

Untersuchung der Kaskadenreaktion von Glukose-Oxidase und Meerrettich- Peroxidase in räumlich definierten Anordnungen auf der Nano- und Mikrometerskala

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der
Technischen Universität Dortmund

Vorgelegt von:

Dipl.-Chem., Dipl.-Mus. Päd., Dipl. Musiker, M. Mus. Joachim Müller
aus Lüdenscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Christof M. Niemeyer
2. Prof. Dr. Daniel Rauh

Datum der Abgabe: 12.09.2017
Datum der Disputation: 26.10.2017

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Müller, Joachim

77625

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, 16.7.2018

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Untersuchung der Kaskadenreaktion von Glukose-Oxidase und Meerrettich-Peroxidase in räumlich definierten Anordnungen auf der Nano- und Mikrometerskala

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund, 16.7.2018

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

- 1) "Kinetic Analysis of Semisynthetic Peroxidase Enzymes Containing a Covalent DNA-Heme Adduct as the Cofactor" Ljiljana Fruk, Joachim Müller and Christof M. Niemeyer, *Chemistry - A European Journal* 2006, 12, 28, 7448 – 7457.
- 2) "DNA-Directed Immobilization of Horseradish Peroxidase-DNA Conjugates on Microelectrode Arrays: Towards Electrochemical Screening of Enzyme Libraries" Ljiljana Fruk, Joachim Müller, Günther Weber, Arántzazu Narváez, Elena Domínguez and Christof M. Niemeyer, *Chemistry - A European Journal* 2007, 13, 18, 5223 – 5231.
- 3) "DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes" Joachim Müller and Christof M. Niemeyer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 377, 1, 62 – 67.
- 4) "Screening For Cytochrom P450 Reactivity Harnessing Catalase as Reporter Enzyme" Kersten S. Rabe, Mark Spengler, Michael Erkelenz, Joachim Müller, Valerie J. Gandubert, Heiko Hayen, and Christof M. Niemeyer, *ChemBioChem* 2009, 10, 4, 751 – 757.
- 5) "Adressable Microfluidic Polymerchip for DNA-Directed Immobilization of Oligonucleotide-Tagged Compounds" Hendrik Schroeder, Linda Hoffmann, Joachim Müller, Petra Alhorn, Markus Flegler, Andreas Neyer and Christof M. Niemeyer, *Small* 2009, 5, No. 13, 1547 – 1552.
- 6) "Cascades in Compartments: En route to Machine-Assisted Biotechnology" Kersten S. Rabe, Joachim Müller, Marc Skoupi and Christof M. Niemeyer, *Angewandte Chemie International Edition* 2017, 56, 44, 13574 – 13589

Ohne Musik wäre das Leben ein Irrtum.
(Friedrich Wilhelm Nietzsche)

Meiner Familie und meinen Freunden

Danksagungen

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christof M. Niemeyer, für die Begleitung und Unterstützung dieser Dissertation, die ich in seinem Arbeitskreis durchführen durfte. Besonders erwähnen möchte ich die exzellenten Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit zur selbständigen wissenschaftlichen Arbeit, sowie die vielen Freiheiten und das entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Daniel Rauh für die Übernahme des Koreferats und Prof. Dr. Roland Winter für den Vorsitz der Kommission.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei zwei Kollegen bedanken, Dr. Ljiljana Fruk und Dr. Max Glettenberg, für die kleinen Hilfestellungen im Labor, die vielen Diskussionen und den Spaß während und nach der Arbeit: DDI forever! Außerdem möchte ich Dr. Mark Spengler, Dr. Michael Erkelenz, Dr. Kersten Rabe, Dr. Marc Skoupi, Thomas Kampe, Dr. Jessica Irrgang und Dr. Giuseppe Arrabito für die herzliche und kreative Arbeitsatmosphäre danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Jörg Seehafer und Dr. Jessica Irrgang für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei allen (ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitsgruppe Niemeyer für die tolle Zeit bedanken. Neben dem wissenschaftlichen Austausch werde ich auch die sozialen Aktivitäten wie Weihnachtsfeiern (Karaoke!), Retreats und Kohlfahrten vermissen.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Enzymkaskaden	1
1.1.1	Natürliche Multienzymkomplexe	1
1.1.2	Substrate Channeling	3
1.2	Künstliche Multienzymkomplexe	5
1.2.1	Multienzymkomplexe durch Fusionsproteine	5
1.2.2	Multienzymkomplexe auf Basis der DNA-Nanotechnologie	6
1.3	Enzymkaskaden im Mikrofluidischen Reaktor	9
1.3.1	Mikrofluidik	9
1.3.2	Herstellung von mikrofluidischen Reaktoren	10
1.3.3	Immobilisierungsmethoden	12
1.3.4	Immobilisierte Enzymkaskaden in der Mikrofluidik	14
1.4	Das GOX/HRP-Modellsystem	17
1.5	Aufgabenstellung	19
2	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	21
2.1	DNA-Enzymkonjugate	21
2.1.1	Synthese und Aufreinigung von DNA-Enzymkonjugaten	21
2.1.2	Kinetische Untersuchungen der DNA-Enzymkonjugate	24
2.1.2.1	Reaktionsmechanismus von Meerrettich-Peroxidase (HRP)	24
2.1.2.2	Kinetik von HRP-Konjugaten in Lösung	28
2.1.2.3	Reaktionsmechanismus von Glukose-Oxidase	30
2.1.2.4	Kinetik von GOX-Konjugaten in Lösung	32
2.1.2.5	Untersuchungen der Konjugate auf STV-Platten	33
2.2	Räumlich definierten Anordnungen der GOX- und HRP-Konjugate auf DNA-Gerüsten	36
2.2.1	Anordnung mittels Trägeroligonucleotid in Lösung	37
2.2.1.1	Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Komplexbildung	38

2.2.1.2	Kinetische Untersuchungen _____	42
2.2.2	Direkte Kopplung komplementärer DNA-Enzymkonjugate _____	46
2.2.2.1	Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Komplexbildung __	47
2.2.2.2	Kinetische Untersuchungen _____	48
2.2.3	Alternierende Anordnung auf einer ausgedehnten linearen Hexagonträgerstruktur _____	50
2.2.4	Definierte Koimmobilisierung auf DNA-funktionalisierten Oberflächen _	52
2.2.5	Diskussion der Ergebnisse aus theoretischer Sicht _____	59
2.3	Immobilisierung von Enzymen auf Mikropartikeln _____	66
2.3.1	Biotinylierung der Enzyme _____	66
2.3.2	Bestimmung des optimalen Immobilisierungsverhältnisses _____	68
2.3.3	Bestimmung der Beladung aus dem Überstand _____	71
2.3.4	Kinetik der enzymbeladenen Mikropartikel nach Michaelis Menten ____	74
2.4	Der Mikrofluidische Reaktor _____	78
2.4.1	Design des mikrofluidischen Reaktors _____	79
2.4.2	Herstellung des mikrofluidischen Reaktors _____	80
2.4.3	Befüllen des mikrofluidischen Reaktors _____	82
2.4.4	Quantifizierung der Partikelzahl einer Schüttung _____	87
2.5	Mikrofluidik mit HRP-funktionalisierten Partikeln _____	89
2.5.1	Experimente mit konstanter Flussrate und konstanter Konzentration ____	90
2.5.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen _____	95
2.5.3	Variation der Flussrate _____	97
2.5.3.1	Das Flussratenprofil _____	98
2.5.3.2	Mikrofluidikexperimente mit HRP mit 100 μM H_2O_2 _____	101
2.5.3.3	Mikrofluidikexperimente mit HRP bei 0 – 40 μM H_2O_2 ____	106
2.5.3.4	Auswertung nach Michaelis Menten _____	113
2.6	Mikrofluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln _____	128
2.6.1	Variation der Flussrate _____	128
2.6.2	Variation der Flussrate und der Konzentration _____	140

2.7	Mikrofluidik mit GOX- und HRP-funktionalisierten Partikeln	151
2.7.1	Berechnungen der zweistufigen Enzymkaskade	151
2.7.2	Variation der Flussrate	158
2.7.3	Variation der Konzentration und der Flussrate	167
2.7.3.1	Das Flussratenprofil	167
2.7.3.2	Mikrofluidikexperimente und Auswertung nach Michaelis Menten	169
3	Zusammenfassung und Ausblick	188
4	Material und Methoden	192
4.1	Material	192
4.1.1	Chemikalien	192
4.1.2	Proteine	192
4.1.3	Oligonucleotide	193
4.1.4	Puffer und Lösungsmittel	193
4.1.5	Sonstige Materialien	194
4.2	Instrumentation	195
4.2.1	Chromatographie	195
4.2.2	Spektroskopie	195
4.2.3	Elektrophorese	195
4.2.4	Mikrotiterplattenleser	195
4.2.5	Fluoreszenzmikroskopie	196
4.2.6	Mikrofluidik	196
4.2.7	Software	196
4.2.8	Weitere Materialien und Geräte	196
4.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	198
4.3.1	Enzymmodifikationen	198
4.3.1.1	Synthese von DNA-Enzymkonjugaten	198
4.3.1.2	Synthese von DNA-Enzymkonjugaten nach Willner	198
4.3.1.3	Biotinylierung der Enzyme für die Mikrofluidik	199
4.3.2	Gelelektrophorese	199

4.3.2.1	Gradientengele _____	199
4.3.2.2	Gelelektrophorese mit 8,5 % Polyacrylamid _____	200
4.3.2.3	Visualisierung _____	201
4.3.3	Methoden zur Immobilisierung der Enzyme _____	202
4.3.3.1	Herstellung von Streptavidin-Platten _____	202
4.3.3.2	DNA-vermittelte Immobilisierung der DNA-Enzymkonjugate _____	202
4.3.3.3	Direkte Immobilisierung der biotinylierten Enzyme _____	203
4.3.3.4	Immobilisierung auf STV-beschichteten Mikropartikeln _____	203
4.3.4	DNA-vermittelte Assemblierung der Enzymkaskade in Lösung _____	204
4.3.4.1	Anordnung auf einem Trägeroligonucleotid _____	204
4.3.4.2	Direkte Kopplung komplementärer DNA-Enzymkonjugate _____	204
4.3.4.3	Assemblierung der Hexagonstruktur nach Willner _____	205
4.3.5	Kinetikmessungen in der Mikrotiterplatte _____	205
4.3.5.1	Kinetikmessungen mit HRP-Konjugaten bei variabler Amplex Red Konzentration _____	205
4.3.5.2	Kinetikmessungen mit bHRP bei variabler H ₂ O ₂ -Konzentration _____	206
4.3.5.3	Kinetikmessungen mit GOX bei variabler Glukosekonzentration _____	207
4.3.5.4	Datenaufnahme im Mikrotiterplattenleser _____	208
4.3.6	Zählen der Partikel _____	208
4.3.7	Herstellung der Mikroreaktoren _____	209
4.3.8	Mikrofluidik _____	211
4.3.8.1	Vorbereitungen _____	211
4.3.8.2	Aufbau des Reaktors _____	212
4.3.8.3	Befüllen des Reaktors _____	213
4.3.8.4	Messungen im Reaktor _____	214
4.3.8.5	Erstellen der Flussratenprofile _____	215
4.3.9	Aufnahme der Kalibrierkurve im Fluoreszenzmikroskop _____	218
5	Literatur _____	221
6	Anhang _____	231

Abkürzungsverzeichnis

A	Edukt A
A1, A2	Auswertungsbereich 1, 2
A_λ	Absorption bei Wellenlänge λ
ABTS	2,2' Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
AH ₂	Reduzierendes Substrat für Peroxidasen
Amplex Red	N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin
aq	gelöst
<i>b</i>	Breite
BK	Bienzymatischer Komplex
bp	Basenpaare
bHRP	biotinylierte HRP
bGOX	biotinylierte GOX
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
CAD	Computer aided Design
Cat	Katalase
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
DDI	DNA-vermittelte Immobilisierung (DNA-directed Immobilization)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSK	Doppelstrangkonjugat
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
E1, E2, E3...	Experiment 1, 2, 3...
[E] ₀	Gesamtenzymkonzentration
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalente
ESI	Elektrospray Ionisation
F1, F2, F3	Fritte 1, 2, 3

FAS	Fettsäure-Synthase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Förster -Resonanzenergietransfer
[G]	Glukosekonzentration
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GOX	Glukose-Oxidase
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
HS-DNA	DNA aus Heringssperma
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
$k, k_1, k_3, k_{bulk}, k_{total}...$	Geschwindigkeitskonstanten
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K_M	Michaeliskonstante
KPi	Kaliumphosphat Puffer
KPi300	Kaliumphosphat Puffer mit 300 mM Kochsalz
KPi300BDF	KPi300 mit Zugabe von DNA und BSA , anschließend filtriert
l	Länge
λ	Wellenlänge des Lichtes
M	molar (mol/L)
MTP	Mikrotiterplatte
N	Partikelzahl
N_A	Avogadro-Konstante
nHRP	native HRP
nGOX	native GOX
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NRPS	Nichtribosomale-Peptidsynthetase
P	Produkt
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PDMS	Polydimethylsiloxan
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionen Konzentration

pI	isoelektrischer Punkt
PKS	Polyketid-Synthase
Q	(Volumen-)flussrate
Q_u, Q_r	(Volumen-)flussrate von unten bzw. von rechts
r	Reaktionsrate
$\Delta[\text{Res}]$	Umsatz von Resorufin
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S1, S2, S3	Seitenkanal 1, 2, 3
SDS	Natriumdodecylsulfonat (Sodium Dodecylsulfonate)
sEMCS	N-(ϵ -Maleimidocapropyloxy)-sulfosuccinimidester
sSMCC	sulfo-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyhlohexan-1-carboxylat
STV	Streptavidin
t	Zeit
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris EDTA
TETBS	Tween20/EDTA/TBS
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
VD	Verdränger-Duplex
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit nach Michaelis Menten

Für die Oligonucleotide werden die Standardabkürzungen der Basen (A, C, G, T) verwendet

1 Einleitung

1.1 Enzymkaskaden

Enzyme sind vielseitige Biokatalysatoren, ohne die Leben nicht möglich wäre. Sie zeichnen sich durch ihre große Vielfalt und ihre hohe Selektivität und Spezifität aus. Bei komplexen biologischen Prozessen, wie dem Stoffwechsel, der Signaltransduktion oder der Vermehrung, ist eine Vielzahl von Enzymen beteiligt, die perfekt aufeinander abgestimmt reagieren. Die Kontrolle der fast unendlichen Zahl möglicher Reaktionswege ist nur durch einen hohen Grad an Selbstorganisation innerhalb der Zelle möglich. So befinden sich die beteiligten Enzyme und Substrate häufig in räumlich getrennten Kompartimenten, die verschiedenste Stoffwechselreaktionen auf engstem Raum ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Multienzymkomplexen, bei denen der Reaktionspfad durch die Anordnung der aktiven Zentren auf molekularer Ebene gesteuert wird.^[1]

1.1.1 Natürliche Multienzymkomplexe

Multienzymkomplexe sind schon seit langem Gegenstand der Forschung.^[2] Die bekanntesten Beispiele sind die Fettsäure-Synthase (FAS),^[3] Polyketid-Synthase (PKS) und die nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS).^[4, 5] Das wachsende Produktmolekül ist meist, wie in Abbildung 1A verdeutlicht, an einem „Schwingarm“ in zentraler Position fixiert und wird wie bei einem Fließband von einer Vielzahl von aktiven Zentren modifiziert und verlängert.^[6] Jeder einzelne Schritt wird von einer unabhängig gefalteten Domäne katalysiert, die wiederum in Form von Modulen angeordnet sind, die wiederum in der Reihenfolge der Reaktion in der Polypeptidkette organisiert sind. Für PKS und NRPS ist somit eine extreme Vielzahl an Zielmolekülen möglich und es wurde versucht, durch LEGO-artige Variation der Genfragmente die Reaktionsfolge zu steuern.^[7]

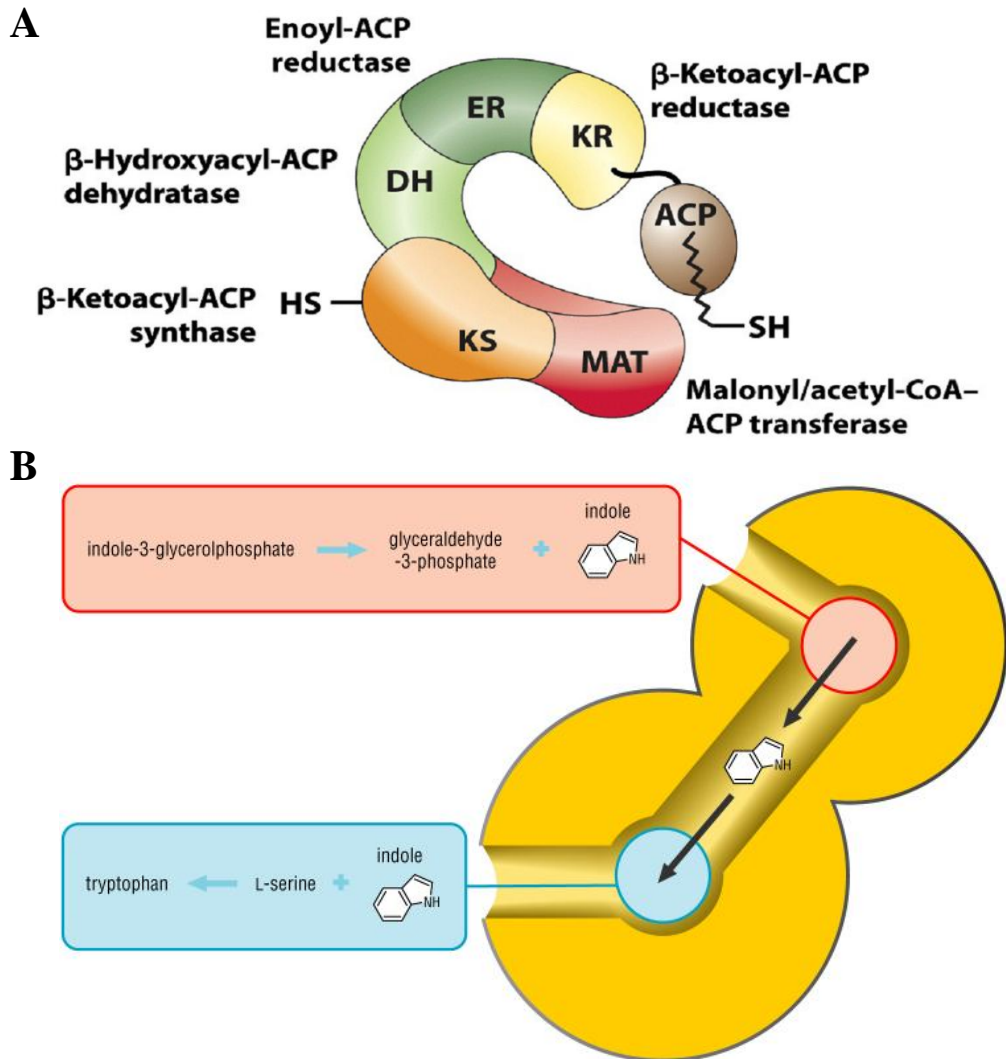


Abbildung 1: Beispiele natürlicher Multienzymkomplexe: **A**: Die Fettsäuresynthese besteht aus vielen katalytisch aktiven Untereinheiten. Das Intermediat ist während aller Modifikationen und Strangverlängerungen über einen Schwingarm kovalent mit dem Enzym verknüpft. Abbildung aus Lehninger, Principles of Biochemistry.^[8] **B**: Die Tryptophansynthase enthält einen intramolekularen Tunnel, der die aktiven Zentren verbindet und den schnellen Transport des Intermediats Indol ermöglicht. Abbildung aus ^[9].

