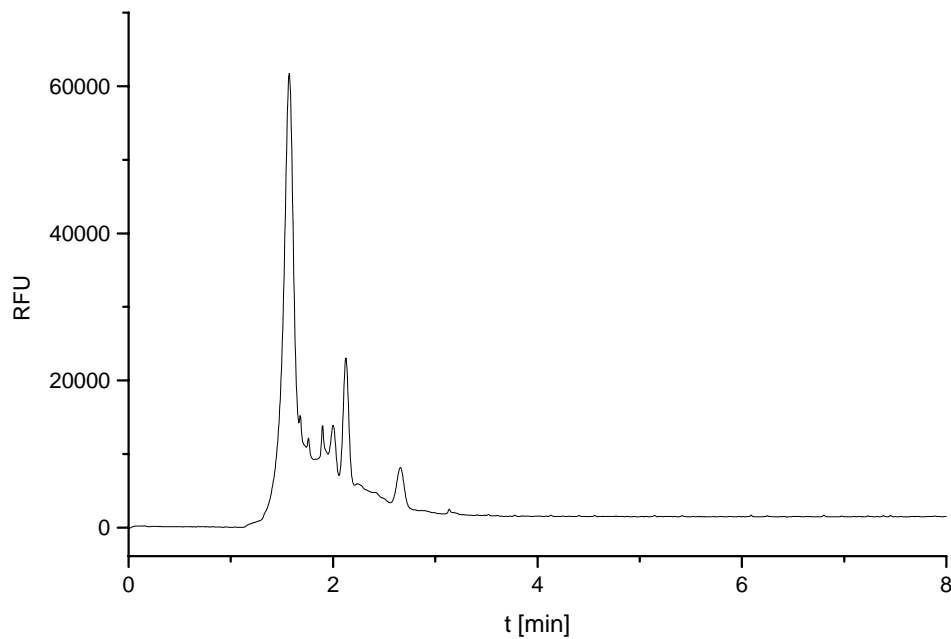


Abb. 10.7: Überlagerung des Antikörpersignals durch den GFP-Peak

Spannung: 10 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 27 cm x 75 µm fused silica; 5 s Druckinjektion; 100 mM Tricine Puffer pH 8,3; Detektion: LIF

Im Verlauf der Messungen wird sowohl eine Inkubation im Eppendorfgefäß durchgeführt als auch die Kapillare wie bei den Untersuchungen in Kap. 10.2 als Reaktionsraum bei verschiedenen Reaktionszeiten genutzt. Des weiteren werden die Versuche mit verschiedenen Verdünnungen von Antikörper und Antigen durchgeführt. In keinem der nach den Reaktionen aufgenommenen Elektropherogrammen entsteht ein deutlicher Produktpeak wie bei den Untersuchungen in Kap. 10.2.

Theoretisch muss auch ein Immunoassay zwischen dem von Bayer hergestellten Glykoprotein und dem eingesetzten Antikörper möglich sein, da die Reaktion im Westernblott bei Bayer verwendet wird.

Dass trotzdem kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden kann, hat mehrere Gründe. Die Konzentration des Glykoproteins in der Kultivierung ist nicht bekannt, es ist also nicht klar, welche Mengen an Antikörpern und Kultivierungsmedium zur Reaktion eingesetzt werden müssen. Eventuell entstehender Immunkomplex kann dann unter der Nachweisgrenze liegen oder im Vergleich mit dem GFP-Signal so klein sein, dass er nicht als Produktpeak auffällt.

Der hier genutzte Antikörper kann nicht in gelabelter Form erworben werden, so dass die Kopplung an das FITC erst am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover erfolgt. Es ist nicht bekannt, ob der Antikörper nach der Kopplung noch mit dem Gly-

koprotein reagiert bzw. wie gut seine Qualität ist. In Abbildung 10.5 wird deutlich, dass neben dem Hauptprodukt auch noch einige Nebenprodukte entstanden sind. Möglicherweise zerfällt der gelabelte Antikörper auch sehr schnell, und es kommt deswegen zu keiner Reaktion. Da der GFP-Peak den Antikörperpeak überdeckt, kann keine klare Aussage darüber getroffen werden.

Da aber die Reaktion im Westernblott als Analytik angewendet wird, sind weiterführende Versuche sinnvoll.

Die einfachste Lösung wäre, das GFP aus der Kultivierungsbrühe zu entfernen. Diese Möglichkeit wurde bei Bayer untersucht und die Durchführung erweist sich als schwierig. Eine weitere Möglichkeit ist, ein anderes Label für den Antikörper zu nutzen, wie z. B. ein Anthrazen-Derivat (z.B. 2-Anthrazensulfoylchlorid), ein stark UV-absorbierendes Reagenz (254 nm). Damit kann das störende Signal des GFP, das nur bei der Fluoreszenzdetektion auftritt, entfernt werden.

Die dritte Möglichkeit ist der Einsatz eines He/Ne Lasers, der die Substanzen im Bereich des roten Lichtes bei 633 nm anregt. Als Marker eignet sich z.B. Texas Red, und die Problematik des grün fluoreszierenden Proteins wäre damit umgangen.

11 Zusammenfassung und Ausblick

Entwicklung einer Analytik für nicht-derivatisierte Aminosäuren

Bisher sind Aminosäuren meist vor ihrer Analytik derivatisiert worden, da sie kein UV-Licht absorbieren und auch keine natürliche Fluoreszenz besitzen. In dieser Arbeit wurde eine in der Literatur vorgestellte Methode reproduziert und verbessert, um Mediumsproben schnell und unkompliziert untersuchen zu können.

Das größte Problem dieser Methode war die schlechte Reproduzierbarkeit. Durch die Absorption des Kohlendioxids der Luft sank der pH-Wert des Puffers, was ein Absinken der Grundlinie zur Folge hatte.

Nachdem untersucht worden war, wie schnell der pH-Wert des Puffers abnimmt, wurde überlegt, wie die Absorption des Kohlendioxids verhindert werden kann. Es wurde eine einfache Lösung entwickelt, bei der Gummiplättchen an der Bodenplatte der Vakuumapparatur angebracht wurden und so die gerade nicht genutzten Pufferbehälter relativ luftdicht abschlossen werden konnten. Dadurch konnte eine wesentliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit von drei auf zehn Messungen hintereinander erzielt werden. Danach musste neuer Puffer eingesetzt werden. Eine weitere, nicht getestete Möglichkeit wäre ein größerer Pufferbehälter. Die Öffnung für Kapillare und Elektrode ist in diesem Fall genauso groß wie bei den 2 mL Puffergefäßen, das Volumen aber um den Faktor 10 größer, so dass der pH Wert nicht so schnell absinken sollte.

Die Zuordnung der Aminosäuren zu den jeweiligen Signalen fand auf zwei verschiedene Arten statt. Zum einen wurde der auf einen basischen pH-Wert eingestellte Aminosäurestandard mit einzelnen Aminosäuren gespiked, so dass deren Peakhöhen und -flächen zunahmen, zum anderen wurden einzelne Aminosäuren nicht eingesetzt, so dass ein Signal fehlt. Über diese beiden Methoden gelang eine Zuordnung von 18 Aminosäuren, wobei Leucin und Isoleucin komigrierten und Arginin und Glutamin keine Signale zugeordnet werden konnten.

Beim Arginin besteht die Möglichkeit, dass es bei dieser Analysemethode nicht in Richtung Anode, sondern in Richtung Kathode wandert, da es einen isoelektrischen Punkt von 11,15 hat und deswegen nicht in anionischer Form vorliegt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde über die relativen Standardabweichungen von Migrationszeiten, Signalthöhen und Signalflächen dreier Aminosäuren bestimmt, die am

Anfang (Asp), in der Mitte (Ala) und am Ende (Lys) des Elektropherogramms detektiert wurden. Die relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten lagen bei unter 2%, die der Peakflächen zwischen 4% und 8% und die der Peakhöhen zwischen 4% und 6%.

Die relativen Standardabweichungen wurden für die HPLC, die am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover als Standardanalytik eingesetzt wird, nur für die Peakflächen und -höhen bestimmt. Beide Werte lagen unter 5%. Die Abweichungen in der Migrationszeit wurden nicht bestimmt, da das Signalmuster sich nicht verändert.

Die kapillarelektrophoretische Trennung der Aminosäuren lässt sich also ähnlich reproduzierbar darstellen wie mit der HPLC. Außerdem bietet sie zwei weitere Vorteile. Sie dauert inklusive Spülen nur 50 Minuten, während die HPLC Methode 70 Minuten benötigt. Die Proben brauchen nicht derivatisiert zu werden, wodurch einige Chemikalien eingespart werden können. Ein Nachteil der kapillarelektrophoretischen Methode ist ihre geringe Sensitivität im Vergleich zu den Methoden, die mit derivatisierten Proben und anderen Detektionsmöglichkeiten arbeiten. Je nach Art der Anwendung und der Konzentration der Aminosäuren in der Probe haben beide Methoden ihre Vor- und Nachteile.

Die entwickelte Methode wurde nach Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Zuordnung der Signale auf die Aminosäureanalytik in einem serum- und proteinfreien Medium für CHO-Zellen übertragen.

Die erhaltenen Elektropherogramme zeigten ähnliche Signalmuster wie die Standardproben, so dass eine klare Zuordnung der Aminosäuren zu den einzelnen Signalen möglich war. Beim Vergleich zweier Elektropherogramme, die zu verschiedenen Zeitpunkten einer Kultivierung aufgenommen wurden, konnten anhand der Unterschiede der Peakhöhen und -flächen zumindest qualitative Aussagen darüber getroffen werden, welche Aminosäuren während des Prozesses verbraucht wurden.

Bei einer kontinuierlichen Aufnahme von Daten während einer gesamten Kultivierung kann relativ schnell erkannt werden, welche Aminosäuren am schnellsten verbraucht und deswegen wieder zugefüttert werden müssen.

Peptid- und Proteinanalytik

In diesem Kapitel wurden verschiedene Problemstellungen der Peptid- und Proteinanalytik bearbeitet. Im ersten Teil wurde untersucht, wie sehr sich Peptide ähneln dürfen, um eine Trennung möglichst unkompliziert durchführen zu können. Dazu wurden vier Peptide genutzt, bei denen die beiden Aminosäuren Glycin und Phenylalanin in verschiedener Anzahl und unterschiedlicher Verknüpfung vorlagen. Es handelte sich dabei um die beiden Tripep-

tide Phe-Phe-Gly und Gly-Gly-Phe und die beiden Tetrapeptide Phe-Gly-Gly-Phe und Phe-Gly-Phe-Gly. Es gelang, diese Substanzen in einer 60 cm fused silica Kapillare mit einem 80 mM Phosphatpuffer zu trennen. Bei einem pH-Wert von 6,5 war es nicht möglich, die Signale der beiden Tetrapeptide bis auf die Grundlinie zu trennen, während bei einem pH-Wert von 6,4 die beiden Tripeptide sehr eng aufeinander folgten. Es ist also aufgrund einer pH-Wert Änderung um eine Zehntel Einheit möglich, jedes der vier Peptide bei Bedarf fraktioniert zu sammeln.

Des weiteren wurde untersucht, ob die Variation der Konzentration eines beliebigen Peptids Auswirkungen auf die Trennung zwischen den Substanzen oder auf die Peakflächen und -höhen hat. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass eine gleichzeitige Kalibration möglich war.

Die Kalibrationsgerade hatte einen Regressionskoeffizienten, der nahe 1 lag und die Variation der Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Trennung und die anderen Signale.

Da die Trennungen in der 60 cm langen Kapillare bis zu 30 Minuten dauerten, wurde die Trennung in einer mit 30 cm kürzeren Kapillare durchgeführt. Die Analytik der Peptide wurde um mehr als 50 % schneller, aber es komigrierten entweder die Tri- oder die Tetrapeptide.

Bei sehr ähnlichen Peptiden ist es sinnvoll, längere Kapillaren zu nutzen, da deren Trennleistung besser ist. Auf beschichtete Kapillaren kann bei so kurzen Peptiden verzichtet werden, da über den gesamten Zeitraum der Tests keine Adsorption an die Kapillarwand stattgefunden hat.

Im zweiten Teil wurde eine Analytik für ein Gemisch aus Peptiden und Proteinen entwickelt. Die Proteine waren α -Lactalbumin und Bovine Serum Albumin (BSA), die Peptide Triglycin, Glycylleucin, Glycyltyrosin und L-Leu-Gly-Gly. Da Proteine dazu neigen, sich an die Kapillarinnenwand zu adsorbieren, wurde die Trennung der Substanzen in einer 60 cm langen fused silica Kapillare mit einem 80 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2 durchgeführt. Dadurch sollten die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Kapillarwand verhindert werden.

Trotz des stark sauren Puffers ließen sich nur die vier Peptide detektieren. Die Proteine bauten so starke Bindungen an die Kapillarwand auf, dass sie den Detektor nicht erreichten, sondern erst im nachfolgenden Spülschritt mit 0,1 M Natronlauge von der Kapillare entfernt werden konnten.

Deswegen wurde statt der fused silica Kapillare eine 38 cm lange neutrale Kapillare der Firma Beckman Coulter eingesetzt, die mit Polyacrylamid beschichtet ist. Dadurch erhielt die Kapillare eine hydrophile Innenfläche, welche die Adsorption der Proteine verhindern sollte. Die Trennung der Proteine und Peptide fand mit einem 20 mM Citratpuffer und einem pH-Wert von 3 statt, und alle sechs Substanzen konnten innerhalb von 13 Minuten detektiert werden. Die beiden Proteine hatten Migrationszeiten von 5,5 Minuten (α -Lactalbumin) und 6 Minuten (BSA), wobei das Signal des BSA sehr breit war und ein starkes Tailing besaß. Das lässt sich möglicherweise auf doch vorhandene Wechselwirkung mit der Kapillarwand zurückführen oder auf einen Zerfall des BSA, der in späteren Messungen noch deutlicher wurde.

Im letzten Teil wurde die Einsatzmöglichkeit der Kapillarelektrophorese zur Reaktionskontrolle untersucht. Es wurde ein enzymatischer Abbau eines Kartoffelproteins über einen Zeitraum von 35 Stunden kapillarelektrophoretisch verfolgt. Dazu wurde aus oben genannten Gründen eine neutrale Kapillare eingesetzt.

Da das Enzym das Protein aber nicht nur an spezifischen Bindungen hydrolysierte, entstanden nach wenigen Stunden sehr viele Signale, die weder getrennt noch zugeordnet werden konnten.

In diesem Fall ist eine komplexere Analytik nötig, die auch zwei- (HPLC und CE) oder dreidimensional (HPLC, CE und MS) aufgebaut sein kann.

Analytik für den Gewebeplyasmingen-Aktivator (tPA)

Am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover wurde mit Hilfe von CHO-Zellen tPA gewonnen. Die Reaktionsbeobachtung und die Bestimmung der erzielten Ausbeute wurden über verschiedene Methoden wie HPMAC und SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt. Als Referenzmethode diente der ELISA-Test. Da dieser sehr zeitaufwendig ist, wurde mit der Kapillarelektrophorese eine schnellere Analytik entwickelt.

Im ersten Schritt wurden Standardproben des tPA in verschiedenen Konzentrationen sowohl im wässrigen als auch im Kultivierungsmedium vermessen. Daraus ergaben sich in beiden Fällen Kalibrationsgeraden mit Regressionskoeffizienten, die nahe 1 lagen.

Aufgrund dieser guten Ergebnisse wurden nach einer Kalibration mit Standardproben, die in Kultivierungsmedium gelöst waren, Proben einer realen Kultivierung vermessen und die erhaltenen Werte mit den entsprechenden ELISA Werten verglichen.

Die bei der kapillarelektrophoretischen Bestimmung erhaltenen Werte wiesen die gleiche Tendenz und Größenordnung auf, stimmten aber in ihren Daten nicht völlig mit dem ELISA-Test überein. Die größte Abweichung zwischen zwei Werten lag bei 93 Stunden bei 241 %.

Nach 100 Stunden Reaktionszeit lagen die Abweichung zwischen den beiden Analysemethoden nur noch zwischen 10 % und 25 %.

Bei längerer Reaktionszeit wurde mehr tPA gebildet, die Signale im Elektropherogramm wurden größer und der Einfluss des Signal-/Rausch-Verhältnisses auf die Auswertung der Peakflächen und -höhen nahm ab.

Dass die Ergebnisse beider Methoden trotzdem noch Abweichungen zwischen 10 % und 25 % aufzeigten, lässt sich durch die verschiedenen Detektionsmethoden erklären.

Beim ELISA wird ein „Sandwich“ aus immobilisiertem Antikörper, Antigen (tPA) und enzymgelabeltem Antikörper geformt. Die Detektion erfolgt über die Farbveränderung, die sich aus der Umsetzung von ortho-Phenyldiamin durch das Enzym Peroxidase ergibt.