Ein weiteres prominentes Beispiel ist die in Abbildung 1B schematisch dargestellte Tryptophan-Synthase, in der zwei katalytische Zentren durch einen etwa 2,5 nm langen hydrophoben Tunnel verbunden sind.^[10] Am ersten aktiven Zentrum wird Indol gebildet, das als Intermediat durch den Kanal zum zweiten aktiven Zentrum diffundiert und dort mit Serin zu Tryptophan kondensiert. Der Transport durch den Tunnel erfolgt extrem schnell ($>1000 \text{ s}^{-1}$) und wird durch eine Konformationsänderung gesteuert, die durch Bindung des Substrats am aktiven Zentrums ausgelöst wird.^[11] Kinetische Untersuchungen mit einem geblocktem

Tunnel führten zur fast vollständigen Unterdrückung der Reaktion, was beweist, dass das Indol nicht durch die Bulklösung, sondern fast ausschließlich durch den Tunnel diffundiert.^[12] Dieser Effekt der „Kanalisation“ wird auch als „Substrate Channeling“ bezeichnet. Der englische Fachbegriff hat sich auch in deutschsprachiger Fachliteratur durchgesetzt.

1.1.2 Substrate Channeling

Das Substrate Channeling, das auch als „erleichterter Transport“ bzw. „facilitated transport“ in der Literatur beschrieben wird, tritt in vielen Multienzymkomplexen auf. Das Hauptmerkmal ist dabei der direkte Transfer des Intermediats vom ersten zum zweiten aktiven Zentrum oder Enzym ohne in die Bulklösung zu entweichen.^[13] Daraus ergeben sich gegenüber den frei diffundierenden Enzymen folgende Vorteile.^[14, 15]

- 1) Verkürzung der Transitzeit des Intermediats von einem zum nächsten aktiven Zentrum.
- 2) Schutz von chemisch labilen Intermediaten
- 3) Umgehen ungünstiger Gleichgewichtslagen
- 4) Abschottung vor kompetitiven Enzymreaktionen

Aus den Punkten 2 und 4 wird deutlich, dass die Zelle dadurch vor toxischen Intermediaten geschützt wird. Alle vier genannten Punkte ermöglichen die Kontrolle des biochemischen Reaktionspfads vergleichbar mit der in Abschnitt 1.1 genannten Kompartimentierung.

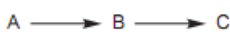
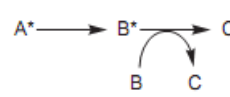
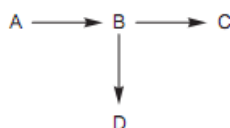
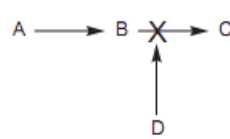
Bei Multienzymkomplexen erfolgt die Kompartimentierung zum einen durch räumliche Limitierung der Diffusion, wie bei der Tryptophan-Synthase in Form eines eindimensionalen Tunnels, zum anderen durch „virtuelle Kompartimente“ z. B. durch zweidimensionale Begrenzungen der Diffusion entlang von Hydrathüllen oder elektrisch geladenen Bereichen von Grenzflächen, Membranen und Proteinoberflächen.^[16]

Eine nahezu vollständige Einschränkung der Diffusion des Intermediats wird durch kovalente Bindung an ein Trägerprotein oder einen Schwingarm erreicht, wie bei den oben beschriebenen Beispielen FAS, PKS und NRPS diskutiert wurde.

Neben der Diffusion kann auch die Auswahl der Reaktionspartner eingeschränkt werden, was in großen Enzymclustern realisiert werden kann. Die Idee dahinter ist, dass sich die Wahrscheinlichkeit der Reaktion des Intermediats mit dem zweiten Enzym in einem Agglomerat durch die große Anzahl des zweiten Enzyms vervielfacht.^[17] Ein bekanntes Beispiel ist das Purinosom, bei dem sich viele Exemplare der an der Purinbiosynthese beteiligten Enzyme reversibel zu großen Clustern zusammenlagern.^[18]

Der Nachweis des Channelings erfolgt üblicherweise über die in Tabelle 1 zusammengestellten kinetische Methoden, bei denen der Enzymkomplex mit frei diffundierenden Enzymen verglichen wird.^[14, 15]

Tabelle 1: Kinetische Methoden zum Nachweise von Channeling, Reaktionsschemata nach^[19].

1)		Eine verkürzte Transientzeit, also die Zeitspanne, bis die mehrstufige Reaktion im „steady state“ reagiert, ist ein Hinweis auf Channeling.
2)		Die Reaktion mit einem isotoopenmarkierten Substrat A* sollte auch bei Anwesenheit von nichtmarkiertem Intermediat B in der Bulklösung zu 100 % isotoopenmarkiertem Produkt C* führen. Ein geringerer Anteil ist ein Hinweis auf den Austausch mit der Bulklösung, sogenanntes „leaky channeling“.
3)		Die Anwesenheit eines kompetitiven Enzyms, das mit dem Intermediat B zum Nebenprodukt D reagieren kann, sollte die Ausbeute nicht verringern.
4)		Durch einen Inhibitor D, der das zweite Enzym inhibiert, sollte die Ausbeute des Produktes C im Fall des Channelings nur leicht abnehmen.

Der Nachweis ist nicht trivial, da häufig „leaky channeling“ auftritt und die für die Kontrollen benötigten freien Enzyme oft nur durch chemische oder gentechnische Veränderung verfügbar sind. Diese Modifikationen können aber die Enzymaktivität verändern, so dass ein direkter Vergleich oft schwierig ist.

In den letzten 30 Jahren haben Forscher intensiv mehrstufige Enzymreaktionen und deren Kontrollmechanismen untersucht. Ein großes Ziel war dabei, die Prinzipien der Multienzymkomplexe und der Kompartimentierung in die synthetische Chemie zu übertragen.^[20] In Abschnitt 1.2 werden aktuelle Strategien zum Aufbau von künstlichen Multienzymkomplexen vorgestellt und diskutiert. Abschnitt 1.3 behandelt schließlich die Kompartimentierung, die mithilfe von mikrofluidischen Systemen einfach realisiert werden kann.

1.2 Künstliche Multienzymkomplexe

Neben den bereits genannten Vorteilen des Channelings wird kontrovers diskutiert, ob es durch den geringen Abstand der katalytischen Zentren und der damit verknüpften kürzeren Diffusionszeit auch zu einer Beschleunigung der Gesamtreaktion im steady state kommt. Damit einhergehend wird spekuliert, ob allein schon die räumliche Nähe von zwei katalytischen Zentren ausreicht, um die Geschwindigkeit einer Reaktionskaskade zu steigern.

1.2.1 Multienzymkomplexe durch Fusionsproteine

Von diesen Ideen inspiriert, waren Bülow und Mosbach die ersten, die einen künstlichen Multienzymkomplex aufbauten. Sie fusionierten die Gene von β -Galaktosidase und Galaktokinase und exprimierten ein Fusionsprotein, das die zweistufige Reaktion von Laktose zu Galaktose-1-phosphat katalysiert.^[21] Für die Reaktionsgeschwindigkeit des bifunktionalen Enzyms wurde ein doppelt so großer Wert ermittelt wie für die einzeln vorliegenden nativen Enzyme. Auch die Transientzeit war etwa um den Faktor vier verringert. Zwanzig Jahre später zweifelten aber Pettersson und Pettersson die Ergebnisse an. Sie konnten die Ergebnisse reproduzieren, erklärten die Effekte aber durch Mutarotation des Intermediats Galaktose, sowie durch veränderte Enzymaktivität des Fusionsproteins.^[22]

Auch neue Untersuchungen von verschiedenen Autoren zeigten, dass allein die räumliche Nähe der aktiven Zentren von zwei Enzymen in einem Fusionsprotein nicht ausreicht, um eine höhere Geschwindigkeit zu messen.^[17, 23]

Parallel wurden auch andere Strategien entwickelt, um Enzyme in räumlicher Nähe anzuordnen. Gute Übersichtsartikel zu diesem Thema wurden von Conrado et al.^[24], Schoffelen et al.^[25] und ganz aktuell von unserer Arbeitsgruppe^[26] verfasst. Neben

proteinchemischer Kupplung oder Koimmobilisierung im Inneren oder auf der Oberfläche von Mikro- und Nanopartikel, sind hier besonders DNA-basierte Methoden zu nennen, bei denen die DNA als Gerüst zur Bildung wohldefinierter supramolekularer Multienzymkomplexe dient.

1.2.2 Multienzymkomplexe auf Basis der DNA-Nanotechnologie

Das Konzept der DNA-Nanotechnologie beruht auf der hochspezifischen gegenseitigen Erkennung von Oligonucleotiden. In der Natur werden in genetischer DNA die Sequenzen für sämtliche Proteine mit Hilfe der vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) kodiert. Komplementäre DNA bildet antiparallele Doppelhelices aus, die über Watson-Crick-Basenpaarung (AT und GC) erfolgt. Die sequenzabhängige Bindung (Hybridisierung) komplementärer DNA-Stränge ist hochspezifisch, und bereits kurze Oligonucleotide von 10 – 20 Basen reichen aus, um stabile Doppelhelices auszubilden, die außerdem eindeutig adressierbar sind.^[27] Ein Oligonucleotid mit der Länge von n Basen kann bei vier möglichen Basen (A, C, G, T) 4^n mögliche Sequenzen kodieren. Für eine Länge von 10 Basen ergeben sich daraus etwa 1 Millionen mögliche Kombinationen, bei 20 Basen etwa 10^{12} , also 1 Billarde einzigartiger Kombinationen. Auf diese Weise können durch Selbstanordnung komplementärer Oligonucleotide komplexe DNA-Strukturen aufgebaut werden.

Durch kovalente Verknüpfung von kurzen Oligonucleotiden an Proteine können semisynthetische DNA-Proteinkonjugate hergestellt werden. Diese ursprünglich für die Microarraytechnologie entwickelten Konjugate können über die DNA-vermittelten Immobilisierung (DNA-directed immobilization, DDI) sequenzspezifisch mit komplementären Oligonucleotiden eines DNA-Arrays hybridisieren.^[28-30] Durch Selbstanordnung verschiedener Konjugate auf einem Trägerstrang oder auf komplexeren DNA-Strukturen können DNA-basierte Multienzymkomplexe aufgebaut werden.^[31]

Basierend auf diesem Ansatz konnte 2002 eine Enzymkaskade, bestehend aus DNA-Konjugaten von Luziferase und einer Oxidoreduktase, durch Selbstanordnung auf einem immobilisierten Trägerstrang hybridisiert werden (vgl. Abbildung 2B). Das auf dem Trägerstrang kolokalisierte Enzympaar zeigte, im Vergleich zu einzeln auf verschiedenen

Trägersträngen immobilisierten Enzymen, eine Erhöhung der Aktivität um mehr als das Doppelte.^[32]

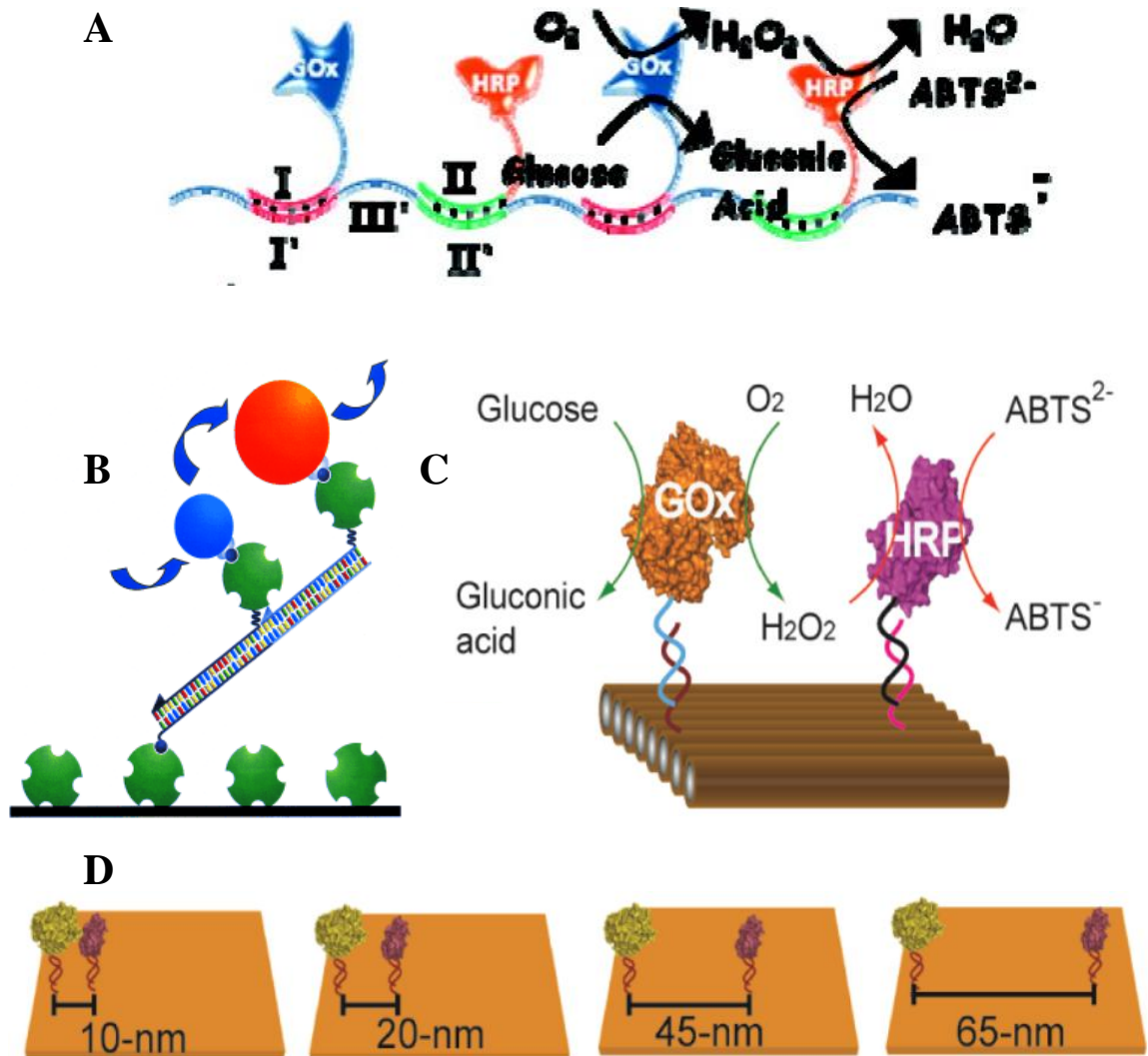


Abbildung 2: Multienzymkomplexe auf DNA-Gerüsten. **A:** GOx- und HRP-Konjugate in alternierender Anordnung auf einem eindimensionalen DNA-Trägerstrang, der durch Rolling Circle Amplifikation erzeugt wurde, Abbildung aus ^[33]. **B:** Kohybridisierung von Luziferase und einer Oxidoreduktase auf einem immobilisierten Trägerstrang, Abbildung aus ^[32]. **C:** Immobilisierung von GOx- und HRP-Konjugaten auf DNA-Origami. **D:** Variation des Abstandes der beiden beteiligten Enzyme. Teilabbildungen C und D aus ^[34].

Seit Beginn dieser Dissertation wurden viele neue Beispiele publiziert. So immobilisierte Willner eine Enzymkaskade bestehend aus Glukose-Oxidase (GOX) und Meerrettich-Peroxidase (HRP), wie in Abbildung 2A dargestellt, auf ein- und zweidimensionalen repetitiven DNA-Bändern und konnte eine Erhöhung der Enzymaktivität um den Faktor 20 messen.^[33, 35]

Im Jahr 2006 wurde von Rothemund die revolutionäre Technik des DNA-Origamis entwickelt. Beim DNA-Origami wird eine lange einzelsträngige Plasmid-DNA durch Hybridisierung mit 200 – 300 kurzen „Helfersträngen“ in eine definierte zweidimensionale Form gefaltet.^[36] Beim Einsatz von verlängerten Helfersträngen entstehen überhängende Enden, die als Fängerstränge zur Funktionalisierung des Origamis mit beliebigen DNA-Konjugaten an definierten Koordinaten zur Verfügung stehen.

Ein solches DNA-Origami wurde von 2012 von Fu et al. als Plattform eingesetzt, um GOX und HRP paarweise zu immobilisieren (Abbildung 2C), und dabei den Abstand der Enzyme von 10-65 nm zu variieren (Abbildung 2D). Die Ergebnisse zeigten eine bis zu 18fache Erhöhung der Aktivität bei 10 nm Abstand, die bei größeren Abständen dramatisch abnahm.^[34]

Inzwischen wurden etwa zwanzig verschiedene Enzymkaskaden veröffentlicht, die mittels DNA-Nanotechnologie zu Multienzymkomplexen angeordnet wurden. In allen Systemen wurde eine Beschleunigung der Reaktion gefunden, allerdings variierte der Faktor von 2,5 bis in Einzelfällen zu mehreren Hundert.^[37] Eine Korrelation der Faktoren mit dem Abstand der Enzyme konnte allerdings nicht festgestellt werden, und auch beim Einsatz des gleichen Enzympaares (meist GOX/HRP) streuen die Ergebnisse stark. In einem weiteren Beispiel, das nicht auf DNA-Gerüsten, sondern auf einem dendrimeren Polymer basiert, wurden 60 Moleküle Superoxid-Dismutase (SOD) und 120 Moleküle HRP immobilisiert. Die immobilisierte Enzymkaskade zeigte aber eine niedrigere Aktivität verglichen mit den freien Enzymen.^[38]

Die starke Streuung der Ergebnisse oben und die teilweise widersprüchlichen Aussagen verdeutlichen, dass die zugrunde liegenden Mechanismen, insbesondere der Einfluss des DNA-Gerüsts, noch unzureichend verstanden sind.^[19] Das zeigt, dass der Aufbau neuer Multienzymkomplexe ein spannendes Forschungsgebiet ist, in dem, auch in Verbindungen mit theoretischen Modellen, neue Reaktionswege erschlossen und optimiert werden können. Neben der präparativen Anwendung könnten diese Systeme auch zur Regenerierung von Kofaktoren oder zur Signalverstärkung in der Bioanalytik eingesetzt werden.

1.3 Enzymkaskaden im Mikrofluidischen Reaktor

Das Prinzip der Kompartimentierung wurde auch in die organische Chemie übernommen. Mehrstufige Synthesen können oft nicht als Eintopfreaktionen durchgeführt werden, da Reaktanden, Lösungsmittel, pH-Wert oder Temperatur nicht kompatibel sind oder es zu unerwünschten Kreuzreaktivitäten kommt.^[39] Da in den letzten Jahren auch in der Forschung zunehmend Reaktionen automatisiert wurden, wurden mehrstufige Umsetzungen in getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt, die aber fluidisch gekoppelt sind. Auf diese Weise können Kreuzreaktivitäten und inkompatible Reaktionsbedingungen vermieden werden. Gleichzeitig können über das fluidische System weitere Edukte zugeführt werden oder Nebenprodukte abgetrennt werden. Für diese zunehmend automatisierten Prozesse hat sich in der Literatur der Begriff „Flow Chemistry“ etabliert.^[40, 41]

Dieses Konzept wird mehr und mehr auch auf enzym- oder zellkatalysierte mehrstufige Synthesen übertragen. Die Biokatalysatoren erfordern aber schonendere Methoden zur Immobilisierung, als typische (metall-)organische Katalysatoren. Darüber hinaus sind, besonders in der Bioanalytik, Probenvolumina und Enzymmengen kleiner, was eine Miniaturisierung erfordert, die durch den Einsatz von Mikrofluidik einfach zugänglich ist.

1.3.1 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik ist eine relativ junge Teildisziplin der Mikrosystemtechnik und umfasst Manipulationen von Flüssigkeiten in Kanälen mit einem Durchmesser von 1 – 1000 μm . Wegen der geringen Volumina (μL - bis pL -Bereich) erweisen mikrofluidische Systeme bedeutende Unterschiede gegenüber konventionellen fluidischen Systemen auf. Im Mikrometerbereich dominieren oberflächengebundene Effekte wie Grenzflächenspannung, elektrostatische und -kinetische Kräfte, während im makroskopischen Bereich Trägheit und Schwerkraft wirken.^[42] Wegen der Oberflächeneffekte treten starke Kapillarkräfte auf, die zum passiven Transport der Flüssigkeit genutzt werden können.^[43] Zudem ist der Einfluss der Diffusion größer, da die Diffusionszeiten, die quadratisch mit der Reaktorgröße skalieren, stark abnehmen.^[44]

Im Vergleich zu makroskopischen Rohren, in denen turbulente Strömung vorherrscht, bildet sich in Mikroreaktoren eine laminare Strömung aus. Dabei strömt das Fluid in Schichten, die sich nicht vermischen, nebeneinander her. Ein Austausch von gelösten Stoffen

erfolgt nur durch den Einfluss der Diffusion. Dieser Effekt kann in der Mikrofluidik ausgenutzt werden, um Moleküle zu trennen, und/oder in bestimmte Richtungen zu leiten.^[42] Um aber homogen gemischte Lösungen zu erhalten, müssen aktive oder passive Mischelemente genutzt werden.^[45]

Aufgrund der geringen Volumina sind die Reaktoren durch ihre außergewöhnlich schnelle Wärme- und Stoffübertagung gekennzeichnet, die eine sehr gute Temperaturkontrolle ermöglichen. Die Systeme reagieren auch extrem schnell auf Temperaturänderungen, da nur wenig Material (Reaktormaterial und Flüssigkeitsvolumen) aufgeheizt bzw. abgekühlt werden muss.^[42] Weitere Vorteile der Miniaturisierung sind die geringen Probenvolumina, der niedrigere Substanzverbrauch und die einfache Prototypentwicklung mit der Möglichkeit eines Scale-ups durch einfaches „Numbering-up“ für höheren Umsatz oder für das Hochdurchsatzscreening von Substanzbibliotheken, die aus der kombinatorischen Chemie oder der gerichteten Evolution verfügbar sind.^[46]

1.3.2 Herstellung von mikrofluidischen Reaktoren

Die Herstellung von mikrofluidischen Reaktoren erfolgt mit Techniken der Mikrofabrikation, also der Erzeugung von kleinen Strukturen im Mikrometermaßstab. Die Technik der Photolithographie ist in der Halbleiterindustrie sehr weit entwickelt worden, so dass inzwischen Strukturen bis zu einer Größe von 40 nm erzeugt werden können.^[47] Trotz der vielfältigen Anwendungsgebiete besitzt die Photolithographie auch Nachteile: Die hohen Kosten, die geringe Toleranz bei den verwendbaren Materialien und die Beschränkung auf ebene Flächen.^[48] Als komplementäre Technik wurde die sogenannte „Softlithographie“ entwickelt, bei der über Photolithographie produzierte Master durch elastomere Materialien abgeformt werden, die dann zum Aufbau von Mikrostrukturen oder als Stempel für den Kontaktdruck verwendet werden können.^[48] Die beiden Techniken sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Bei der Photolithographie (Abbildung 3A) wird im ersten Schritt das Trägermaterial, meist ein Siliziumwafer, mit einem Photolack beschichtet. Mit einer Photomaske, die die gewünschte Struktur enthält, wird der Lack ortsabhängig belichtet. Bei einem positiven Photolack wird anschließend der belichtete Bereich durch Entwicklerlösung entfernt,

während bei einem negativen Photolack der belichtete Bereich polymerisiert wird und damit nicht entfernt werden kann. Die Entwicklungslösung entfernt in diesem Fall nur die nicht belichteten Bereiche des Photolacks.^[42] Der Wafer mit der Mikrostruktur dient dann in der Softlithographie als Master zum Abformen mit Polydimethylsiloxan (PDMS), das anschließend durch Polymerisation ausgehärtet wird (vgl. Abbildung 3B).

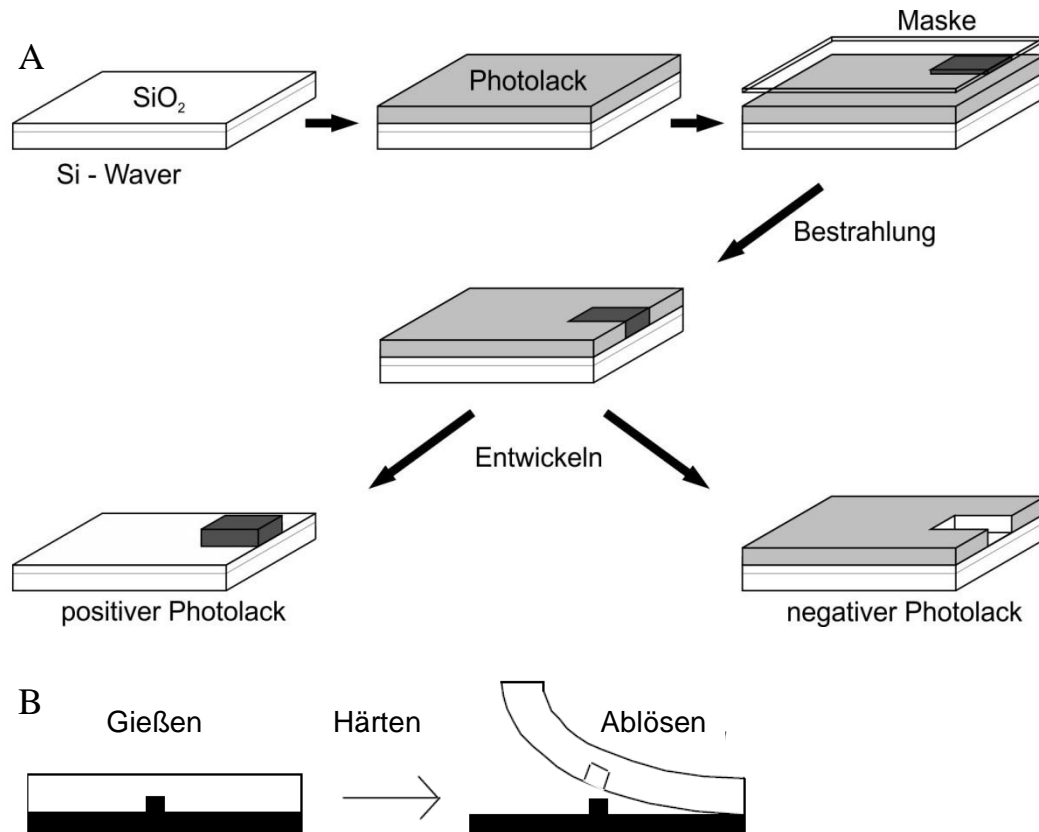


Abbildung 3: Herstellung der Mikrofluidischen Reaktoren. **A:** Photolithographie am Beispiel eines negativen und positiven Photolacks. Im ersten Schritt wird der Photolack auf den Siliziumwafer aufgebracht. Anschließend wird der Lack durch die Photomaske bestrahlt. Im Fall des positiven Photolacks wird beim Entwickeln der bestrahlte Lack entfernt, beim negativen Photolack umgekehrt. **B:** Der Master wird mit flüssigem PDMS abgeformt, welches nach Aushärten vorsichtig abgelöst werden kann. Abbildungen angelehnt an ^[42, 48]

Während der photolithographische Prozess unter Reinraumbedingungen stattfindet, kann das Abformen mit PDMS unter normalen Laborbedingungen durchgeführt werden. Die so gefertigten Mikroreaktoren sind elastisch, transparent und biokompatibel. Darüber hinaus ist die Herstellung durch Abformen einfach, schnell und kostengünstig.^[48]

Die Strukturelemente eines Mikroreaktors sind im einfachsten Fall Kanäle, Kreuzungen und passive Mischer. In den letzten Jahren wurden aber immer komplexere Strukturen entwickelt, wie z. B. Mikroventile und Mikropumpen, die durch mehrschichtiges

PDMS direkt aufgebaut wurden.^[49] Darüber hinaus können weitere Elemente, teilweise auch als externe Geräte mit dem Mikroreaktor kombinieren werden. Hier sind insbesondere vielfältige Trenn- und Analyseverfahren in die Mikroreaktoren integriert worden, so dass komplexe synthetische oder analytische Anwendungen mit diesen „Lab on a chip“, „Mikrototalanalysesystemen“ und biokompatiblen „Mikroelektronischen und –mechanischen Systemen“ (Bio-MEMS) möglich wurden,^[50-53] die für Point-of-Care Diagnostik und Hochdurchsatz-Screening eingesetzt werden.^[54]

1.3.3 Immobilisierungsmethoden

Der Einsatz von Enzymen in der Mikrofluidik erfolgt in der Regel in immobilisierter Form, da gelöste Enzyme weniger stabil sind und im kontinuierlichen Fluss große Enzymmengen verbraucht werden, die nur schlecht zurückgewonnen werden können. Durch Immobilisierung nimmt zwar in vielen Fällen die Aktivität ab, allerdings steigt die Stabilität, und die Toleranz für organische Lösungsmittel, unterschiedliche pH-Werte und höhere Temperaturen nimmt häufig zu.^[55]

Die Immobilisierung kann auf der Oberfläche des Kanals, auf Elektroden, in Membranen, in Polymermatrices, in Gelen, in Poren oder auf Partikeln erfolgen. Die Verfahren unterscheiden sich im Stoffaustausch, der wegen der laminaren Strömung nur durch Diffusion erfolgt. Eine raumausfüllende Immobilisierungsmethode, wie sie durch funktionalisierte Partikel, Polymermatrices und Gele erreicht wird, führt deshalb zu effizienteren Umsetzungen.^[56]

Die eigentliche Immobilisierung der Enzymkaskade kann durch die folgenden vier Bindungsarten erfolgen.^[57]

- 1) Die Adsorption durch elektrostatische Anziehung oder van-der-Waals-Kräfte ist die einfachste und schnellste Immobilisierungsmethode, da keine weiteren Reagenzien benötigt werden. Allerdings sind Denaturierung und Desorption mögliche Probleme. Die getrennte Immobilisierung mehrerer Enzyme erfordert Ventile oder muss vor Montage des Reaktors erfolgen.
- 2) Durch kovalente Bindung können Enzyme irreversibel immobilisiert werden. Die Kupplung erfolgt üblicherweise an die Aminogruppe von Lysin oder die

Thiolgruppe von Cystein. Für alle typischen Oberflächen ist eine Vielzahl an bifunktionalen Linkermolekülen kommerziell erhältlich. Allerdings sind die Protokolle aufwändiger, als bei Punkt 1). Eine getrennte Immobilisierung erfolgt hier auch entweder durch Ventile oder vor Montage des Reaktors. Durch den Einsatz photoaktivierbarer Linker können die Enzyme aber auch ortsaufgelöst durch „Photopatterning“ immobilisiert werden.^[56]

- 3) Die starke Affinität bestimmter Biomoleküle kann ebenfalls zur Immobilisierung von modifizierten Enzymen eingesetzt werden. Bekannte Beispiele sind Biotin/Streptavidin, komplementäre Oligonucleotide, Ni-NTA/His-Tag (Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure/Histidin), Antikörper/Antigen oder Aptamere.^[56] Die Methoden sind ebenfalls aufwändiger und kostenintensiver als die bisher diskutierten, allerdings überwiegen die Vorteile wie die schonenden Immobilisierungsbedingungen, die hohe Spezifität, sowie die Kontrolle über Stöchiometrie und Orientierung.^[57] Die hohe Sequenzspezifität von Oligonucleotiden, Aptameren und Antikörpern ermöglicht auch die gleichzeitige ortsspezifische Immobilisierung verschiedener Enzyme.
- 4) Durch Verkapselung oder Einschluss in dreidimensionalen Gelen oder Polymeren wird die native Struktur der Enzyme erhalten und es kommt nicht zu Denaturierung der Enzyme. Die Enzyme sind aber nicht im direkten Kontakt mit den Substraten, so dass die Reaktoren für einen besseren Stoffaustausch mit langsamen Flussraten betrieben werden müssen. Neue Methoden mit Photomasken ermöglichen die ortsaufgelöste Polymerisation der Monomerlösung, was den sequenziellen Einschluss der jeweils vorliegenden Enzyme im Mikroreaktor ermöglicht.^[58]

Bei Verwendung von Mikropartikeln ist die Immobilisierung der Enzyme außerhalb des Reaktors möglich. Für mehrstufige Enzymkaskaden können die Enzyme entweder getrennt immobilisiert oder koimmobilisiert werden, abhängig davon, ob eine Kompartimentierung erwünscht ist oder nicht.^[59] Die funktionalisierten Partikel können dann im gewünschten Mengenverhältnis in den Reaktor injiziert werden, um einen Festbettreaktor zu bilden. Die Partikel werden üblicherweise an Größenausschlussstrukturen wie Dämmen, Spalten oder Säulen aufgeschüttet. Bei Verwendung magnetischer Partikel kann der Auf- und Abbau der Schüttung durch ein externes Magnetfelds gesteuert werden.^[58] Die im

Festbettreaktor erreichte dreidimensionale Verteilung der Enzyme im Kanal ermöglicht optimalen Kontakt zur Substratlösung und optimalen Stofftransport.

1.3.4 Immobilisierte Enzymkaskaden in der Mikrofluidik

In den letzten Jahren wurden zunehmend nicht nur einzelne Enzyme, sondern auch mehrstufige Enzymkaskaden in mikrofluidische Reaktoren integriert. Im Folgenden werden Beispiele für immobilisierte Enzymkaskaden in der Mikrofluidik vorgestellt, mit besonderem Schwerpunkt auf dreidimensionaler Enzymverteilung durch Polymermatrices oder Partikel, die einen optimalen Kontakt mit der Lösung ermöglichen.