Bei der kapillarelektrophoretischen Bestimmung findet die Detektion des Antigens direkt über seine UV-Absorption statt und nicht über Farbänderungen. Reaktionen finden in der Kapillare nicht statt, außer der möglichen Anlagerung des Antigens, was aber aufgrund der sehr guten Kalibrationen ausgeschlossen werden kann.

Entwicklung einer Endostatinanalytik

Am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover wurde in Zusammenarbeit mit der BioVisioN mit *Escherichia coli* Bakterien Endostatin hergestellt. Die Kapillarelektrophorese wurde zur Produktkontrolle eingesetzt. Von der BioVisioN wurde Endostatin gleich der am Institut gewonnenen Form als Standard bereitgestellt. Dabei handelte es sich, wie eine Analyse mit dem SDS-PAGE Gel zeigte, nicht um einen Reinstoff, sondern um zwei Substanzen. Die eine war das Endostatin mit einer Größe von 20 kDa und die andere eine Verunreinigung mit 19 kDa.

Die kapillarelektrophoretischen Analysen wurden mit einer 60 cm langen fused silica Kapillare mit dem Innendurchmesser 75 µm durchgeführt, und als Elektrolyt wurde 40 mM Boratpuffer mit einem pH-Wert von 10,6 eingesetzt. Der Standard wurde sowohl in 0,1%iger Trifluoressigsäure als auch in einem sehr salzhaltigen Elutionspuffer gelöst, um Vergleiche mit den Kultivierungsproben ziehen zu können. Standards verschiedener Konzentrationen wurden vermessen, und auch bei der kapillarelektrophoretischen Analyse bestätigte sich, dass es sich um keinen Reinstoff, sondern um zwei im Elektropherogramm

dicht aufeinanderfolgende Substanzen handelte, die nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten. Bei diesen Messungen war das erste Signal das stärkere, was sich mit den verschiedenen Detektionvorgängen zwischen Gel und CE erklären lässt.

Die Übertragung der mit den Standardproben erzielten Ergebnisse auf die Kultivierungsproben war nicht möglich. Entweder lagen die in den Proben vorhandenen Konzentrationen an Endostatin unter der Nachweisgrenze oder haben sich bei der Lagerung in dem stark salzhaltigen Puffer zersetzt.

Bei Messungen des in diesem Puffer gelösten Standards konnte nachgewiesen werden, dass es schon nach 24 Stunden zu Zerfallsprodukten gekommen war. Es ist also möglich, dass sich das Endostatin bei längerer Lagerung in diesem Puffer völlig zersetzt.

Entwicklung eines Immunoassays

Zunächst wurde ein kommerziell erhältliches Modellsystem für die Entwicklung eines Immunoassays eingesetzt. Mit Hilfe von Standards bekannter Konzentrationen wurden verschiedene Puffersysteme für diese Aufgabenstellung getestet. Als optimal erwies sich 100 mM Tricine Puffer mit einem pH-Wert von 8,3. Als Kapillare wurde eine 37 cm lange fused silica Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 µm verwendet.

Die Reaktion des Glykoprotein (GP) und seines Antikörpers wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Nach einer halbstündigen Inkubation im abgedunkelten 2 mL Eppendorfgefäß bei Raumtemperatur wurden die Proben vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass der gebildete Immunkomplex in der wässrigen, nicht physiologischen Umgebung sehr instabil und schon beim dritten Messzyklus zerfallen war. Deswegen wurde die Stopped Flow Technik mit zwei, fünf und acht Minuten Reaktionspause und ganz ohne Pause durchgeführt. Beim Vergleich der Reproduzierbarkeiten der Migrationszeiten, Peakhöhen und -flächen erwies sich die Methode mit einer Stopped Flow Zeit von zwei Minuten am geeignetsten. Hier lagen die Fehler unter 6 % für die Parameter des Immunkomplex und unter 10 % für die des anti-GP. Auch die Methode ohne Stopped Flow Zeit erwies sich als für diese Analytik gut durchführbar. Die Abweichungen für die Migrationszeiten des Immunkomplex und des Antikörpers sowie für die Peakfläche und -höhe des Immunkomplex ließen sich noch weiter auf unter 3 % verringern, aber die Fehler für die Peakhöhe und -fläche des AK vergrößerten sich auf 16 %.

Die mit dem kommerziell erhältlichen Modellsystem entwickelte Standardanalytik wurde auf ein von der Bayer Corp., Berkeley, CA, USA, in Perfusionskultur hergestelltes Glykoprotein übertragen. Die Konzentration des in den Proben vorhandenen Antigens waren

nicht bekannt, und der bei Bayer im Westernblott genutzte Antikörper lag nur in nicht gelabelter Form vor.

Nach der Markierung des Antikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC stellte sich nach kapillarelektrophoretischer Untersuchung heraus, dass neben dem Hauptprodukt weitere nicht identifizierbare Peaks entstanden waren, die trotz zweifacher Reinigung über eine Sephadex-Säule nicht entfernt werden konnten. Als weitere Schwierigkeit erwies sich das Signal des in den Kultivierungsproben enthaltene GFP, das bei gleicher Verdünnung um eine Zehnerpotenz größer war als der Antikörperpeak.

Trotz verschiedener Versuche einer Inkubation im Eppendorfgeläß sowie verschiedener Stopped Flow Reaktionen konnte kein Immunkomplex in den Elektropherogrammen detektiert werden. Gründe dafür waren möglicherweise falsch eingesetzte Mengen für GP und seinen Antikörper, so dass der entstandene Immunkomplex unter der Nachweisgrenze lag, dieser im Vergleich mit dem GFP-Signal nicht als solcher identifiziert werden konnte oder ein nach der Markierung nicht mehr funktionierender Antikörper vorlag.

Da die Reaktion zwischen dem Glykoprotein und seinem Antikörper im Westernblott funktioniert, sind weitere Untersuchungen notwendig. Es kann z.B. ein anderer Laser genutzt werden, der die Analyten statt im grünen im roten Bereich anregt. Dabei muss ein anderes Markierungsreagenz wie Texas Red genutzt werden. Die andere Möglichkeit ist, nicht mit LIF zu detektieren, sondern den Antikörper mit einem stark UV-absorbierenden Farbstoff (z.B. 2-Anthrazensulfoylchlorid) zu koppeln. Mit beiden Methoden kann das störende Signal des GFP eliminiert werden.

In dieser Arbeit wurden kapillarelektrophoretische Methoden entwickelt und auf verschiedene Produkte aus Bioprozessen angewendet. Es wurde gezeigt, dass die Kapillarelektrophorese in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt werden kann und gegenüber anderen Analysenmethoden Vorteile bietet. Als Beispiele seien hier kürzere Analysendauer, Automatisierbarkeit der Methode und damit weniger nicht reproduzierbare Fehler, sehr geringe Probenkonzentrationen und geringerer Chemikalienverbrauch genannt.

Weiter verbessert werden kann die Analytik komplizierter Gemische, die z.B. bei einem enzymatischen Abbau von Proteinen entstehen, durch die Kombination verschiedener Analysemethoden wie HPLC, MS, GC und CE. Kopplungen zwischen Kapillarelektrophorese und nachfolgendem Massenspektrometer sind bekannt. Bei der Kopplung anderer Geräte mussten bisher meistens off-line Schritte zwischen den einzelnen Methoden, wie z. B. Um-

füllen, durchgeführt werden. Ziel ist es, auch diese Methoden so koppeln zu können, dass durch Automatisierung Fehler durch die Handhabung einzelner ausgeschlossen werden können.

Ein Lösungsansatz wären hier die immer weiter verbreiteten Elektrophorese-Chips, auf denen viele Analysen parallel ablaufen könnten. Durch entsprechende Konditionierung dieser Chips wäre es möglich, in sehr kurzer Zeit mit minimalem Proben- und Chemikalienverbrauch gleichzeitig Informationen über das Molekulargewicht, die Produktreinheit, den isoelektrischen Punkt und die biologische Reinheit einer Substanz zu erhalten.

12 Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Affinitäts-Kapillarelektrophorese (Affinity Capillary Electrophoresis)
AU	Absorptionseinheiten (Absorption Units)
BSA	Bovine Serum Albumin
CE	Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis)
CEC	Kapillarelektrochromatographie (Capillary Electrochromatography)
CGE	Kapillargelelektrophorese (Capillary Gel Electrophoresis)
CHO	Chinese Hamster Ovary
cIEF	Kapillarisoelektrische Fokussierung (Capillary Isoelectric Focusing)
cITP	Kapillarisotachophorese (Capillary Isotachophoresis)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTAH	Cetyltrimethylammoniumhydroxid
CZE	Kapillaronenelektrophorese (Capillary Zone Electrophoresis)
DTAF	5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GC	Gaschromatographie
GP	Glykoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HPMAC	High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Kapillarchromatographie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	phosphate buffered saline
PDA	Photodiodenarray

PDC	Dipicolinsäure (2,6-Pyridindicarbonsäure)
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units)
tPA	Gewebe Plasminogenaktivator (tissue plasminogen activator)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett

12.2 Material und Methoden

12.2.1 Kapillarelektrophorese Beckman-Coulter P/ACE MDQ [7]

Die Kapillarelektrophorese (CE) P/ACE MDQ der Firma Beckman – Coulter ist über einen A/D-Wandler mit einem Personalcomputer (Intel Pentium III, 500 MHz, 128 MB RAM) verbunden, über den alle Funktionen der CE mittels der Software P/ACE MDQ gesteuert werden können.

Die Kapillarelektrophorese besitzt einen Autosampler, so dass mehrere Messungen hintereinander durchgeführt werden können. Dieser besteht aus vier Tischen, die auf zwei Schienen befestigt und dreidimensional in x-, y- und z-Richtung verschiebbar sind.

Zwei dieser Tische sind für Spüllösungen und Puffer, die anderen zwei, die zwischen 4°C und 60°C temperierbar sind, für die Probengefäße vorgesehen. Wenn die Raumtemperatur zwischen 15°C und 30°C liegt, beträgt die Temperaturstabilität $\pm 1^\circ\text{C}$. Probengefäße gibt es in zwei verschiedenen Größen, bis 100 μL und 100 – 250 μL . Sowohl auf der Inlet- (Kapillaranfang) als auch auf der Outletseite (Kapillarende) stehen für diese Probengefäße 48 Positionen zur Verfügung. Es gibt zwei weitere Einsätze, die Titerplatten gleichen und für 96 Proben geeignet sind.

Die Puffergefäße haben ein Fassungsvermögen von ca. 2 mL, und sowohl auf der Inlet- als auch auf der Outletseite sind 36 Positionen vorhanden.

Die Proben- und Puffergefäße werden pneumatisch angehoben. Die Injektion der Lösungen kann sowohl durch Druck, als auch elektrokinetisch oder durch Vakuum erfolgen. Zur elektrophoretischen Trennung sind zwei Parameter verfügbar. Es kann eine Spannung zwischen 1 kV und 30 kV angelegt werden oder ein Stromstärke, der zwischen 1 μA und 300 μA liegen muss. Die Platinelektroden befinden sich auf gleicher Höhe wie die Kapillarenden. Eine schematische Darstellung der P/ACE MDQ Kapillarelektrophorese zeigt Abb. 12.1.

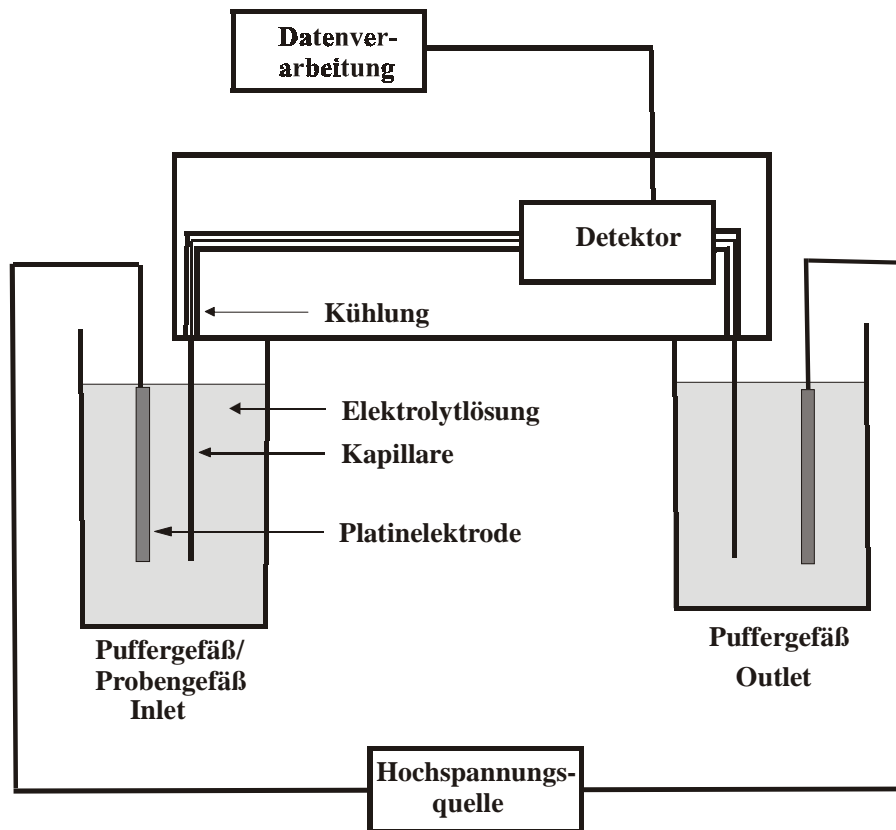


Abb. 12.1: Schematische Darstellung eines Kapillarelektrophoresesystems

Die fused silica Quarzkapillaren (Polymicro Technologies, vertrieben in Deutschland durch Optronis) werden in eine thermostatisierbare Kartusche eingebaut. Der verfügbare Temperaturbereich liegt zwischen 5°C und 30°C und kann mit Kühlflüssigkeit bis auf $\pm 0,1^\circ\text{C}$ konstant gehalten werden.

Die Kapillaren werden vor ihrem ersten Einsatz mit 0,1 molarer Natronlauge angeätzt und vor jedem Elektrolysezyklus je nach Kapillarlänge 1-4 Minuten mit Natronlauge und dem CE-Puffer gespült, nach beendeter Trennung 1-4 Minuten mit bidestilliertem Wasser.

Die Detektion der Analyten erfolgt entweder mit Laser-induzierter Fluoreszenz (3 mW Argonlaser, Beckman) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm oder mit einem Photodiodenarraydetektor, der die Wellenlängen zwischen 190 nm und 600 nm abdeckt und bei dem zugleich die Möglichkeit besteht, bis zu zwei weitere feste Wellenlängen einzustellen.

Die Detektion erfolgt durch ein Fenster in der Kapillare, das in die Polyimidschicht ca. 11 cm vor Kapillarende gebrannt wurde.

Die Kalibration des PDA-Detektors erfolgt nach Anschalten des Gerätes über die „Direct Control“-Funktion der PACE/MDQ-Software. Der Laser wird bei Benutzung nach einer Vorschrift der Firma Beckman-Coulter mit einem dafür vorgesehenen Programm, dem „Calibration Wizard“, kalibriert, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Alle CE-Daten werden ausnahmslos mit einer Rate von 4 Hz aufgenommen.

12.2.2 Cary 50 Photometer der Firma Varian [137]

Bei dem Cary 50 Photometer der Firma Varian handelt es sich um ein 2-Strahlspektrophotometer mit einer Xenon-Blitzlampe. Es deckt den Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 1100 nm ab. Durch den Gebrauch der Xenon-Lampe ist es möglich, Scangeschwindigkeiten bis zu 24000 nm/min zu erreichen, das entspricht bei einem normalen Scanbereich von 300 nm einer Analysendauer von unter einer Minute. Der Festspalt liegt bei 1,5 nm, und als Detektoren dienen zwei Silizium-Dioden. Das Photometer ist unabhängig vom Außenlicht, d.h., die Proben können sowohl bei geschlossenem als auch geöffnetem Probenraum gemessen werden. Des weiteren ist eine Temperierung bei der Probenmessung durch einen externen Thermostat möglich.

12.2.3 Durchführung des ELISA (Testkit Imulyse™ tPA)

1. Ansetzen des Coating Puffers (Puffer zur Immobilisierung von Antikörpern auf Mikrotiterplatten): 0,21 g NaHCO₃ werden in 25 mL Wasser (bidest) gelöst.
2. Herstellung der coating-Lösung: 250 µL „Coat“ (Antikörperkonzentrat) werden auf 25 mL mit Coating-Puffer aufgefüllt.
3. „Coating“: zur Immobilisierung der tPA-Antikörper werden je 200 µL Coating-Lösung mit einer 8 Kanal-Pipette in jede Kavität gefüllt.
4. Inkubieren: die mit Coating-Lösung befüllte Platte wird abgedeckt und 16-18 h bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Waschen: nach erfolgter Inkubation wird die Platte auf einem Fließpapier ausgeschlagen und 4 mal gewaschen. Das Waschen erfolgt derart, dass jede Kavität mit 400 µL PET-Puffer befüllt, 3 Minuten gewartet und die Platte kräftig auf einem Papier ausgeschlagen wird.