Physisorption wird in der Mikrofluidik wegen des Risikos des Auswaschens nur selten eingesetzt. Aktuelle Beispiele von durch Physisorption immobilisierten Enzymkaskaden nutzen daher als Träger meist nanoporöse Materialien wie SiO_2 ^[60] oder Gold^[61] oder mikroporöse Membranen,^[62] (vgl. Abbildung 4A).

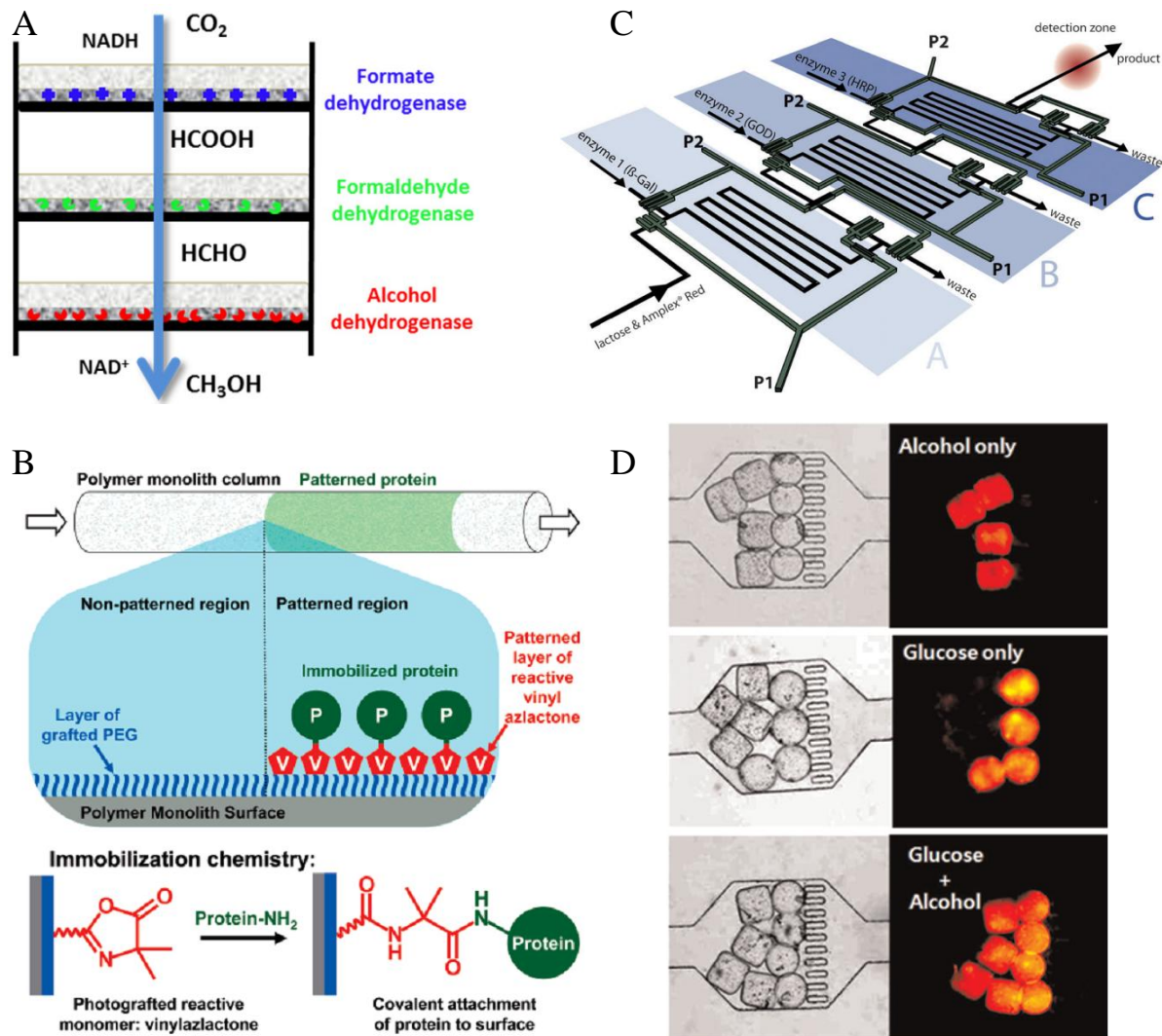


Abbildung 4: Beispiele für Enzymkaskaden in der Mikrofluidik, die über die vier beschriebenen Arten immobilisiert sind. **A:** Unspezifische Ablagerung von Formate-Dehydrogenase, Formaldehyd-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase auf drei Membranen zur sequenziellen enzymatischen Reduktion von CO_2 zu Methanol, Abbildung aus ^[62]. **B:** Schematische Darstellung der ortsaufgelösten photosensitiven Immobilisierung (Photopatterning). Auf einer PEG-Schicht, die unspezifische Adsorption verhindert, wird Vinylazlacton durch Photoaktivierung kovalent gebunden, auf dem anschließend die Enzyme durch kovalente Bindung mit den Aminogruppen immobilisiert werden, Abbildung aus ^[63]. **C:** Serielle Anordnung von Avidin-beschichteten Mikrokompartimenten, die jeweils mit einem biotinylierten Enzym β -Galaktosidase, GOX oder HRP funktionalisiert worden sind, Abbildung aus ^[64]. **D:** In PEG-Gel verkapselte Enzyme (GOX oder Alkohol-Oxidase), die durch die Form der Mikropartikel unterscheidbar sind, Abbildung aus ^[58].

Stabiler ist die kovalente Kupplung, z. B. mittels eines unspezifisch quervernetzenden Polymaleinsäureanhydridderivates, das zur Immobilisierung von Sojabohnenperoxidase (SBP) an aktivierten Glasoberflächen eines Mikroreaktors eingesetzt wurde.^[65] Mit dieser Technik wurden außerdem zwei vorgeschaltete Enzyme einer Kaskade (Invertase und GOX) koimmobilisiert. Der gleiche Crosslinker wurde zur Immobilisierung einer Enzymkaskade

aus Hydroxyaminobenzol-Mutase und SBP auf Siliziumdioxidpartikeln verwendet.^[66] Andere Gruppen nutzten Photoaktivierung von Oberflächen, um Enzymkaskaden orts aufgelöst zu immobilisieren und damit einen kompartimentierten Mikroreaktor herzustellen,^[63, 67] (vgl. Abbildung 4B).

Die spezifische Immobilisierung durch Bioaffinität ermöglicht flexible und milde Bedingungen sowie eine bessere Kontrolle über die Kompartimentierung. So wurden beispielsweise die 6xHis-markierten Enzyme der zweistufigen Transketolase-Transaminase-Reaktionskaskade an der mit Ni-NTA beschichteten Innenseite von Kapillaren immobilisiert, um chirale Aminoalkohole zu synthetisieren.^[68] Die Wechselwirkung von STV bzw. Avidin mit Biotin wurde genutzt, um eine erweiterte GOX/HRP-Kaskade in einem durch Ventile steuerbaren kompartimentierten Mikroreaktor zu implementieren,^[64] (vgl. Abbildung 4C). Inzwischen sind STV-beschichtete Mikropartikel in verschiedensten Größen kommerziell verfügbar und ermöglichen den Einsatz von biotinylierten Enzymen in Festbettreaktoren.^[69, 70] Neben den Modellkaskaden wurden auch hochempfindliche menschliche Cytochrom P450 Enzyme auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikeln immobilisiert, in einzelne Kompartimente gepackt und schließlich zu einem modularen mikrofluidischen System gekoppelt, um den menschlichen Phase I/Phase II-Metabolismus zu emulieren.^[71] Die in Abschnitt 1.2.2 dargestellten Prinzipien der DNA-vermittelten Immobilisierung können ebenfalls in die Mikrofluidik übertragen werden, indem synthetische DNA-Stränge auf Oberflächen ausgewählter Kompartimente immobilisiert werden, die dann zur Adressierung und spezifischen Bindung von DNA-Enzymkonjugate genutzt werden können.^[72, 73]

Auch zur Verkapselung von Enzymkaskaden gibt es Beispiele. Bevor der mikrofluidische Reaktor zusammengesetzt wurde, konnten durch Photopolymerisation von PEG-Hydrogel getrennte Mikroflächen erzeugt werden, in denen die GOX/HRP-Enzymkaskade, oder auch ein pH-sensitiver Farbstoff als lokaler pH-Indikator innerhalb der Gelmatrices eingeschlossen waren.^[74] In einer innovativen Methode wurden Enzyme (GOX/HRP bzw. Alkohol-Oxidase/HRP) *in situ* in Hydrogelmikropartikel eingeschlossen, indem eine Präkursorlösung wie PEG-DA (Polyethylenglykoldiacrylat) beigemischt wird, die durch UV-Belichtung polymerisiert. Die Partikel können entweder in getrennten Kompartimenten erzeugt werden,^[75] oder anhand von Farbe (durch Beimengen von

Farbstoffen) oder Form (einstellbar durch die Form der Photomaske) eindeutig identifiziert werden,^[58, 76] (vgl. Abbildung 4D).

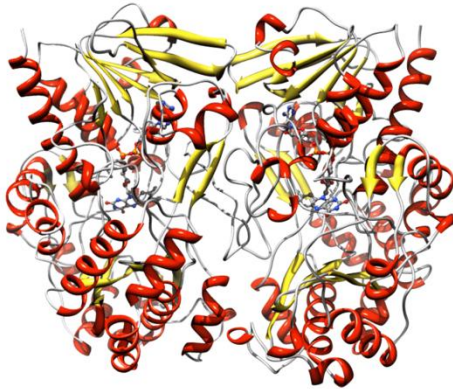
Die Beispiele in dieser Übersicht zeigen, wie vielfältig die Fortschritte in den letzten Jahrzehnten im Bereich von Multienzymssystemen in der Mikrofluidik sind. Trotzdem sind diese Studien oft beschränkt auf robuste Enzyme wie HRP, GOX oder Alkalische Phosphatase (AP). In den meisten Fällen liegt der Schwerpunkt der Forschung aber auf Biosensoren und Machbarkeitsstudien, besonders um Proteinimmobilisierungstechniken zu demonstrieren.^[56] Fundierte kinetische Analysen der immobilisierten Enzyme in der Mikrofluidik sind nur für einstufige Enzymreaktionen veröffentlicht. Für mehrstufige Umsetzungen finden sich, bis auf eine Ausnahme,^[77] nur oberflächliche kinetische Betrachtungen.

1.4 Das GOX/HRP-Modellsystem

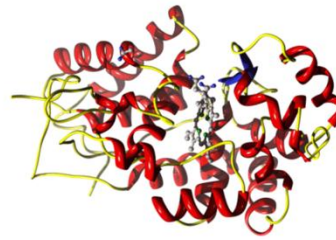
Eine Vielzahl der als Beispiele diskutierten Reaktionskaskaden in Multienzymkomplexen und in der Mikrofluidik basiert auf der GOX/HRP-Enzymkaskade. Beide Enzyme sind robust, kommerziell erhältlich und in der Literatur ausführlich beschrieben worden, so dass sie sich als Modellsystem anbieten.

Glukose-Oxidase ist ein homodimeres Enzym, das aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* isoliert wird und 1928 erstmalig beschrieben wurde.^[78] Das 160 kDa schwere Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 10 – 16 %^[79] besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils 583 Aminosäuren und enthält eine Flavinadenindinucleotid (FAD)-Gruppe im aktiven Zentrum^[80] (Abbildung 5A). Das Enzym katalysiert nach Abbildung 5C die Oxidation von Glukose zu Glukonolacton mit Sauerstoff als Oxidationsmittel. GOX ist das Enzym der Wahl für den Einsatz in Glukosesensoren für Diabetiker^[81] und wird zunehmend auch als Enzym für Bio-Brennstoffzellen^[82] erforscht.

A: Glukose-Oxidase (GOX)



B: Meerrettich-Peroxidase (HRP)



C:

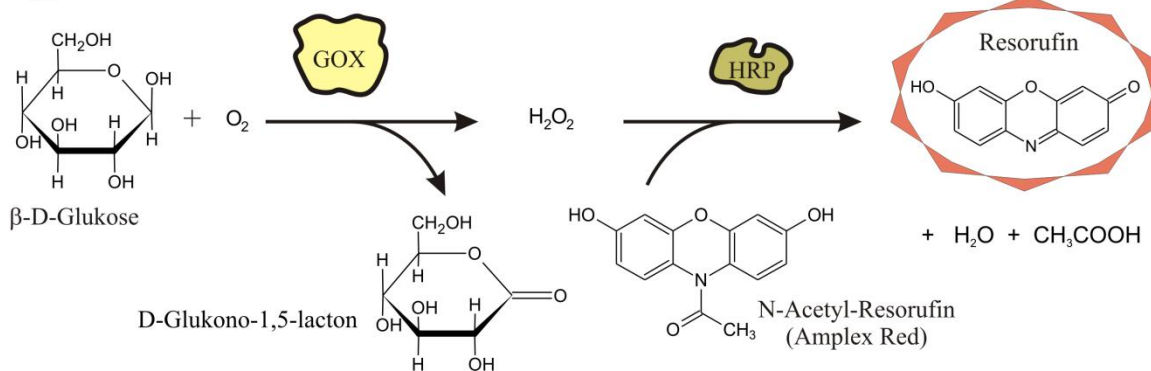


Abbildung 5: Tertiärstrukturen der Enzyme und Reaktionsschema der zweistufigen GOX/HRP-Enzymkaskade. **A:** Tertiärstruktur von Glukose-Oxidase (GOX), die als Dimer mit jeweils einer FAD-Gruppe vorliegt.^[83] **B:** Tertiärstruktur von Meerrettich-Peroxidase mit Häm als prosthetischer Gruppe.^[84] **C:** Schema der zweistufigen enzymkatalysierte Reaktion, bei der das von GOX gebildete H_2O_2 als Substrat für die Folgereaktion mit HRP fungiert. Details zu den Reaktionsmechanismen und den Substraten werden in Abschnitten 2.1.2.2 und 2.1.2.3 diskutiert.

Die **Meerrettich-Peroxidase** (Horseradish Peroxidase, HRP) wurde 1903 erstmalig isoliert und beschrieben.^[85] Sie ist ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 18 %^[86] und kommt in mehr als 30 Isoformen vor.^[87] Das dominierende Isozym C ist ein monomeres, aus 308 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einer Gesamtmasse von ca. 44 kDa (Abbildung 5B). Es enthält 2 Ca^{2+} -Ionen,^[88, 89] eine über Histidin koordinierte Häm-Gruppe^[90] und bildet 4 Disulfidbrücken aus.^[91] HRP katalysiert die Oxidation von phenolartigen Substraten mit H_2O_2 als Oxidationsmittel. Die Reaktion ist in Abbildung 5C am Beispiel von Amplex Red als Substrat dargestellt.

HRP findet heutzutage Verwendung als empfindlicher H_2O_2 -Detektor, in der organischen Synthese^[92] und als enzymatischer Verstärker (Reporterenzym) für schlecht nachweisbare Enzyme in Biosensoren und vielen Immunoassays.^[93] Der aktuelle Stand der

Forschung unter Berücksichtigung von analytischen und technischen Anwendung wurde kürzlich von Krainer zusammengefasst.^[94]

Wie in Abbildung 5C erkennbar, können GOX und HRP als Enzymkaskade wirken, bei der das von GOX gebildete Intermediat H_2O_2 von HRP umgesetzt wird. Bei Verwendung chromogener oder fluorogener Substrate kann der Umsatz der zweiten Reaktion einfach spektroskopisch verfolgt werden.

1.5 Aufgabenstellung

Ausgehend von dem Stellenwert, den die Kompartimentierung von Enzymkaskaden für die Forschung und Entwicklung von maßgeschneiderten und umweltfreundlichen Produktionsprozessen besitzt, sollten in dieser Arbeit zwei Plattformen für den Aufbau sowie die Untersuchung und Charakterisierung von Enzymkaskaden entwickelt werden.

Einerseits sollten die Enzyme der GOX/HRP-Modellkaskade mit Techniken der DNA-Nanotechnologie zu künstlichen Multienzymkomplexen auf der Nanometerskala assembliert werden, bei denen der Transport des Intermediats H_2O_2 ungerichtet durch Diffusion stattfindet. Dazu sollten die Enzyme mit kurzen Oligonucleotiden gekoppelt, aufgereinigt und kinetisch charakterisiert werden. Die DNA-Konjugate sollten dann dazu genutzt werden, dimere Enzymkomplexe verschiedenster Anordnungen und Konfigurationen aufzubauen, die mittels Gelelektrophorese und enzymkinetischen Untersuchungen charakterisiert werden sollten. Der Aufbau und die Reaktionsbedingungen sollten optimiert werden, um den kontrovers diskutierten Effekt des Channelings zu untersuchen, bei dem das Intermediat nicht den Umweg über die Bulklösung nimmt, sondern direkt von GOX nach HRP diffundiert.

Andererseits sollte im zweiten Teil der Arbeit ein neuentwickelter mikrofluidischer Testreaktor etabliert werden, der durch drei Fritten kompartimentiert ist, um bis zu drei verschiedene, auf Partikeln immobilisierte Enzyme auf der Mikrometerskala positionieren zu können. Der Transport der Intermediate erfolgt dabei ausschließlich gerichtet durch eine laminare Strömung, die durch externe Pumpen erzeugt wird. In diesen Festbettreaktor sollten die Enzyme der GOX/HRP-Enzymkaskade einzeln, sowie für mehrstufige gekoppelte Enzymreaktionen integriert und kinetisch untersucht werden. Eine mehrstufige Auswertung nach Michaelis Menten sollte zeigen, ob über die spektroskopisch quantifizierbaren

Parameter des Reporterenzymys HRP die intermediären, spektroskopisch nicht sichtbaren H_2O_2 -Konzentrationen valide berechnet werden können, und ob daraus indirekt eine fundierte Analyse der Kinetik der vorgeschalteten GOX-Teilreaktion möglich ist.