6. Ansetzen der tPA-Standardlösungen: 15 μL des tPA-Standards wird mit einem PET-Puffer auf 500 μL zur tPA-Ausgangslösung verdünnt. Tabelle 12.1 gibt die weiteren Verdünnungen der benötigten tPA-Standardlösungen an.

Tab. 12.1: Verdünnungen der tPA-Standardlösungen

tPA-Konzentrationen der Standardlösungen	Volumen tPA-Ausgangslösung [μL]	Volumen PET-Puffer [μL]
30	100	0
24	80	20
18	60	40
12	40	60
6	20	80
3	10	90
1,5	5	95
0	0	100

7. Proben- und Standardlösungen auftragen: 10 μL Probelösung bzw. Standardlösung werden mit einer Pipette in die Kavitäten pipettiert (Doppelbestimmung).
8. Inkubation: Die Platte wird mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und für 3 h bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schütteln inkubiert.
9. Konjugatzugabe: 40 μL Konjugat-Konzentrat werden zu 8 mL mit PET-Puffer verdünnt. 50 μL der Verdünnung werden in jede Kavität pipettiert.
10. Inkubation: Die Platte wird mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.
11. Waschen: wie unter 5. beschrieben
12. Substratzugabe: Das Substrat ortho-Phenyldiamin wird zunächst in 3 mL Wasser (bi-dest) gelöst und dann zu 24 mL verdünnt. Das Substrat sollte 30 Minuten vor Gebrauch gelöst werden. Kurz vor der Substratzugabe werden 10 μL H_2O_2 zugegeben. Jeweils 200 μL dieser Lösung werden mit einer 8-Kanal-Pipette in die Kavitäten pipettiert.
13. Inkubation: 30 Minuten im Dunkeln bei RT.
14. Stoppen der Reaktion und Auswertung: Durch Zugabe von 50 μL 4,5 molarer H_2SO_4 -Lösung wird die Reaktion gestoppt. Nach 10 Minuten (zur Stabilisierung der Farbe) wird bei 495 nm in einem Photometer für Mikrotiterplatten die Extinktion gemessen.

12.2.4 Durchführung des Fluorotag FITC Konjugationsset [96]

1. Herstellung der Natriumcarbonat-bicarbonat Puffers durch Lösen der Chemikalie in 50 ml bidestilliertem Wasser. Der pH-Wert dieser Lösung beträgt 9,0.
2. Vorbereitung von mindestens 0,25 mL Antikörperlösung mit einer Konzentration von 5,0 mg/mL in dem unter 1. hergestelltem 0,1 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer, pH 9,0.
3. 0,2 mL (1,0 mg) der Antikörperlösung werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt.
4. Die FITC-Lösung wird durch Zugabe des FITC in 2 mL 0,1 M Carbonat/Bicarbonat Puffer hergestellt. Dann schütteln, bis sich alles FITC gelöst hat. Die Lösung sollte vor jedem Labelling frisch hergestellt und innerhalb von 5 Minuten verbraucht werden, da wässrige FITC-Lösungen nicht stabil sind. Diese Lösung wird als „20:1 FITC“ bezeichnet und kann nach Bedarf weiter verdünnt werden.
5. Die benötigten Verdünnungen des FITC-Konjugats werden wie in Tabelle 12.2 angegeben durchgeführt.

Tabelle 12.2: Verdünnungen des FITC-Konjugats

Erwartetes Fluorescein/ Protein (F/P) Verhältnis	Kennzeich- nung	0,1 M Natriumcarbonat/ -bicarbonat Puffer	Eingesetzte Menge FITC-Lsg.
3 zu 6	20:1	2,0 mL	20:1 FITC
2 zu 4	10:1	0,5 mL	0,5 mL 20:1 FITC
1 zu 2	5:1	0,75 mL	0,25 mL 20:1 FITC

6. 50 µL der passenden FITC-Verdünnung werden tropfenweise in das entsprechend markierte Gefäß gegeben. Nach Beendigung wird das Gefäß verschlossen und mit Aluminiumfolie abgedunkelt.
7. Das Reaktionsgefäß wird unter leichtem Rühren für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

12.2.4.1 Isolierung des gelabelten Proteins

1. Das PBS (phosphate buffered saline)-Paket wird in einem Liter Wasser gelöst.
2. Die Sephadex-Säule wird über einem Becherglas platziert. Nach Abnehmen der oberen Kappe und Abschneiden der unteren Spitze der Säule läuft die überschüssige Flüssigkeit durch. Die Gefahr des Trockenlaufens der Säule besteht nicht.
3. Die Säule wird mit 6 * 2 mL PBS-Lösung äquilibriert. Bei späterem Gebrauch der Säule werden die obere und untere Kappe wieder aufgesetzt und die Säule bei 0-5°C gelagert.

4. Die Reaktionsmischung wird auf die Säule aufgegeben und der Durchfluss gesammelt.
5. Die Säule wird mit 2,5 mL PBS eluiert, und 0,25 mL Fraktionen werden gesammelt. Die Absorption jeder Fraktion bei 280 nm wird bestimmt. Während der Elution werden zwei Banden sichtbar. Das Konjugat befindet sich in den Fraktionen, die die erste Bande aufweisen.
6. Die Hauptfraktionen werden vereinigt, Fraktionen mit einer Absorption, die bei 280 nm kleiner als 0,2 ist, werden nicht gesammelt.
7. Um ungebundene Fluorophore zu entfernen und um die Säule zu regenerieren, wird diese mit 35 mL PBS-Lösung gewaschen und für längere Lagerzeiten noch einmal mit 10 mL PBS-Lösung, die zusätzlich 0,05 % Natriumazid enthält.
8. Zur Bestimmung des Fluorescein/Protein (F/P)-Verhältnisses wird das Konjugat (wie später beschrieben) photometrisch untersucht.
9. Nach Bestimmung des F/P-Verhältnisses wird dem Konjugat zur stabilen Lagerung 1 % BSA und 0,1 % Natriumazid zugefügt. Das Konjugat wird bei 0-5°C unter Lichtausschluss gelagert.

12.2.4.2 Bestimmung des Fluorescein/Protein Verhältnisses

Das F/P-Verhältnis wird definiert als das Verhältnis der Mole an FITC zu dem der Proteine in dem Konjugat. Um dieses Verhältnis zu bestimmen, muss zuerst die Absorption des Konjugats bei 280 nm und 495 nm bestimmt werden.

1. Das Konjugat wird in einer Quarzküvette vorgelegt. Die Absorption bei 280 nm (A_{280}) und 495 nm (A_{495}) wird ermittelt. Sie sollte bei 280 nm zwischen 0,2 und 1,4 liegen. Befindet sie sich außerhalb dieses Bereichs, muß das Konjugat entsprechend verdünnt werden.
2. Aus den ermittelten Absorptionswerten lässt sich das F/P-Verhältnis anhand der folgenden Formel berechnen:

$$F/P = \frac{2,77 \cdot A_{495}}{A_{280} - (0,35 \cdot A_{495})} \quad (\text{Gl. 12.1})$$

3. Die Proteinkonzentration des Fluorescein-IgG Konjugats wird nach Gl. 12.2 berechnet:

$$\text{IgG}(\text{mg/mL}) = \frac{[A_{280} - (0,35 \cdot A_{495})]}{1,4} \quad (\text{Gl. 12.2})$$

Bei den meisten Formen des IgG liegt die Absorption bei einer Konzentration von 1,0 mg/mL und einem pH-Wert von 7,0 bei 1,4.