2 Ergebnisse und Diskussion

Diese Arbeit gliedert sich in drei große Teile: Den Aufbau und die Charakterisierung künstlicher Multienzymkomplexe auf DNA-Gerüsten (Abschnitt 2.1 und 2.2), die Implementierung der auf Partikeln immobilisierten Enzyme in den mikrofluidischen Festbettreaktor (Abschnitt 0 und 2.4) sowie die Kinetikmessungen in der Mikrofluidik (Abschnitt 2.5 bis 2.7).

2.1 DNA-Enzymkonjugate

2.1.1 Synthese und Aufreinigung von DNA-Enzymkonjugaten

Aufbauend auf bestehende Arbeiten der Arbeitsgruppe Niemeyer zu DNA-STV-Konjugaten,^[28, 95] wurde die Kupplungschemie im Rahmen einer Diplomarbeit zur Synthese von halbsynthetischen DNA-HRP-Konjugaten genutzt.^[96] In dieser Dissertation wurden nun auch DNA-GOX-Konjugate synthetisiert und charakterisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sequenzen (F5 und F9) wurden in der Arbeitsgruppe Niemeyer computergestützt optimiert und zeichnen sich durch Orthogonalität und minimale Sekundärstrukturen aus.^[97]

Die Synthese der benötigten DNA-Enzymkonjugate erfolgte nach dem in Abbildung 6A dargestellten Schema unter Verwendung des bifunktionalen Linkermoleküls sulfo-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan (sSMCC). Dabei reagierte der NHS-Ester des sSMCC mit freien Lysinen oder dem N-Terminus der Enzyme. Die Maleimidfunktion wurde anschließend in einer Additionsreaktion mit endständigen Thiolen der Oligonucleotide umgesetzt. Die Synthese der DNA-GOX-Konjugate erfolgte auf gleiche Weise. Die so erhaltenen DNA-Enzymkonjugate wurden durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und charakterisiert. Typische Chromatogramme für HRP und GOX sind in Abbildung 6B und C dargestellt.

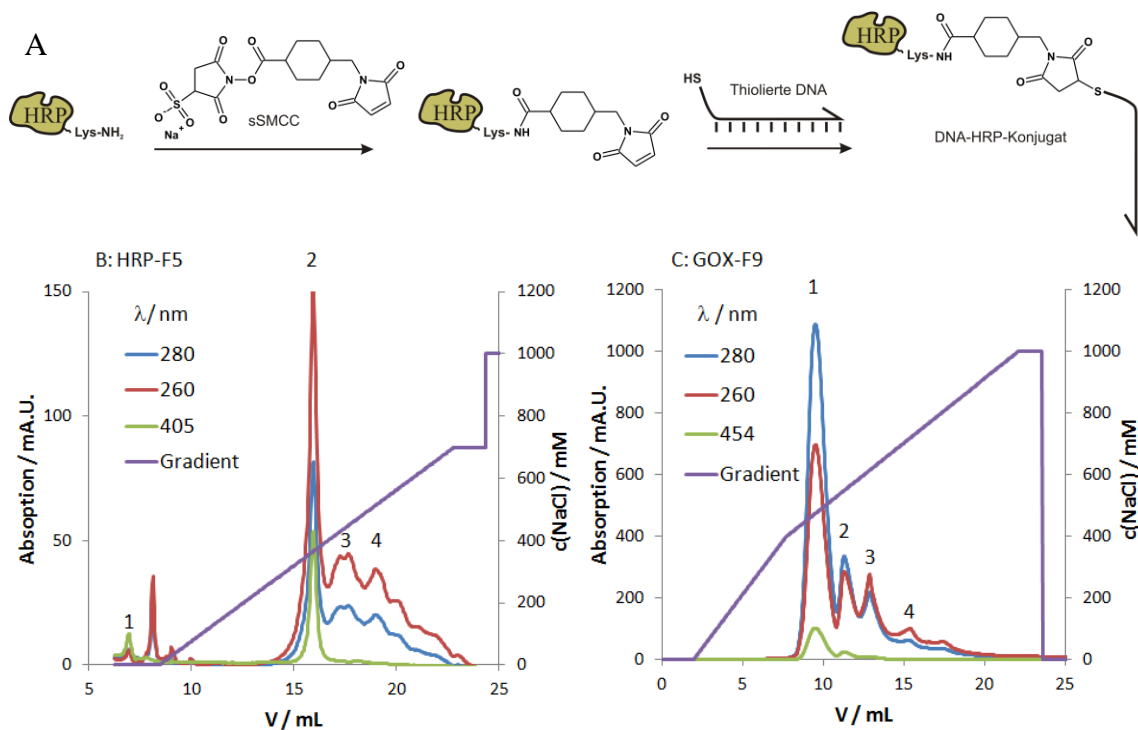


Abbildung 6 **A**: Reaktionsschema der kovalenten Verknüpfung von HRP mit 5'-thiolmodifizierter DNA unter Verwendung des heterobispezifischen Linkers sSMCC. Nach dem gleichen Schema wurden auch die DNA-GOX-Konjugate synthetisiert. Die dargestellte Größe des Enzyms ist nicht maßstabsgetreu. **B und C**: Repräsentative Anionenaustausch-Chromatogramme der Aufreinigung von DNA-HRP-Konjugaten (B) und DNA-GOX-Konjugaten (C). In beiden Chromatogrammen steht Peak 1 für unreaktiertes Enzym. Peak 2 enthält das Monokonjugat, Peak 3 und 4 repräsentieren Konjugate höherer Stöchiometrie. Durch das Anhängen der DNA-Stränge steigt der Anteil der Absorption bei $\lambda = 260$ nm. Als Elutionspuffer wurde Tris pH 6,3 mit einem NaCl Gradienten von 0 – 1 M verwendet.

Beide Enzyme konnten durch eine charakteristische Wellenlänge der prosthetischen Gruppe identifiziert werden. Bei $\lambda = 405$ nm absorbiert das Häm und bei $\lambda = 454$ nm absorbiert das Flavinadeninucleotid (FAD). Zusätzlich wurden Absorptionen bei $\lambda = 280$ nm für den Proteinanteil und $\lambda = 260$ nm für den DNA Anteil detektiert. Um die Zuordnung zu erleichtern, wurden Kalibrierkurven mit verschiedenen Verhältnissen der Oligonucleotide zu den nativen Enzymen aufgenommen, vergleiche Abbildung 83 und Abbildung 84 im Anhang. Aus den Quotienten der charakteristischen Absorptionen konnte schließlich einfach die Stöchiometrie der Konjugate identifiziert werden.

Bei der Aufreinigung der HRP-Konjugate in Abbildung 6B eluierte zunächst das unreaktierte Enzym ($V = 7$ mL, Peak 1). Ohne angehängte DNA dominierte die Absorption bei 405 nm, und das A_{260}/A_{280} -Verhältnis betrug etwa 1. Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration eluierte das 1:1 Konjugat (Peak 2) nach etwa 16 mL bei 400 mM NaCl,

erkennbar am erhöhten A_{260}/A_{405} -Verhältnis von etwa 2 – 3. Danach eluierten Konjugate höherer Stöchiometrie (Peak 3 und 4) und ungebundene DNA.

Bei der Aufreinigung der GOX-Konjugate eluierte das unreaktierte Enzym erst nach etwa 9 mL, erkennbar am hohen A_{280} -Anteil. Im Bereich von etwa 11 – 15 mL eluierten nacheinander das 1:1 Konjugat (Peak 2, $A_{260}/A_{454} \approx 1$) und die höheren Konjugate (Peak 3 und 4). Der steigende DNA-Anteil spiegelte sich im steigenden A_{260}/A_{280} -Verhältnis wider.

Die Trennleistung war hier aber geringer als bei HRP. Wegen des isoelektrischen Punktes (pI) von 4,2^[98] lag GOX im verwendeten Puffer negativ geladen vor und eluierte deshalb später, als die positiv geladene HRP mit einem pI von 8,8^[99]. Die unmodifizierte GOX eluierte deshalb auch erst sehr kurz vor den DNA-GOX-Konjugaten, und es kam zu Überlappungen der Peaks.

Die so aufgereinigten 1:1 Konjugate wurden in Phosphatpuffer (KPi300) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Konzentration wurde anschließend UV-spektroskopisch über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt. Weiterhin konnte aus den Verhältnissen A_{260}/A_{405} (HRP, Abbildung 83 im Anhang) und A_{260}/A_{454} (GOX, Abbildung 84 im Anhang) die Stöchiometrie der Konjugate bestätigt werden. Typische UV-Vis-Spektren der 1:1 Konjugate sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Sequenzen T6F5 und T6F9 enthielten einen 6xThymin Abstandshalter, um bei der geplanten Assemblierung der Multienzymkomplexe bessere Ausbeuten zu erzielen. Die zusätzlichen 6 Basen verstärkten die Absorption bei 260 nm und führten zu erhöhten charakteristischen Verhältnissen in den angegebenen Tabellen. Die Syntheseausbeuten der 1:1 Konjugate lagen typischerweise zwischen 2 und 16 % bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge, wobei 3'-modifizierte Sequenzen meist niedrigere Ausbeuten aufwiesen.

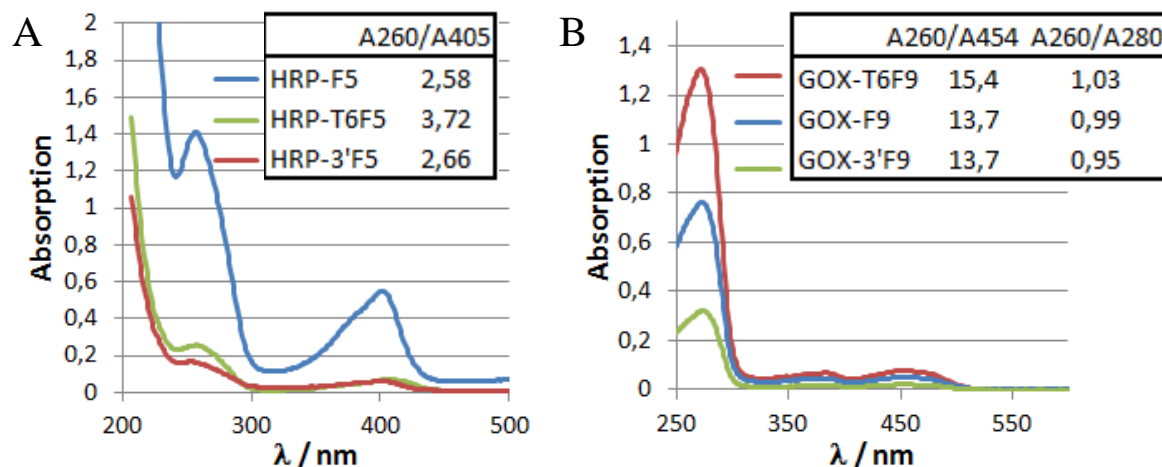


Abbildung 7: UV-Vis-Spektren der aufgereinigten HRP-Konjugate (A) und GOX-Konjugate (B). In den Tabellen sind die Absorptionsverhältnisse der charakteristischen Wellenlängen angegeben, die bestätigen, dass es sich um 1:1 Konjugate handelt.

2.1.2 Kinetische Untersuchungen der DNA-Enzymkonjugate

An vorherige Arbeiten^[96, 100] anknüpfend, wurden in diesem Abschnitt die kinetischen Parameter der DNA-Enzymkonjugate ermittelt und mit denen der nativen Enzyme verglichen. So konnte der Einfluss der angehängten DNA auf die Aktivität quantifiziert werden. In Abschnitt 2.1.2.5 wurden die Konjugate schließlich auf DNA-funktionalisierten Streptavidin-Platten immobilisiert, um die Bindungsfähigkeit zu testen.

2.1.2.1 Reaktionsmechanismus von Meerrettich-Peroxidase (HRP)

Zur weiteren Charakterisierung der DNA-Enzymkonjugate wurden kinetische Messungen durchgeführt. HRP reagiert dabei nach dem allgemein anerkannten Peroxidasemechanismus, der in Abbildung 8 skizziert ist.^[101]

Im ersten Schritt wird das im Grundzustand (Oxidationsstufe III) vorliegende Enzym mit H_2O_2 umgesetzt. Dabei wird die Hämgruppe um zwei Oxidationsstufen zu einer Oxyferrylspezies ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) und einem Porphyrin π -Radikalkation oxidiert, das als Compound I bezeichnet wird. Im darauffolgenden Schritt wird durch das Substrat AH_2 das Porphyrin π -Radikalkation zu Compound II reduziert, wobei der Oxidationszustand des Eisens konstant bleibt. Im letzten Schritt reduziert ein weiteres Molekül AH_2 das Fe^{IV} zum Grundzustand Fe^{III} . Beim reduzierenden Substrat AH_2 handelt es sich häufig um Phenolderivate oder

aromatische Amine, die in beiden Reaktionsschritten durch Abgabe eines Elektrons Radikale bilden.^[101]

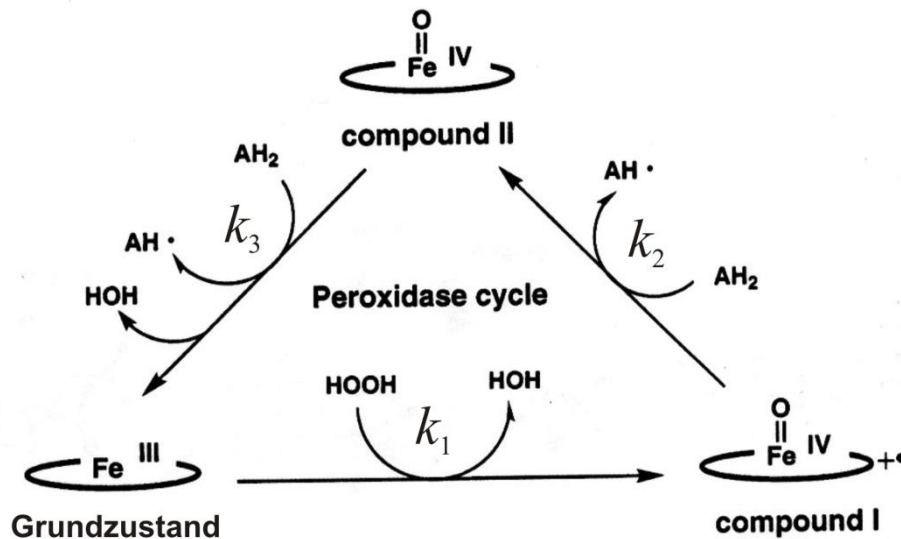


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus des Peroxidasezyklus nach Dunford.^[101]

Bei dem beschriebenen Zyklus handelt es sich um eine Mehrsubstratreaktion, die quasi irreversibel abläuft.^[102] Durch Aufstellen der Geschwindigkeitsgesetze für „steady state“ Bedingungen kann die Reaktionsgeschwindigkeit v als Funktion der Geschwindigkeitskonstanten k_1 bis k_3 und der Substratkonzentrationen hergeleitet werden,^[102] und ist in Gleichung (1) angegeben.

$$\frac{2[E]_0}{v} = \frac{1}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{1}{k_2 [AH_2]} + \frac{1}{k_3 [AH_2]} \approx \frac{1}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{1}{k_3 [AH_2]} \quad (1)$$

Dabei ist $[E]_0$ die Enzymkonzentration, $[H_2O_2]$ die Konzentration von H_2O_2 und $[AH_2]$ die Konzentration des reduzierenden Substrates. Die Näherung ist möglich, weil bei vielen Peroxidasen k_2 um 1 bis 2 Zehnerpotenzen größer als k_3 ist und damit nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.^[86]

Für AH_2 werden in der Literatur meist die Substrate ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat) und Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) eingesetzt. ABTS ist chemisch stabil und gut wasserlöslich. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wird bei der Reaktion mit Peroxidasen ein stabiles, bei 405 – 415 nm absorbierendes Radikalkation mit hohem Extinktionskoeffizienten gebildet.^[103] In einer langsamen Reaktion disproportioniert das Radikalkation zurück zu ABTS und einem Azo-Dikation. Wenn nur die

Anfangsgeschwindigkeit ausgewertet wird, spielt diese Folgereaktion aber keine Rolle. Ein großer Nachteil von ABTS ist aber, dass wegen der Messung der Absorption die Sensitivität begrenzt ist.

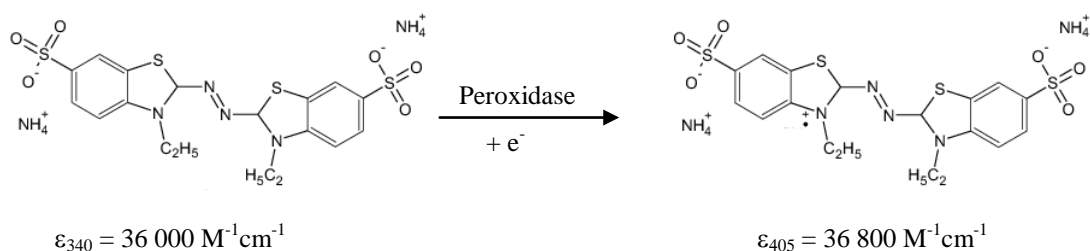


Abbildung 9: Reaktionsschema der Ein-Elektronen-Oxidation von ABTS durch Peroxidasen.

In dieser Arbeit wurde deshalb überwiegend das fluorogene Substrat Amplex Red verwendet. Es wurde 1997 erstmals beschrieben und weist eine bis zu zwanzigfach erhöhte Sensitivität auf.^[104] Wie in Abbildung 10 dargestellt, wird es durch die Peroxidase zum fluoreszenten Produkt Resorufin oxidiert, das einen hohen Extinktionskoeffizienten besitzt und intensiv fluoresziert. Das Anregungs- und Emissionsspektrum, sowie die verwendeten Filter des Mikrotiterplattenlesers sind im Anhang in Abbildung 85A dargestellt.

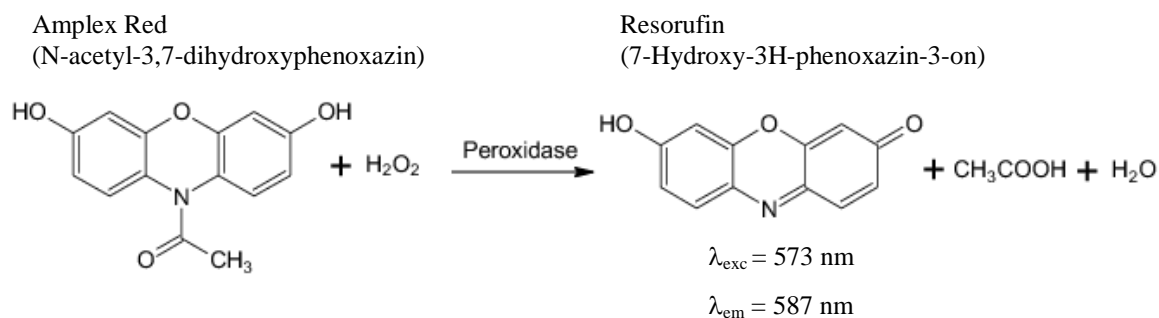


Abbildung 10: Reaktionsschema der Reaktion von Amplex Red mit Peroxidase zu Resorufin.

Das Resorufin ist relativ stabil, diente aber in der Vergangenheit selbst als Peroxidasesubstrat für inverse Fluoreszenzmessungen. Dabei wurde Resorufin zu nichtfluoreszente Resazurin umgesetzt und die Abnahme der Fluoreszenz gemessen.^[105] Die Geschwindigkeit der Folgereaktion ist jedoch um den Faktor 30 geringer und kann bei der Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit vernachlässigt werden.^[104]

Über den Reaktionsmechanismus wurde lange Zeit spekuliert. Zhou et al. gaben an, dass Amplex Red in 1:1-Stöchiometrie mit H_2O_2 umgesetzt wird.^[104] Neue Untersuchungen mittels Pulsradiolyse stärken die These, dass im ersten Schritt ein Radikal gebildet wird, das

durch Dismutation mit einem weiteren Amplex Red Radikal und Abspaltung von Essigsäure schließlich zu Resorufin oxidiert wird.^[106, 107] Pro Reaktionszyklus der Peroxidase werden also nicht zwei, sondern nur ein Molekül Resorufin gebildet, so dass mit Amplex Red [Ax] als Substrat in Gleichung (2) der Faktor 2 wegfällt.

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{1}{k_3 [Ax]} \quad (2)$$

Da in der Literatur Peroxidasekinetiken meist vereinfacht nach Michaelis Menten^[108] (Gleichung (3)) ausgewertet werden, kann Gleichung (2) in Gleichung (4) bis (6) für ein jeweils konstantes zweites Substrat entsprechend umgestellt werden.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{mit} \quad v_{max} = [E]_0 \cdot k_{cat} \quad (3)$$

Dabei ist v_{max} die maximale Geschwindigkeit bei Sättigungskonzentration, [S] die Substratkonzentration, K_M die Michaeliskonstante und k_{cat} die Wechselzahl oder katalytische Konstante.

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{1}{k_3 [Ax]} \Leftrightarrow \frac{v}{[E]_0} = \frac{k_1 [H_2O_2] \cdot k_3 [Ax]}{k_1 [H_2O_2] + k_3 [Ax]} \quad (4)$$

$$[Ax]=\text{konst} \Rightarrow \frac{v_0}{[E]_0} = \frac{[H_2O_2] \cdot k_3 [Ax]}{[H_2O_2] + \frac{k_3}{k_1} [Ax]} = \frac{[H_2O_2] \cdot k_{cat}}{[H_2O_2] + K_M} \quad (5)$$

$$[H_2O_2]=\text{konst} \Rightarrow \frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_1 \cdot [H_2O_2] \cdot [Ax]}{\frac{k_1}{k_3} [H_2O_2] + [Ax]} = \frac{k_{cat} \cdot [Ax]}{K_M + [Ax]} \quad (6)$$

Bei den so bestimmten Werten für k_{cat} und K_M handelt es sich um apparente Konstanten, da sie von der Konzentration des anderen Substrats abhängen. Auch während eines Experiments ändern sich die Konzentrationen, so dass Gleichungen (5) und (6) nur für die Anfangsgeschwindigkeit v_0 gelten.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidasereaktion kann einfach über die Fluoreszenzentwicklung mit der Zeit verfolgt werden. Anders als bei Absorptionsmessungen gilt aber bei Fluoreszenzmessungen nicht das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Fluoreszenzintensität hängt vom verwendeten Gerät und den Einstellungen ab, so dass kein

allgemein gültiges Analogon zum Extinktionskoeffizienten angegeben werden kann. Außerdem ist die beobachtete Fluoreszenzintensität wegen des inneren Filtereffekts nur in verdünnten Lösungen proportional zur Fluorophorkonzentration.^[109]

Für die Auswertung wurden deshalb Kalibrierkurven benötigt, die im Mikrotiterplattenleser mit den verwendeten Mikrotiterplatten und Einstellungen bei bekannten Resorufinkonzentrationen aufgenommen wurden. Die Kurven sind im Anhang in Abbildung 85B und C dargestellt und sind bei etwa 2 μM Resorufin linear, die zugehörigen Parameter sind in D aufgelistet. Mit diesen Parametern konnte mit Excel aus der Fluoreszenzintensität bzw. Fluoreszenzzunahme die Amplex Red Konzentration bzw. Konzentrationszunahme berechnet werden, mit der die weitere Auswertung erfolgte.

2.1.2.2 Kinetik von HRP-Konjugaten in Lösung

Kinetikmessungen können über die Methode der Anfangsgeschwindigkeit oder über die Endpunktbestimmung durchgeführt werden. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit werden in kurzen Zeitintervallen Messwerte aufgenommen, die den zeitlichen Verlauf der Reaktion abbilden. Aus der Steigung der linearen Anfangsphase der Reaktion kann durch lineare Regression die Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden. Bei Endpunktbestimmungen wird nur ein Wert nach einem festen Zeitintervall gemessen und daraus eine Durchschnittsgeschwindigkeit berechnet. Diese Methode wird bei experimentell aufwändigen Detektionsverfahren eingesetzt, birgt aber das Risiko, dass es zu Abweichungen durch Einfluss der Reaktionsprodukte, wie Folge- und Rückreaktion oder Produktinhibition, kommt. Daher ist die Methode der Anfangsgeschwindigkeit besser geeignet, da zu Beginn des Experiments die exakte Konzentration der Reaktanden bekannt ist und Einflüsse der Reaktionsprodukte minimal sind.^[109]

Die Kinetikmessungen erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten unter Variation der Amplex Red Konzentration. Die Fluoreszenzentwicklung wurde im Mikrotiterplattenleser Synergy II verfolgt, nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeit ausgewertet, und über die Kalibrierkurve (Abbildung 85B-D, Anhang) in die Resorufinkonzentrationsänderung umgerechnet.

Die auf die Enzymkonzentration $[E]_0$ normierten Anfangsgeschwindigkeiten v_0 von nativer Peroxidase (nHRP) und der DNA-Konjugate mit der Sequenz F5, die entweder über das 5'-Ende (HRP-F5) oder über das 3'-Ende (HRP-3'F5) mit HRP verknüpft ist, wurden in Abbildung 11 gegen die Amplex Red Konzentration aufgetragen und nichtlinear nach Gleichung (6) angepasst.

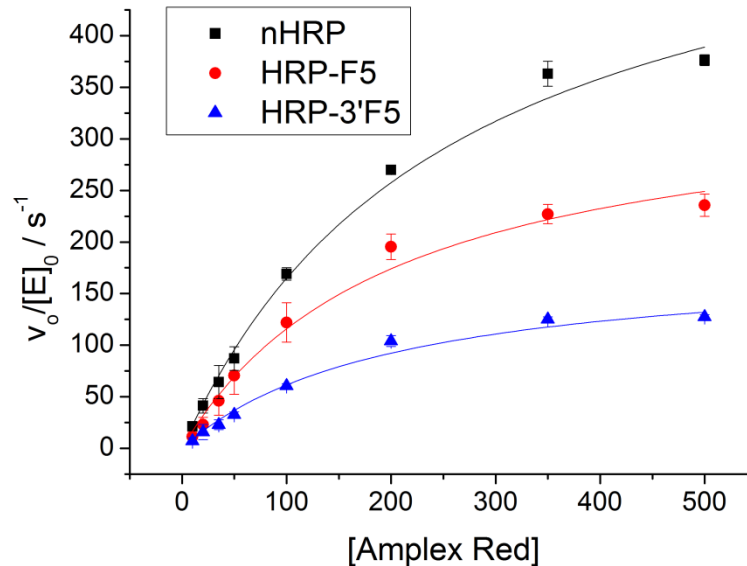


Abbildung 11: Kinetikmessungen von nHRP, HRP-F5 und HRP-3'F5 nach Michaelis Menten. Bei konstanter H_2O_2 -Konzentration von 1 mM wurde die Amplex Red Konzentration variiert. Die Enzymkonzentrationen $[E]_0$ betragen 0,1 nM. Die normierten Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die eingesetzte Amplex Red Konzentration aufgetragen und nach Gleichung (6) nichtlinear angepasst.

Die Datenpunkte folgten dem typischen hyperbolischen Kurvenverlauf und ließen sich gut nach Michaelis Menten anpassen. Ab 350 μM Amplex Red waren die Enzyme gesättigt, und eine weitere Erhöhung der Konzentration führte nicht zu höheren Geschwindigkeiten. Die Ergebnisse des Fits sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Ergebnisse des Fits nach Michaelis Menten der Kinetik von nHRP, HRP-F5 und HRP-3'F5.

Enzym	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / \mu M$	R^2
nHRP	589 ± 26	257 ± 19	0,99722
HRP-F5	350 ± 32	202 ± 45	0,98926
HRP-3'F5	185 ± 11	202 ± 31	0,98909

Durch Anknüpfung des Oligonucleotids nahm die Wechselzahl um etwa 40 % bzw. 60 % ab. Mögliche Gründe sind die chemische Modifizierung sämtlicher Lysine durch den im Überschuss eingesetzten Linker sSMCC, sowie sterische Hinderung durch das 22mer

Oligonucleotid, das ungünstig vor dem aktiven Zentrum platziert sein könnte. Der Unterschied zwischen der F5 und der 3'F5 Sequenz spiegelt teilweise die generelle Streuung bei der Synthese und der Aufreinigung der Konjugate wider. Arbeiten zur Sequenzabhängigkeit von DNA-Enzymkonjugaten belegten auch, dass die Kinetik der Konjugate von der Basensequenz der angehängten DNA abhing.^[110]

Die K_M -Werte blieben im Rahmen der Genauigkeit gleich, die Affinität zum Substrat Amplex Red veränderte sich also nicht durch Anknüpfen des DNA-Stranges.

Vergleichbare Literaturwerte für HRP mit Amplex Red als Substrat sind kaum publiziert. Rho et al. untersuchten HRP mit variablen H_2O_2 -Konzentrationen (11 – 67 μM) und Amplex Red Konzentrationen (17 – 100 μM)^[111], die aber niedriger als die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen waren, so dass die Werte nicht vergleichbar sind. Andere Autoren^[112] variierten die H_2O_2 -Konzentration, so dass die Werte ebenfalls nicht mit den hier gemessenen vergleichbar sind.

2.1.2.3 Reaktionsmechanismus von Glukose-Oxidase

Die Reaktion der Glukose-Oxidase ist ebenfalls eine Mehrsubstratreaktion und folgt dem Ping-Pong-Mechanismus. Wie in Abbildung 12 dargestellt, wird im ersten Schritt Glukose zu Glukonolacton oxidiert, während der Kofaktor Flavinadenindinucleotid (FAD) in die Hydrochinonform $FADH_2$ reduziert wird. Im zweiten Schritt wird $FADH_2$ durch molekularen Sauerstoff zu FAD oxidiert, während der Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert wird.^[113] Neben Sauerstoff können auch verschiedene Chinone als Substrat der zweiten Teilreaktion dienen.^[114]

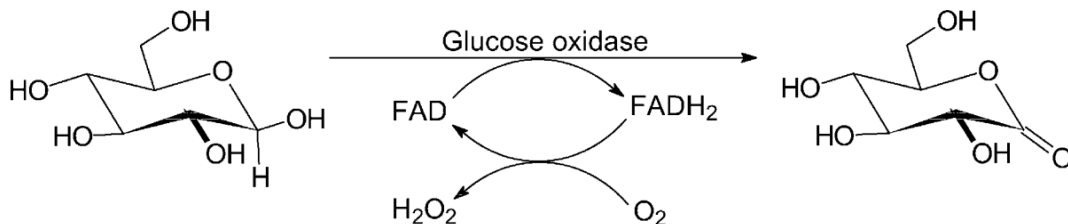


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus der Oxidation von Glukose zu Glukonolacton durch Glukose-Oxidase. Schema nach Leskovac et al.^[114]

Gleichung (16) zeigt die von Leskovac hergeleitete reziproke Form der Geschwindigkeitsgleichung. V_1 entspricht dabei der katalytischen Konstante und K_A und K_B der Michaeliskonstante für Glukose bzw. Sauerstoff.^[114]

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_A}{V_1 [A]} + \frac{K_B}{V_1 [B]} \quad (7)$$

Da die Variation der Glukose- und der Sauerstoffkonzentration experimentell aufwändig ist und die Auswertung zweistufig über Sekundärdiagramme (Auftragung der ermittelten Steigungen gegen die Konzentration des zweiten Substrats) erfolgen würde, wird in der Literatur meist die einfachere Michaelis Menten Gleichung angewendet. Eine legitime Vereinfachung unter Annahme einer konstanten Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ und variabler Glukosekonzentration $[G]$ ist in Gleichung (8) und (9) hergeleitet.^[115]

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{[O_2][G] + K_{O_2}[G] + K_G[O_2]}{V_1 [O_2][G]} \quad (8)$$

$$\Rightarrow \frac{v}{[E]_0} = \frac{V_1 [O_2][G]}{[G]([O_2] + K_{O_2}) + K_G[O_2]} = \frac{\frac{V_1 [O_2]}{[O_2] + K_{O_2}} [G]}{[G] + \frac{K_G [O_2]}{[O_2] + K_{O_2}}} = \frac{k'_{cat} [G]}{[G] + K'_M} \quad (9)$$

Die Reaktion der Glukose-Oxidase kann nicht einfach spektrometrisch verfolgt werden, da weder Produkte noch Edukte nennenswerte Absorptionskoeffizienten aufweisen oder fluoreszieren. In der Literatur sind mehrere Methoden beschrieben: Die direkten Messungen basieren auf der amperometrischen Messung des gebildeten H_2O_2 .^[116] Neue Untersuchungsmethoden nutzen FTIR-Spektroskopie zur Messung der C-O-Streckschwingung von Glukose.^[117] Die am häufigsten angewendete Methode ist aber die enzymatische Detektion des gebildeten H_2O_2 durch das Reporterenzym HRP.^[118] Die Kinetik von GOX kann über die Enzymkaskade nur quantitativ bestimmt werden, wenn die Reaktion von GOX der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Da die inhärenten Parameter der beiden Enzyme in der gleichen Größenordnung liegen,^[23] kann dies beispielsweise durch einen Überschuss von HRP oder Limitierung von Glukose erreicht werden. Im steady state wird das gebildete H_2O_2 1:1 mit Amplex Red umgesetzt und kann fluorometrisch detektiert werden. Die messbare Resorufinbildungsgeschwindigkeit entspricht dann der Reaktionsgeschwindigkeit der Glukose-Oxidase.

2.1.2.4 Kinetik von GOX-Konjugaten in Lösung

Die Messung der Kinetik der GOX-Konjugate erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten unter Variation der Glukosekonzentration mit HRP als Reporterenzym. Das entstehende H_2O_2 wurde durch das Reporterenzym nHRP und Amplex Red zu Resorufin umgesetzt. Da in den späteren Versuchen eine mögliche Aktivitätssteigerung durch räumlich definierte, paarweise Anordnungen der Enzyme untersucht werden sollte, wurden beide Enzyme bei den Kinetikmessungen ebenfalls im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Bei den auf diese Weise erhaltenen kinetischen Parametern handelte es sich deshalb um apparente Konstanten, da sie noch von der Konzentration des Reporterenzym abhängig waren.

Die Fluoreszenzentwicklung wurde im Mikrotiterplattenleser Synergy II verfolgt und, wie die Experimente mit HRP in 2.1.2.2, nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeit ausgewertet. Die auf die Enzymkonzentration $[\text{E}]_0$ normierten Anfangsgeschwindigkeiten v_0 von nativer Glukose-Oxidase (nGOX) und der DNA-Konjugate (GOX-F9 und GOX-3'F9) wurden in Abbildung 13 gegen die Glukosekonzentration aufgetragen und nichtlinear nach Michaelis Menten (Gleichung (9)) angepasst.

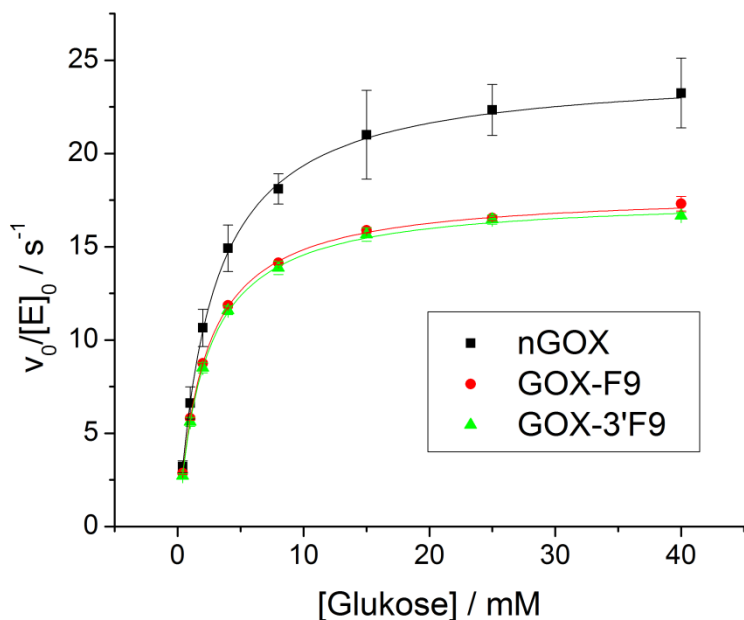


Abbildung 13: Kinetikmessungen von nGOX, GOX-F9 und GOX-3'F9 nach Michaelis Menten unter Variation der Glukosekonzentration. Die Enzymkonzentrationen $[\text{E}]_0$ betragen 1 nM. Das entstehende H_2O_2 wurde mit dem Reporterenzym nHRP (1 nM) bei Anwesenheit von 20 μM Amplex Red zu fluoreszente Resorufin umgesetzt. Die normierten Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die eingesetzte Glukosekonzentration aufgetragen und nach Gleichung (9) nichtlinear angepasst.