12.3 Chemikalien und Puffer

Alanin	Sigma
Arginin	Sigma
Asparagin	Sigma
Asparaginsäure	Sigma
AS-Standard	Sigma
Basic Anion Buffer	Agilent
Borsäure	Fluka
Brij 35	Sigma-Aldrich
Citrat-Puffer	Beckman
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Sigma-Aldrich
Cystein	Sigma
DTAF (5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein	Sigma
FITC (Fluoresceinisothiocyanat), Isomer I	Sigma
Glutamin	Sigma
Glutaminsäure	Sigma
Glycin	Sigma
Gly-Gly-Phe	ICN biomed
HCl	Fluka
Histidin	Sigma
Isoleucin	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Kühlflüssigkeit	Beckman Coulter
Leucin	Sigma
Lysin	Sigma
Methionin	Sigma
0,1 M Natriumcarbonat- Bicarbonatpuffer, pH=9,0	Sigma
Natronlauge	Sigma
PDC (Dipicolinsäure)	Sigma
Phe-Gly-Gly	Sigma
Phe-Gly-Gly-Phe	Sigma
Phe-Gly-Phe-Gly	Sigma
Phenylalanin	Sigma
Phosphathaltige Salzlösung (10 mM NaPO ₄ , 27 mM KCl, 138 mM NaCl, pH=7,4)	Sigma
Phosphorsäure	Fluka
Prolin	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka
Serin	Sigma
Threonin	Sigma
tPA (tissue Plasminogen activator)	Sigma
N-[Tris-(hydroxymethyl)methyl]glycin = Tricine	Sigma
Tryptophan	Sigma
Tyrosin	Sigma
Valin	Sigma

13 Literaturverzeichnis

- [1] Amankwa, L.; Kuhr, W.: On-Line peptide mapping by capillary zone electrophoresis *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2693-2697
- [2] Asche, W.: Gewinnung von t-PA aus E.coli, *Bioeng.* (1989), Nr. 6, S. 43-44
- [3] Ban, E. M.; Kim, D.; Yoo, Y.S.: Separation and determination of neuropeptides in human plasma by capillary zone electrophoresis, *Anal. Sci.* **1997**, 13, 489-492
- [4] Banholczer, A.; Pyell, U.: Some considerations concerning the composition of the mobile phase in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* **2000**, 869, 363-374
- [5] Banks, J. F.: Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2255
- [6] Bao, J.: Capillary electrophoretic immunoassay, *Journal of Chromatography B*, 699 (1997) 463-480
- [7] Beckman: P/ACE System MDQ Installation and Maintenance Manual, **1998**
- [8] Bergman, T.; Agerberth, B.; Jörnvall, H.: Direct analysis of peptides and amino acids from capillary electrophoresis, *FEBS* 283 (1) 100-103 **1991**
- [9] Bietlot, H. P.; Girard, M.: *Journal Chromatogr. A* **1997**, 759, 177-184
- [10] Boss, H.; Rohde, M.; Rush, R.: Multiple sequential fraction collection of peptides and glycopeptides by High-Performance capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry* 230, 123-129 (1995)
- [11] Bossi, P.; Righetti, P.: Generation of peptide maps by capillary zone electrophoresis in isoelectric iminodiacetic acid, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2012-2018
- [12] Bruin, G.J.M.; van Asten, A.C.; Xu, X.; Poppe, H.: *Journal of Chromatography* **1992**, 608, 97-107
- [13] Buch, T.: Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene rekombinante Säugerzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses von Glykoproteinen in Rührkesselreaktoren, *Dissertation*, Universität Hannover, **1997**
- [14] Castagnola, M.; Rossetti, D. V.; Corda, M.; Pellegrini, M.; Misiti, F.; Olianias, A.; Giardina, B.; Messina, I.: *Electrophoresis* **1998**, 19, 2237-2277
- [15] Chan, K.; Janini, G.; Muschik, G.; Isaaq, H.: Laser-induced fluorescence detection of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatized amino acids in capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* 653 (1993) 93-97

- [16] Cifuentes, A.; Poppe, H.: *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2362-2376
- [17] Cohen, A. S.; Najarian, B. L.; Karger, J.: *Journal of Chromatography* **516** (**1990**), 49
- [18] Cohen, A.; Karger, B.: High-performance sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins, *Journal of Chromatography* (**1987**), 409-417
- [19] Crego, A. L.; Martinez, J.; Marina, M. L.: Influence of mobile phase composition on electroosmotic flow velocity, solute retention and column efficiency in open-tubular reversed-phase capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* **2000**, *869*, 329-337
- [20] Dolník, V.; Novotny, M.: Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis, *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 563-567
- [21] El Rassi, Z.: Chiral glycosidic surfactants for enantiomeric separation in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **2000**, *875*, 207-233
- [22] Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.: Capillary electrophoresis – Methods and potentials; Vieweg **1996**
- [23] Engelhardt, H.; Beck, W.; Kohr, J., Schmitt, T.: *Angewandte Chemie* **105** (**1993**), 659
- [24] Erim, F.; Cifuentes, A.; Poppe, H.; Kraak, J.: Short communication: Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethylenimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **708** (**1995**), 356-361
- [25] Fanali, S.: Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation, *Journal of Chromatography A* **1997**, *792*, 1-2, 227-267
- [26] Fanali, S.; Aturki, Z.; Desiderio, C.: Enantioresolution of pharmaceutical compounds by capillary electrophoresis. Use of cyclodextrins and antibiotics. *Enantiomer* **1999**, *4*, 229-241
- [27] Farschaus, J.W.; Ribot, W. J.; Jendrek, S.; Little, S. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 982-991
- [28] Figeys, D.; Aebersold, R.: Capillary electrophoresis of peptides and proteins at neutral pH in capillaries covalently coated with polyethylenimine, *Journal of Chromatography B* **695** (**1997**) 163-168
- [29] Figeys, D.; Gygi, S.; Zhang, Y.; Watts, J.; Gu, M.; Aebersold, R.: Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: Powerful tools for the analysis of proteins and proteomes, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1811-1818

- [30] Finke, R: laufende Dissertation, Universität Hannover, **2002**
- [31] Foret, F.; Fanali, S., Nardi, A., Bocek, P: Capillary zone-electrophoretic separation of cyclodextrins with indirect UV-photometric detection, *Electrophoresis*, 11 (**1990**), 780
- [32] Green, J.; Jorgenson, J.: Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali metal salts to the buffers, *Journal of Chromatography* 478 (**1989**), 63-70
- [33] Guijt-van Duijn, R; Frank, J.; van Dedem, G.; Baltussen, E.: Recent advances in affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis* **2000**, 21, 3905-3918
- [34] Guo, Y.; Colón, L.; Dadoo, R.; Zare, R.: Analysis of underivatized amino acids by capillary electrophoresis using constant potential amperometric detection, *Electrophoresis* **1995**, 16, 493-497
- [35] Guttman, A.; Horváth, J.; Cooke, N.: Influence of temperature on the sieving effect of different polymer matrices in capillary SDS gel electrophoresis of proteins, *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 199-203
- [36] Hage, D. S.: Immunoassays, *Anal. Chem.* 65 (**1993**), 420-424
- [37] Halasz, I.: *Z. Anal. Chem.* 277 (**1975**), 257
- [38] Heegard, N.H.H., *Journal of Chromatography A* 680 (**1994**) 405
- [39] Hjerten, S.: *Chromatography Review* 9 (**1967**), 122
- [40] Hohenester, E.; Sasaki, T.; Olsen, B. R.; Timpl, R.: Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution, *EMBO J.* Mar 16; 17(6):1656-64 (**1998**)
- [41] Hynek, R.; Kašička, V.; Kučerová, Z.; Káš, J.: *J. Chromatogr. B* **1997**, 688, 213-220
- [42] Isaaq, H.; Chan, K.: Separation and detection of amino acids and their enantiomers by capillary electrophoresis: A review, *Electrophoresis* **1995**, 16, 467-480
- [43] John, H.; Preissner, K. T.; Forssmann, W. G., Standker L.: Novel glycosylated forms of human plasma endostatin and circulating endostatin-related fragments of collagen XV, *Biochemistry.* Aug 10; 38 (32):10217-24 (**1999**)
- [44] Jorgensen, J.; Lukacs, K. D.; Capillary zone electrophoresis, *Science*, 222 (**1983**), 266
- [45] Kang, J.; Yang, Y.; You, J.; Ou, Q.: Fast chiral separation of amino acid derivatives and acidic drugs by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis with vancomycin as chiral selector, *Journal of Chromatography A* 825 (**1998**), 81-87