Die Kurven zeigen in allen drei Fällen den typischen Michaelis Menten Verlauf. Die Methode über das nachgeschaltete Reporterenzym führte also zu plausiblen Daten. Die Ergebnisse des Fits nach Michaelis Menten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Ergebnisse des Fits nach Michaelis Menten der Kinetik von nGOX, GOX-F9 und GOX-3'F9.

Enzym	k_{cat} / s^{-1}	K_M / mM
nGOX	$24,5 \pm 0,2$	$2,67 \pm 0,06$
GOX-F9	$18,0 \pm 0,1$	$2,10 \pm 0,02$
GOX-3'F9	$17,7 \pm 0,1$	$2,15 \pm 0,04$

Wie bei HRP beobachtet, verringerte die angehängte DNA die Wechselzahl k_{cat} . Der Unterschied betrug hier etwa 24 – 28 % und war damit weniger ausgeprägt als bei HRP. Die Ursache war vermutlich auch hier die Modifikation sämtlicher Lysine, die die Aktivität beeinflusst, sowie mögliche sterische Hinderung durch den DNA-Strang. Da GOX größer ist und zwei aktive Zentren hat, fällt dieser Effekt aber geringer aus. Die Michaeliskonstante nahm ebenfalls ab, was auf eine erhöhte Affinität des aktiven Zentrums zum Substrat Glukose hindeutet. Die Konjugate unterschieden sich aber in beiden Parametern kaum.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten war nicht möglich, da hier apparente Konstanten bestimmt wurden. Die Ergebnisse konnten deshalb nur untereinander verglichen werden und zeigten eine Abnahme der Aktivität durch Konjugation mit DNA. Sie dienten für die weiteren Experimente als Richtgröße.

2.1.2.5 Untersuchungen der Konjugate auf STV-Platten

Die DNA-Enzymkonjugate wurden in STV-beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert, um zu zeigen, dass die Konjugate spezifisch binden, und um den Einfluss der Immobilisierung auf die Aktivität zu untersuchen. Dabei wurde die in der Arbeitsgruppe Niemeyer entwickelte DNA-vermittelte Immobilisierung (DNA-directed immobilization, DDI) angewendet, die die hochspezifische Erkennung von DNA-Strängen nutzt um z. B. DNA-konjugierte Enzyme auf DNA-modifizierten Oberflächen zu immobilisieren.^[28] Das Prinzip wird in Abbildung 14 verdeutlicht.

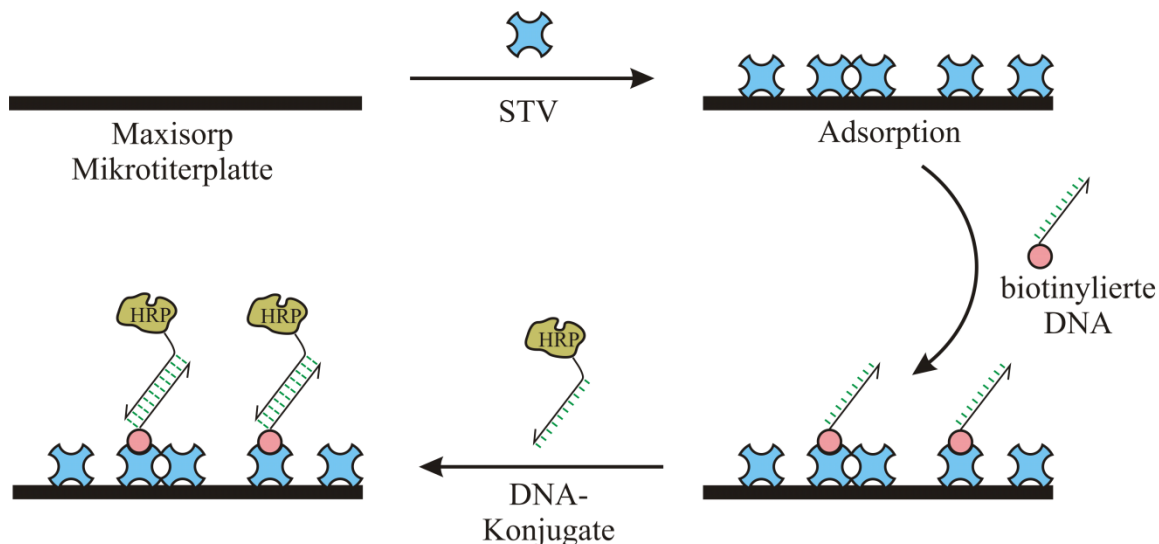


Abbildung 14: DNA-vermittelte Immobilisierung (DDI) am Beispiel von HRP-Konjugaten. Im ersten Schritt wird Streptavidin (STV) auf Maxisorp Mikrotiterplatten unspezifisch adsorbiert. Im zweiten Schritt binden biotinylierte Fängeroligonucleotide, die komplementär zur Sequenz der DNA-Enzymkonjugate sind. Auf der DNA-funktionalisierten Oberfläche können anschließend die DNA-Enzymkonjugate durch Hybridisierung immobilisiert werden. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch DNA-GOX-Konjugate über komplementäre Fängeroligonucleotide in der Mikrotiterplatte immobilisiert.

Im ersten Schritt adsorbierte Streptavidin (STV) unspezifisch auf der Oberfläche der Kavitäten der Maxisorp Mikrotiterplatte. Anschließend wurden biotinylierte Oligonucleotide zugegeben, die komplementär zur Sequenz der DNA-Enzymkonjugate waren. Die Wechselwirkung zwischen Biotin und STV ist die stärkste zur Zeit bekannte Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung und liegt in der Größenordnung von kovalenten Bindungen.^[119] Auf diese DNA-funktionalisierten Oberflächen konnten nun die komplementären DNA-Enzymkonjugate durch Selbstanordnung immobilisiert werden.

Die DNA fungiert aufgrund der hohen Rigidität kurzer DNA-Doppelstränge als Abstandshalter. Dadurch sind die Enzyme besser für Substrate zugänglich, als wenn sie direkt auf der Oberfläche immobilisiert vorlägen. Dies macht sich in einer erhöhten Reaktivität bemerkbar.^[29]

Die Konjugate wurden in der Mikrotiterplatte auf komplementären Fängeroligonucleotiden immobilisiert. Als Kontrollen dienten Vertiefungen, die nicht-komplementäre Oligonucleotide oder gar keine DNA enthielten. Abbildung 15A zeigt, in welcher Konfiguration sich die Konjugate je nach angehängtem Oligonucleotid im DDI anordneten. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Abbildung 15B dargestellt.

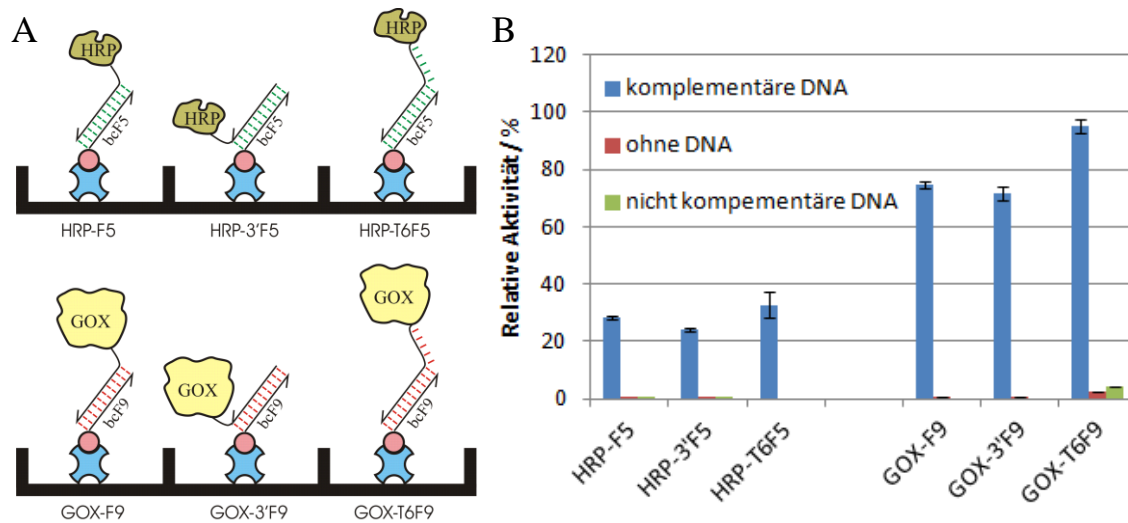


Abbildung 15: **A:** DDI der DNA-Enzymkonjugate auf immobilisierten Fängeroligonucleotiden bcF5 bzw. bcF9 in verschiedenen Konfigurationen in der Mikrotiterplatte. **B:** Relative Aktivität der immobilisierten DNA-Enzymkonjugate. Die HRP-Konjugate (100 fmol) wurden mit den immobilisierten Fängeroligonucleotiden (12 pmol) der Sequenz bcF5 hybridisiert. Für die GOX-Konjugate (100 fmol) wurde die komplementäre Sequenz bcF9 (12 pmol) eingesetzt. Die Aktivität der HRP-Konjugate wurde durch Zugabe von 20 μM Amplex Red und 1 mM H_2O_2 bestimmt. Für GOX wurde 20 μM Amplex Red, 10 mM Glukose und 1 nM nHRP zugegeben. Als Referenz dienten jeweils 100 fmol der freien Konjugate, auf deren Aktivität alle Ergebnisse normiert wurden. Die Aktivität der Kontrollen ohne Fängeroligonucleotide lag zwischen 0,02 und 2 %, für die Kontrollen mit nicht-komplementären Fängeroligonucleotiden lag sie zwischen 0,02 und 4 %.

Alle Konjugate hybridisierten spezifisch mit der komplementären Sequenz. Die relative Aktivität der HRP-Konjugate betrug etwa 25 – 33 % bezogen auf die ungebundenen DNA-Konjugate. Die Abnahme kam durch zwei Effekte zustande:

1. Die eingesetzten DNA-Enzym-Konjugate binden nicht zu 100 %, sondern der nicht gebundene Teil wird bei den Waschschritten weggespült.
2. Immobilisierte Enzyme besitzen meist eine geringere Aktivität, da durch die Nähe zur Oberfläche das Volumen der Einflugschneise der Substrate nahezu halbiert wird.^[109] Außerdem kann es durch eine hohe lokale Enzymkonzentration zu **Substratverarmung** kommen. Die lokale Substratkonzentration nimmt durch die Reaktion mit den Enzymen schneller ab, als Substrat aus der Bulklösung nachdiffundieren kann. Daraus resultiert eine Verringerung der messbaren Enzymaktivität.^[109]

Die beiden Effekte wurden nicht weiter quantifiziert. Für diese Arbeit reichte die Erkenntnis, dass die Enzyme sequenzspezifisch mit komplementären Oligonucleotiden hybridisiert werden konnten.

Interessant waren auch die Unterschiede zwischen den angehängten Sequenzen. Beim 3'-funktionalisierten Konjugat (HRP-3'F5) lag das Enzym im DDI, wie in Abbildung 15A erkennbar, zur Oberfläche ausgerichtet vor, während das Enzym beim 5' funktionalisierten Konjugat (HRP-F5) am freien Ende des Fängeroligonucleotides lokalisiert war. Diese Konfiguration war sterisch begünstigt und führte zu einer erhöhten Aktivität, da vermutlich die Hybridisierungseffizienz größer war.

Das HRP-T6F5-Konjugat enthielt einen aus sechs Thyminen bestehenden Abstandshalter zwischen der adressierbaren Sequenz und dem Enzym. Vermutlich verringerte sich auch dadurch die sterische Hinderung und die Hybridisierungseffizienz stieg.

Bei den immobilisierten GOX-Konjugaten wurde eine relative Aktivität von etwa 70 – 95 % gemessen. Durch Immobilisierung nahm die Aktivität also nur wenig ab. Die verschiedenen Sequenzen zeigten vergleichbare Trends, die schon bei den HRP-Konjugaten diskutiert wurden.

Somit konnte für die HRP- und GOX-Konjugate gezeigt werden, dass die angehängte DNA zugänglich ist und spezifisch zum Immobilisieren auf DNA-funktionalisierten Oberflächen genutzt werden kann. Damit konnten die Konjugate nun eingesetzt werden, um künstliche Multienzymkomplexe aufzubauen und mögliche Nachbarschaftseffekte zu untersuchen.

2.2 Räumlich definierten Anordnungen der GOX- und HRP-Konjugate auf DNA-Gerüsten

Wie in der Einleitung erläutert, ist die Bildung von Multienzymkomplexen eine Möglichkeit zur Kompartimentierung von mehrstufigen Enzymkaskaden in der Nanometerskala. Mithilfe der DNA-Nanotechnologie ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, wohldefinierte künstliche Multienzymkomplexe durch Selbstassemblierung aufzubauen. Dabei können die Abstände und Konfigurationen der Enzyme über die verwendeten DNA-Sequenzen programmiert werden.

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene einfache Anordnungen zum Aufbau der künstlichen Multienzymkomplexe vorgestellt und die Ergebnisse diskutiert. Das Ziel der Experimente war, möglichst hohe Ausbeuten der Komplexe zu erhalten, um einen möglichen Geschwindigkeitsvorteil gegenüber den unkomplexierten bzw. freien Enzymen messen zu

können, der über den Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten quantifiziert werden konnte. Zusätzlich wurde für den Nachweis des kontrovers diskutierten Channelings aus der Zusammenstellung in Tabelle 1 (S. 4) die dritte Methode ausgewählt und angewendet, indem bei vielversprechenden Konfigurationen das Enzym Katalase zum Abfangen des Intermediats H_2O_2 zugegeben wurde.

Im Abschnitt 2.2.5 werden die Ergebnisse der vorigen Abschnitte aus theoretischer Sicht diskutiert und abschließend bewertet.

2.2.1 Anordnung mittels Trägeroligonucleotid in Lösung

Die einfachste Möglichkeit, die beiden Konjugate (GOX-F9 und HRP-F5) in räumliche Nähe zu bringen war, sie auf einem Trägerstrang (bcF5cF9) zu hybridisieren, der aus den beiden dazu komplementären Sequenzen zusammengesetzt ist. Das zugehörige Bindungsgleichgewicht ist in Abbildung 16A dargestellt. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1:1 sollte sich der bienzymatische Komplex (BK) ausbilden. Da es sich aber bei der DNA-Hybridisierung um ein Gleichgewicht handelt, liegen vermutlich auch die Einzelkomponenten und die einfach besetzten Stränge, also unvollständige Komplexe vor. Anhand des Schemas lässt sich erkennen, dass ein Verschieben des Gleichgewichts auf die rechte Seite nicht möglich ist, da bei Überschuss des Trägerstranges die Bildung von einfach besetzten Strängen bevorzugt wird. Bei Überschuss eines oder beider Konjugate liegen diese als freie Konjugate in Lösung vor und überdecken den gesuchten Effekt.

In den folgenden Abschnitten wurde zunächst das Bindungsgleichgewicht mittels Gelelektrophorese untersucht. Neben der in Abbildung 16A gezeigten Konfiguration wurden außerdem die in Abbildung 16C dargestellten Konfigurationen assembliert und untersucht, die durch 3'-verknüpfte Oligonucleotide verfügbar waren. Anschließend erfolgten kinetische Untersuchungen mit Amplex Red (Abbildung 16B), um einen möglichen Geschwindigkeitsvorteil zu identifizieren.