- [46] Kašička, V. in Aboul-Enein, H. Y. (Ed.): Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules, Marcel Dekker, New York **1999**, 39-97
- [47] Kašička, V.: Capillary electrophoresis of peptides, *Electrophoresis* **1999**, 20; 3084-3105
- [48] Klampfl, C.; Buchberger, W.; Turner, M.; Fritz, J.: Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 804 (**1998**), 349-355
- [49] Klampfl, C.; Katzmayer, M.: Determination of low-molecular-mass anionic compound in beverage samples using capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect ultraviolet and conductivity detection, *Journal of Chromatography A* 822 (**1998**), 117-123
- [50] Kohlrausch, F.: Ueber Concentration-Verschiebungen durch Elektrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen, *Ann. Phys. Chem.*, 62 (**1897**), 209
- [51] Koizumi, A.; Morita, T. Murakami, Y. Morita, Y.; Sakaguchi, T. Yokoyama, K.; Tamiya, E.: Enzyme immunosay by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Analytical Chimica Acta* **1999**, 399 (1-2), 63-68
- [52] Koppenhoefer, B.; Zhu, X. F.; Jakob, A.; Wuerthner, S.; Lin, B. C.: Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins, *Journal of Chromatography A* **2000**, 875, 135-161
- [53] Kornfelt, T.; Vinther, A.; Okafo, G.; Camilleri, P.: Improved peptide mapping using phytic acid as ion-pairing buffer additive in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 726 (**1996**), 223-228
- [54] Koutny, L. B.; Taylor, T. A.; Schmalzing, D.; Fuchs, M.: Microchips electrophoretic immunoassay for serum cortisol, *Anal. Chem.* 68 (**1996**), 18
- [55] Knox, J: Thermal effects and band spreading in capillary electroseparation, *Chromatographia*, 26 (**1988**), 329
- [56] Kuhn, R.: Enantiomeric separation by capillary electrophoresis by capillary electrophoresis using a crown ether as chiral selector, *Electrophoresis* **1999**, 20, 2605-2618
- [57] Kuhr, W.; Yeung, E.: Indirect fluorescence detection of native amino acids in capillary zone electrophoresis, *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 1832-1834
- [58] Lagu, A. L.: Applications of capillary electrophoresis in biotechnology, *Electrophoresis* **1999**, 20, 3145-3155

- [59] Lalljie, S.; Sandra, P.: Practical and quantitative aspects in the analysis of FITC and DTAF amino acid derivatives by capillary electrophoresis and LIF Detection, *Chromatographia* Vol. 40, No. 9/10, 519-525
- [60] Lauer, H.; McManigill, D.: Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing, *Analytical Chemistry* **1986**, 58, 166-170
- [61] Lausch, R.; Scheper, T.; Reif, O.; Schlösser, J.; Fleischer, J.; Freitag, R.: Rapid capillary gel electrophoresis of proteins, *Journal of Chromatography A* 654 (**1993**), 190-195
- [62] Lee, Y.; Lin, T.: Capillary electrophoretic determination of amino acids with indirect absorbance detection, *Journal of Chromatography A* 680 (**1994**), 287-297
- [63] Lee, Y.; Lin, T.: Capillary electrophoretic determination of amino acids Improvement by cyclodextrin additives, *Journal of Chromatography A* 716 (**1995**), 335-346
- [64] Lewis, K. C.; Opitck, G. J.; Jorgenson, J. W.; Sheely, D. M.: Comprehensive online RPLC-CZE-MS of peptides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, 8, 495-500
- [65] Liu, J.; Cobb, K.; Novotny, M.: Separation of precolumn o-phthalaldehyde-derivatized amino acids by capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions in the presence of organic modifiers, *Journal of Chromatography* 468 (**1988**) 55-65
- [66] Liu, M.-S.; Evangelista, R. A.; Chen, F. T. A.: HPCE 96, Poster 304, Orlando, FL, January 21-25, **1996**
- [67] Liu, Y.; Fu, R.; Gu, J.: Capillary zone electrophoretic separation of proteins using a column coated with epoxy polymer, *Journal of Chromatography A* 694 (**1995**), 498-506
- [68] Liu, Y.; Schneider, M.; Sticha, C.; Toyooka, T.; Sweedler, J.: Separation of amino acid and peptide stereoisomers by nonionic micelle-mediated capillary electrophoresis after chiral derivatization, *Journal of Chromatography A* 800 (**1998**), 345-354
- [69] Louwagie, M.; Rabilloud, T.; Garin, J.: Use of ethanolamine for sample stacking in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* **1998**, 19, 2440-2444
- [70] Macka, M.; Johns, C.; Doble, P.; Haddad, P.: Indirect photometric detection in CE using buffered electrolytes- Part I, principles, *LC*GC* Vol. 19 Number 1 January **2001**
- [71] Mazzeo, J.; Krull, I.: Coated capillaries and additives for the separation of proteins by capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing, *BioChromatography* Vol. 10, No. 5 (**1991**)

- [72] Mattusch, J.; Dittrich, K.: Improvement of laser-induced fluorescence detection of amino acids in capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 680 (1994), 279-285
- [73] Mazzeo, J.; Krull, I.: Capillary isoelectric focusing of proteins in uncoated fused-silica capillaries using polymeric additives, *Analytical Chemistry* 63 (1991), 2852-2857
- [74] McCormick, R.: Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries, *Analytical Chemistry* 60 (1988), 2322-2328
- [75] Messana, I.; Rossetti, D. V.; Cassiano, L.; Misiti, F.; Giardina, B.; Castagnola, M.: *J. Chromatogr. B* 1997, 699, 149-171
- [76] Michalski, W.; Shiell, B.: Strategies for analysis of electrophoretically separated proteins and peptides, *Analytica Chimica Acta* 1999, 383, 27-46
- [77] Miksík, I.; Deyl, Z.: Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis in acid buffers containing high concentrations of surfactants, *Journal of Chromatography A* 852 (1999), 325-336
- [78] Miura, M.; Kawamoto, K.; Funazo, K.; Tanaka, M.: Chiral separation of several amino acid derivatives by capillary zone electrophoresis with selectivity acetylated β -cyclodextrin derivatives, *Analytica Chimica Acta* 373 (1998), 47-56
- [79] Novotny, M.; Cobb, K.; Liu, J.: Recent advances in capillary electrophoresis of proteins, peptides and amino acids, *Electrophoresis* 1990, 11, 735-749
- [80] Parekh, R. B.; Dwek, R. A.; Thomas, J. R.; Opdenakker, G.; Rademacher, T. W.: Cell-Type-Specific and Site-Specific N-Glycosylation of Type I and Type II Human Tissue Plasminogen Activator, *Biochem.* (1989), Nr. 28, S. 7644-7662
- [81] Petoney, S. L.; Zare, R. N.; Quint, J. F.: Semiconductor radioisotope detector for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 480 (1989), 259
- [82] Preston, L.; Weber, M.; Murray, G.: Micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorimetric detection of amines in beer, *Journal of Chromatography B* 695 (1997), 175-180
- [83] Renemann, G.: Prozessoptimierung und Onlineanalytik bei Tierzellkultivierungen, *Dissertation*, Universität Hannover, 2001
- [84] Rickard, E. C. ; Towns, J. K. in: Karger, B. L.; Hancoc, W. S. (Eds.), *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Pt B*, Academic Press, Totowa 1996, 237-264

- [85] Ridge, S.; Hettiarachchi, K.: Peptide purity and counter ion determination of bradykinin by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 817 (1998), 215-222
- [86] Riekkola, M.; Jussila, M.; Porras, S.; Valkó, I.: Non-aqueous capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 892 (2000), 155-170
- [87] Riechel, P.: Methodenentwicklung zur Bestimmung von Antikörpern mit Hilfe der Affinitätskapillarelektrophorese, *Diplomarbeit*, Universität Hannover, 1994
- [88] Riechel, P.: Entwicklung und Einsatz kapillarelektrophoretischer Methoden zur Produktkontrolle wirtschaftlich und pharmazeutisch relevanter Proteine und Wirkstoffe aus der biotechnologischen Produktion, *Dissertation*, Universität Hannover, 1997
- [89] Righetti, P.; Bossi, A.: Review: Isoelectric focusing of proteins and peptides in gel slabs and in capillaries, *Analytica Chimica Acta* 372 (1998), 1-19
- [90] Righetti, P.; Nembri, F.: Capillary electrophoresis of peptides in isoelectric buffers, *Journal of Chromatography A* 772 (1997), 203-211
- [91] Romano, J.; Jandik, P.; Jones, W. R.; Jackson, P.E.: Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples, *J. Chromatogr.* 546 (1991), 411
- [92] Sasaki, T.; Larsson, H.; Kreuger, J.; Salmivirta, M.; Claesson-Welsh, L.; Lindahl, U.; Hohenester, E.; Timpl, R.: Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin, *EMBO J.* Nov 15;18(22): 6240-8 (1999)
- [93] Schell, T.; Mohr, H.: Biotechnologie-Gentechnik: Eine Chance für neue Industrien Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1994, S. 70-71
- [94] Schultz, N.; Kennedy, R.: Rapid immunoassays using capillary electrophoresis with fluorescence detection, *Anal. Chem.* 1993, 65, 3161-3165
- [95] Schwer, C.; Lottspeich, F.: Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems, *Journal of Chromatography* 623 (1992), 345-355
- [96] Sigma Product Information Fluorotag FITC Conjugation Kit, Stock No. FITC-1
- [97] Smith, J. M.: Chemical engineering kinetics, 3. Auflage, *Mc Graw Hill*, New York, 1981
- [98] Smith, J.: Developments in amino acid analysis using capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 1997, 18, 2377-2392

- [99] Smith, J.: Recent advancements in amino acid analysis using capillary electrophoresis, *Electrophoresis* **1999**, 20, 3078-3083
- [100] Soga, T.; Heiger, D.: Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry* 261, 73-78 (**1998**)
- [101] Soga, T.: Simultaneous analysis of inorganic anions, amino acids and carbohydrates using the Agilent Basic Anion Buffer Application note
- [102] Soga, T.; Ross, G.: Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: effect of electrolyte's complexing ability, *Journal of Chromatography A* 767 (**1997**), 223-230
- [103] Soga, T.; Ross, G.: Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 837 (**1999**), 231-239
- [104] Sowell, J., Parihar, R., Patonay, G.: Capillary electrophoresis-based immunoassay for insulin antibodies with near-infrared laser induced fluorescence detection, *Journal Chromatography B: Biomedical Science Application* **2001** 752 (1), 1-8
- [105] Staller, T. D.; Sepaniak, M. J.: Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 18 (**1997**), 2291
- [106] Strege, M.; Lagu, A.: Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused-silica capillaries, *Analytical Chemistry* 63 (**1991**), 1233
- [107] Strein, T.; Poechmann, J.; Prudenti, M.: Micellar electrokinetic capillary chromatography in the undergraduate curriculum: Separation and identification of the amino acid residues in an unknown dipeptide using Fmoc derivatization, *Journal of Chemical Education* Vol. 76 No. 6 June **1999**
- [108] Sun, P.; Barker, G.; Mariano, G.; Hartwick, R.: Enhanced chiral separation of dansylated amino acids with cyclodextrin-dextran polymer network by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* **1994**, 15, 793-798
- [109] Tao, L.; Kennedy, R. T.: Online competitive immunoassay for insulin based on capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Anal. Chem.* 68 (**1996**), 3899
- [110] Tao, L.; Schultz, N. M.; Kennedy, R. T.: HPCE 96, Poster 314, Orlando, FL., January 21-25, **1996**
- [111] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, A.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: *Analytical Chemistry* 66 (**1994**), 20

- [112] Thornton, M.J.; Fritz, J.S.; Klampfl, C.W.: Separation of native amino acids at low pH by capillary electrophoresis, *Journal of High resolution Chromatography* **1997**, 20, 647-652
- [113] Tsuji, K.: High-performance capillary electrophoresis of proteins: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel-filled capillary column for the determination of recombinant biotechnology derived proteins, *Journal of Chromatography* 550 (**1991**), 823-830
- [114] Végvari, A.; Schmid, M.; Kilár, F.; Gübitz, G.: Chiral separation of alpha-amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using N-(2-hydroxy-octyl)-L-4-hydroxyproline as a selector, *Electrophoresis* **1998**, 19, 2109-2112
- [115] Veillon, J.F.; Ramon, C.; Bihoreau, N. in : Parvez, H. ; Caudy, P. ; Parvez, S. ; Roland-Gosselin, P. (Eds.) : *Capillary Electrophoresis in Biotechnology and Environmental Analysis*, VSP, Utrecht **1997**, 155-172
- [116] Veraart, J. R.; Kok, S. J.; Tekoppele, J. M., Gooijer, C.; Lingeman, H.; Velthorst, N. H.; Brinkman, U. A. T.: *Biomed. Chromtogr.* **1998**, 12, 226-231
- [117] Vespalec, R.; Boček, P.: Chiral separations in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* **1999**, 20, 2579-2591
- [118] Voegel, P. D.; Baldwin, R.P.: Electrochemical detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 18, (**1997**), 2267
- [119] Vogt, K.: Kapillarelektrophorese, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 46 (**1998**) Nr.11
- [120] Von Heeren, F., Thormann, W.: Capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis, *Electrophoresis*, 18 (**1997**), 2415
- [121] Wan, H.; Blomberg, L.: Optimized chiral separation of 20 amino acids derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate using cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatographic Science* Vol. 34, December **1996**
- [122] Wang, Q.; Luo, G.; Wang, Y.; Yeung, W.: Capillary electrophoresis based immunoassay for monoclonal antibody with diode laser induced fluorescence detection, *Analytical Letters* **2000** 33 (4), 589-602
- [123] Whang, C.; Yeung, E.: Temperature programming in capillary zone electrophoresis, *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 502-506
- [124] Widhalm, A.; Schwer, C.: Capillary zone electrophoresis with a linear, non-cross-linked polyacrylamide gel: separation of proteins according to molecular mass, *Journal of Chromatography* 549 (**1991**), 446-451
- [125] Wild, D.: *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press, **1994**

- [126] Wu, C.; Lopes, T.; Patel, B.; Lee, C.: Effect of direct control of electroosmosis on peptide and protein separations in capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 886-891
- [127] Wu, S.; Dovichi, N.: High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography* **480** (1989), 441-455
- [128] Wu, S. L.: The use of sequential high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis to separate the glycosylated peptides from recombinant tissue plasminogen activator to a detailed level of microheterogeneity, *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 85-97
- [129] Yarabe, H. H.; Billiot, E.; Warner, I. M.: Enantiomeric separations by use of polymeric surfactant elektrokinetic chromatography, *Journal Chromatography A* **2000**, 875, 179-206
- [130] Ye, J.; Baldwin, R.: Determination of amino acids and peptides by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode, *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 2669-2674
- [131] Zahou, E.; Jörnvall, H.; Bergman, T.: Amino acid analysis by capillary electrophoresis after phenylthiocarbamylation, *Analytical Biochemistry* **281**, 115-122 (2000)
- [132] Zhou, J.; Lunte, S.: Direct determination of amino acids by capillary electrophoresis / electrochemistry using a copper microelectrode and zwitterionic buffers, *Electrophoresis* **1995**, 16, 498-503
- [133] Zhou, H.; Miller, A.; Sosic, Z. ; Bucholz, B., Barron, A; Kotler, L.; Karger, B.: DNA sequencing up to 1300 bases in two hours by capillary electrophoresis with mixed replaceable linear polyacrylamide solutions, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1045-1052
- [134] Horst Ibelgaufft : Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia; online im Internet: [<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?2016>], letzter Abruf: 19.03.2002
- [135] Swisstox: Neues Krebsmedikament hungert Tumore aus: online im Internet: http://www.swisstox.net/de/news_d.php?st_lang_key=de&st_news_id=181, letzter Abruf: 19.03.2002
- [136] Halim, N. S.: Small Molecules in Large Proteins; The Scientist; online im Internet: http://www.the-scientist.com/yr2000/aug/research_000821.html letzter Abruf: 19.03.2002
- [137] Varian: Product Information: online im Internet: <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?varinc/docs/>; letzter Abruf: 19.03.2002

- [138] Joselito P. Quirino: On-line concentration of analytes in electrokinetic chromatography; IUPAC; online im Internet: <http://www.iupac.org/news/prize/2000/quirino.html>;
letzter Abruf: 19.03.02

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Simona Frerichs, geb. Becker

geboren am 08. August 1973 in Langenfeld

verheiratet

Schulbildung:

1979 - 1981	Grundschule Diepholz
1981 - 1983	Grundschule Karlstraße, Holzminden
1983 - 1985	Orientierungsstufe Billerbeck, Holzminden
1985 - 1989	Gymnasium Wilhelmstraße, Holzminden
1989 - 1992	Gymnasium Landschulheim am Solling, Holzminden

Abschluß: Abitur (Note 2,3)

Berufsausbildung:

seit 1. Oktober 1992	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
16.06.1995	Vordiplom, Note „Gut“
02.06.1998	Diplom, Note „Gut“
Seit Januar 1999	Promotion im Fach Chemie
Juni 2002	Promotionsprüfung im Fach Chemie