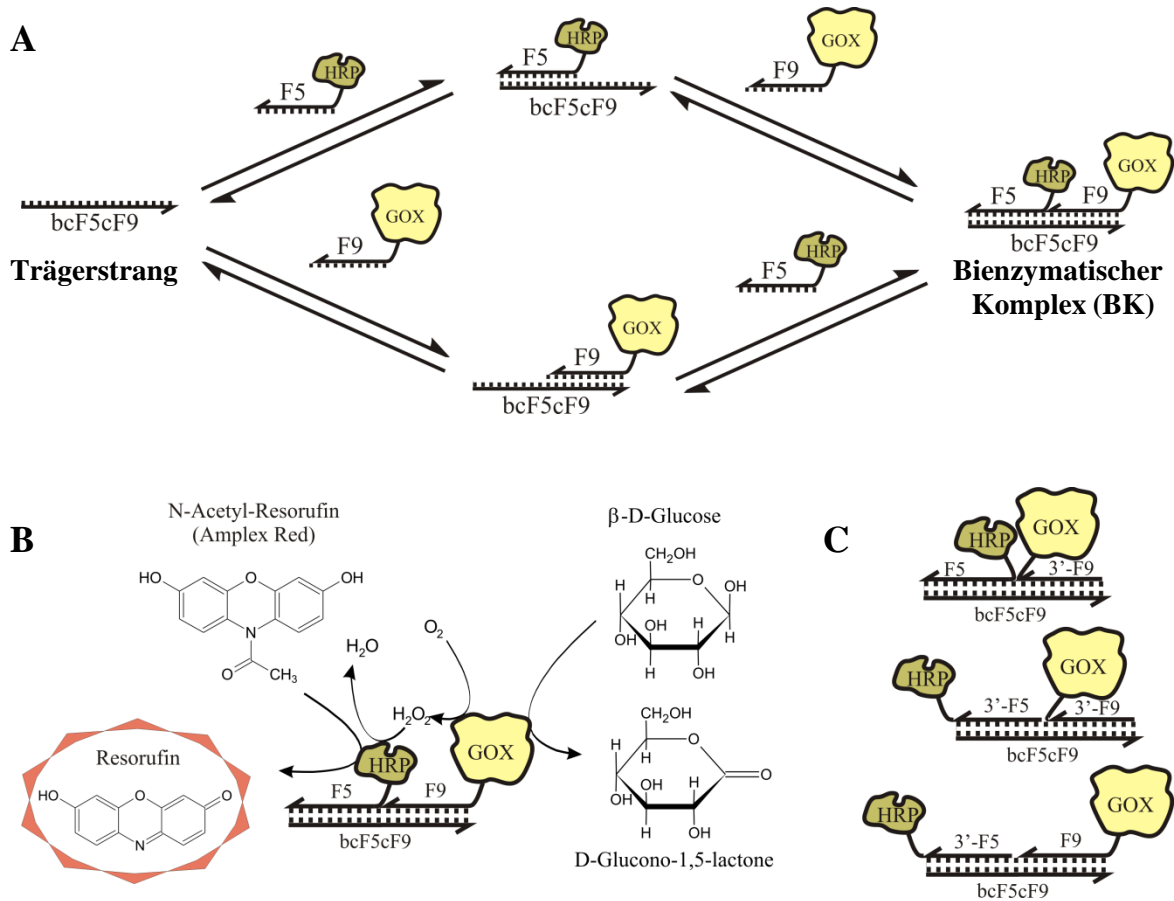


Abbildung 16: **A:** Mehrstufiges Bindungsgleichgewicht des Trägeroligonucleotid bcF5cF9 mit den beiden DNA-Enzymkonjugate HRP-F5 und GOX-F9 zur Bildung des bienzymatischen Komplexes (BK). **B:** Bei der zweistufigen Enzymkaskade dient das von GOX gebildete H_2O_2 als Substrat für das Reporterenzym HRP zur Oxidation von Amplex Red zu fluoreszente Resorufin. **C:** Weitere Konfigurationen des BKs wurden durch Kombination 3'- und 5'-gebundener Konjugate gebildet.

2.2.1.1 Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Komplexbildung

Durch Selbstassemblierung konnten die Konjugate auf einem Trägerstrang zu bienzymatischen Komplexen (BK) angeordnet werden. Dabei wurden die vier in Abbildung 16C gezeigten Konfigurationen gebildet. Die Komplexe wurden in einem nativen Polyacrylamid Gradientengel (4-20 %) untersucht, um die Bindungseffizienz der verschiedenen Anordnungen zu quantifizieren. Als Referenz dienten die einzelnen Komponenten, die im gleichen Gel analysiert wurden.

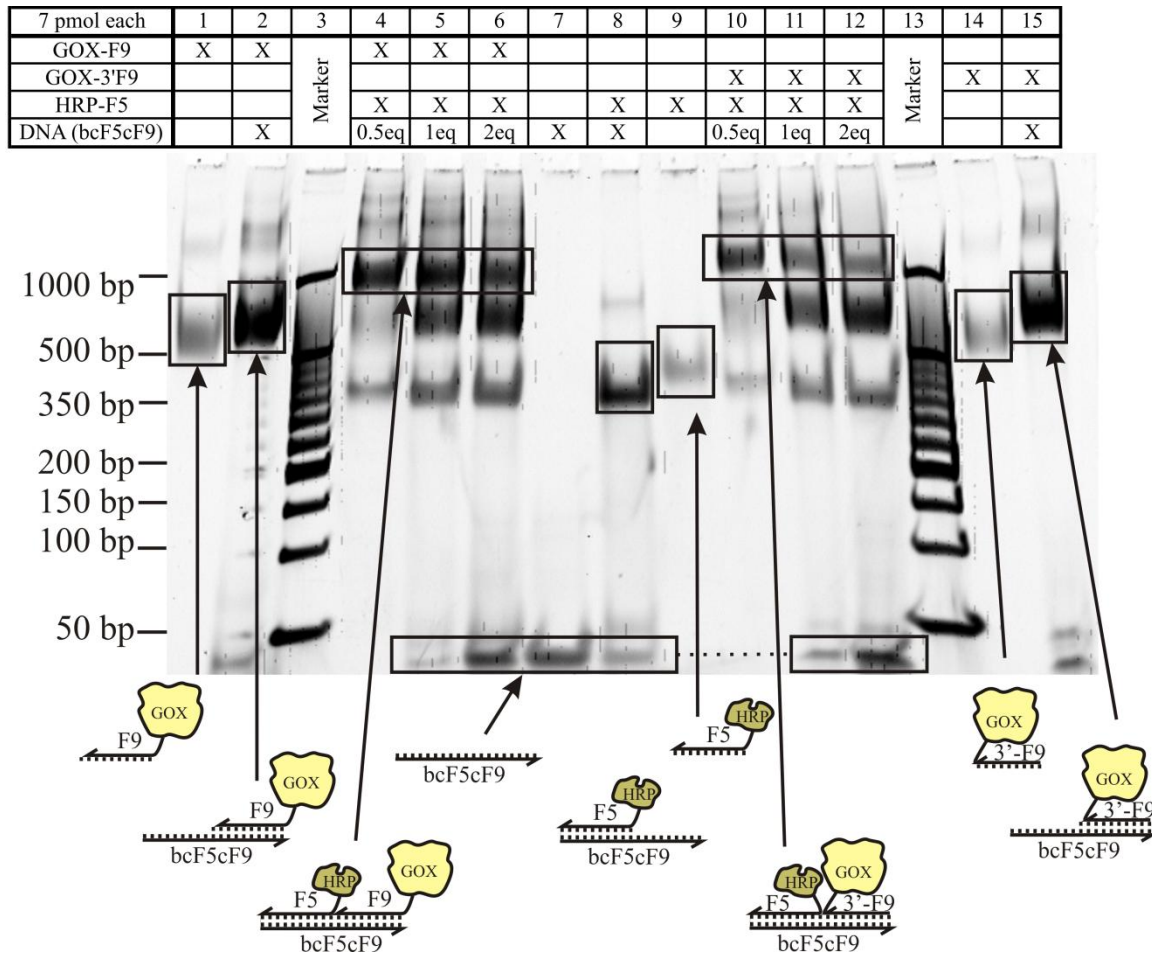


Abbildung 17: Analyse der auf einem Trägerstrang (bcF5cF9) angeordneten GOX- und HRP-Konjugate mittels nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese (Gradientengel, 4-20%, Sybr Goldfärbung). Es wurden zwei verschiedene GOX-F9 Konjugate eingesetzt, bei denen GOX entweder am 5'- (GOX-F9) oder am 3'-Ende (GOX-3'F9) der F9-Sequenz gebunden war, um auch den Effekt der sterischen Hinderung zu untersuchen. Spur 1: GOX-F9; Spur 2: GOX-F9 und bcF5cF9; Spur 3 und 13: Marker (50 bp Leiter, Fermentas); Spuren 4-6: GOX-F9 und HRP-F5 mit 0,5; 1 bzw. 2 eq des Trägerstranges bcF5cF9; Spur 7: Trägerstrang bcF5cF9; Spur 8: HRP-F5 und bcF5cF9; Spur 9: HRP-F5; Spur 10-12: GOX-3'F9 und HRP-F5 mit 0,5; 1 bzw. 2 eq des Trägerstranges bcF5cF9; Spur 14: GOX-3'F9; Spur 15: GOX-3'F9 und bcF5cF9.

Die Spur 1 enthielt das am 5'-Ende verknüpfte GOX-F9, das als Bande bei etwa 600 bp, erkennbar ist. Zusätzlich ist eine hochmolekulare Bande bei > 1000 bp erkennbar, bei der es sich um Agglomerate handeln könnte, die durch Denaturierung oder durch Crosslinking bei der Synthese mit sSMCC gebildet werden könnten.

Durch Zugabe des komplementären Trägerstranges bcF5cF9 in Spur 2 verringerte sich die elektrophoretische Mobilität der Bande. Konjugat und Trägerstrang bildeten eine DNA-Doppelhelix, so dass die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs SybrGold durch Interkalation anstieg. Ein ähnlicher Effekt ist bei der höhermolekularen Bande erkennbar. Zusätzlich ist

eine schwache Bande bei < 50 bp erkennbar, die ungebundener DNA entspricht. Sie weist dieselbe Mobilität auf, wie der in Spur 7 einzeln aufgetragene Trägerstrang bcF5cF9.

In Spur 14 und 15 wurden die am 3'-Ende verknüpften GOX-Konjugate ohne Trägerstrang (Spur 14) und mit Trägerstrang (Spur 15) aufgetragen und zeigen das bereits für Spur 1 und 2 diskutierte Bandenmuster.

Spur 9 enthielt das HRP-F5-Konjugat. Es weist eine höhere elektrophoretische Mobilität auf, als die GOX-Konjugate, vermutlich wegen der geringeren Größe. Durch Hybridisierung mit dem Trägerstrang in Spur 8 erfolgt eine Intensivierung der Bande durch Interkalation des SybrGold. Im Gegensatz zu GOX in Spur 2 und Spur 15 führte die Bildung der Doppelhelix bei HRP zu einer Erhöhung der Mobilität.

Alle drei DNA-Konjugate konnten also mit der komplementären DNA hybridisieren, was beweist, dass die angehängten Oligonucleotide frei zugänglich sind. Durch gleichzeitige Inkubation der beiden Konjugate mit dem Trägerstrang in Spur 4 – 6 (Kopf-Schwanz-Anordnung) und in Spur 10 – 12 (Kopf-Kopf-Anordnung) konnte der BK gebildet werden, der als neue Bande bei etwa 1000 bp erkennbar ist.

Trotzdem sind in allen sechs Spuren auch signifikante Mengen ungebundener Konjugate erkennbar. Bei 0,5 eq des Trägerstrangs entsprechen die zusätzlichen Banden den nicht-hybridisierten Konjugaten in Spur 1 und 9 bzw. 14 und 9. Größere Mengen des Trägerstranges (1 und 2 eq) führten nicht zu einer höheren Ausbeute des BK, sondern zu einer Intensivierung der Banden der einzelnen Konjugate durch Hybridisierung, vergleichbar mit Spur 2 und 8 bzw. 15 und 8. Gleichzeitig kann bei etwa 50 bp eine Bande des freien Trägerstranges identifiziert werden. Selbst bei äquimolaren Mengen lagen also ungebundene Enzyme vor, da vermutlich aus sterischen Gründen die Bildung des BK gehindert wurde und damit das mehrstufige Bindungsgleichgewicht auf Seite der ungebundenen Konjugate bzw. der nur einfach besetzten Trägerstränge verschoben war.^[120]

Die verschiedenen Anordnungen in Spur 4 – 6, und Spur 10 – 12 unterscheiden sich in der Intensität der Bande des BK bei etwa 1000 bp. Bei der Kopf-Kopf-Anordnung der Konjugate (Spur 10 – 12) ist die sterische Hinderung stärker als bei der Kopf-Schwanz-Anordnung (Spur 4 – 6), bei der eine höhere Hybridisierungseffizienz erhalten wird.

Anstelle von HRP-F5 wurden auch Proben mit HRP-3'F5 inkubiert und mittels der gleichen Gradienten-Gelelektrophorese untersucht. Die dadurch entstehenden Schwanz-

Kopf- und Schwanz-Schwanz-Anordnungen des Bk (vgl. Konfigurationen in Abbildung 16C) führten zu vergleichbaren Bandenmustern wie in Abbildung 17, höhere Ausbeuten des BK waren aber nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Da bei der Messung des Channelings frei diffundierende Enzyme in der Bulklösung den Effekt überlagerten, musste die Hybridisierungseffizienz optimiert werden. Dazu wurden die Konjugate für die günstigere Kopf-Schwanz-Anordnung mit einem zusätzlichen Abstandshalter bestehend aus sechs Thyminen synthetisiert, um die sterische Hinderung zu verringern. Die Bildung der Komplexe wurde elektrophoretisch mit einem Gradientengel analysiert, das in Abbildung 18 gezeigt ist.

Die Referenzen in Spur 1 – 2 und 10 – 12 dienten der Zuordnung der Banden und zeigten ähnliches Migrationsverhalten wie in Abbildung 17. In Spur 4 – 8 wird der BK mit verschiedenen Äquivalenten des Trägerstranges bcF5cF9 gebildet. Die Ausbeute nimmt von 0,3 bis 1 eq zu. Erst bei Überschuss des Trägerstranges (1,5 und 2,5 eq) steigt die Intensität der Banden, die nur einfach besetzte Trägerstränge repräsentieren. Bei 2,5 eq ist zusätzlich eine Bande des freien Trägerstranges bei ca. 50 bp erkennbar.

Im Vergleich zu Abbildung 17 ist die Hybridisierungseffizienz bei äquimolaren Mengen durch Einfügen des Abstandshalters verbessert. Der BK konnte in größeren Ausbeuten erhalten werden, und der Anteil der gleichzeitig in der Lösung vorliegenden freien Enzyme wurde verringert. Die exakte Verteilung konnte nicht quantifiziert werden, da die Intensität der SybrGold Färbung bei doppelsträngiger DNA überproportional zunimmt, was eine quantitative Graustufenanalyse der Banden unmöglich macht.

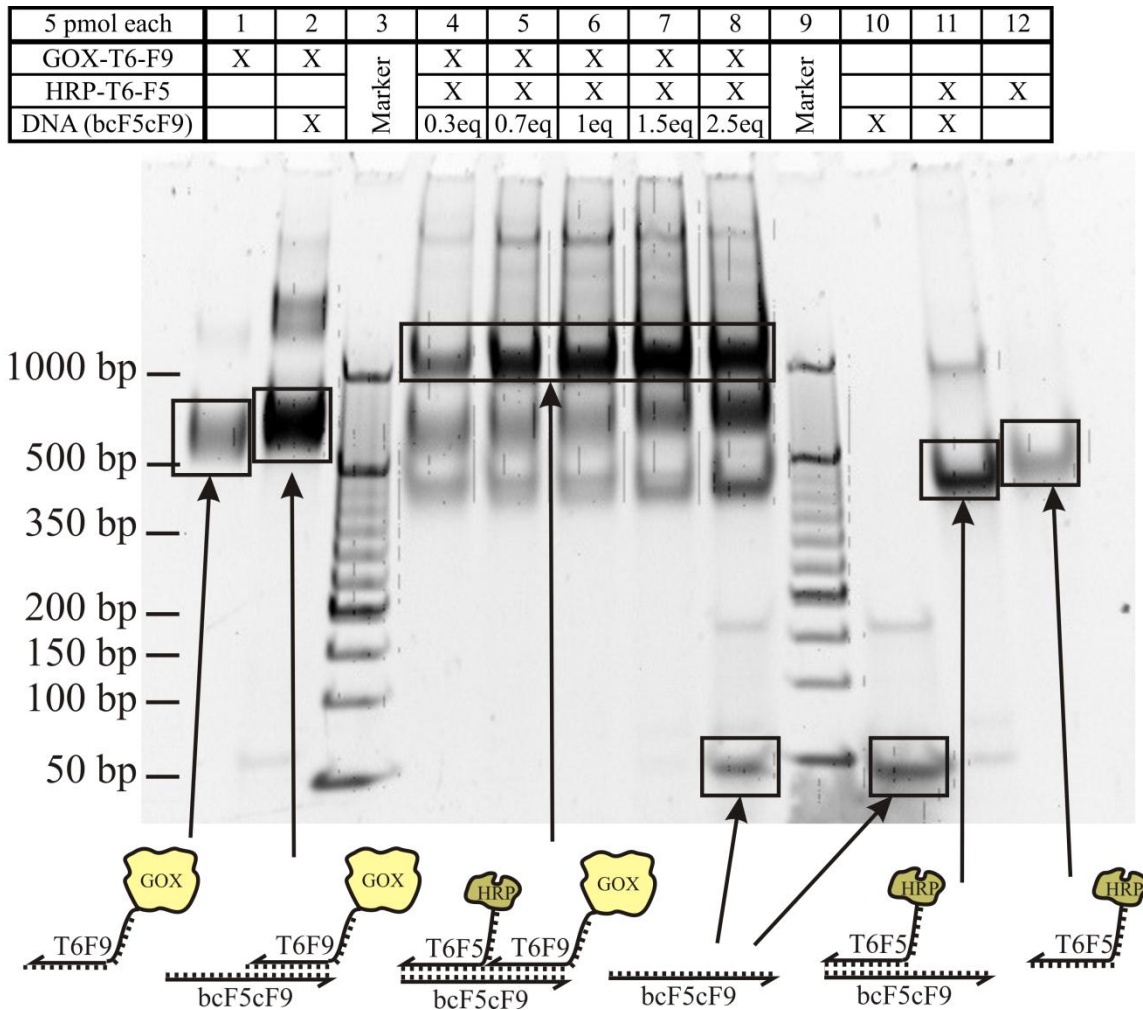


Abbildung 18: Analyse der auf einem Trägerstrang (bcF5cF9) angeordneten Konjugate GOX-T6F9 und HRP-T6F5 mittels nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese (Gradientengel, 4-20%, Sybr Goldfärbung). Beide Konjugate enthalten einen Abstandhalter bestehend aus sechs Thyminen. Spur 1: GOX-T6F9; Spur 2: GOX-T6F9 und bcF5cF9; Spur 3 und 9: Marker (50 bp Leiter, Fermentas); Spur 4-8: GOX-T6F9 und HRP-T6F5 mit 0,3; 0,7; 1; 1,5; und 2,5 eq des Trägerstranges bcF5cF9; Spur 10: bcF5cF9; Spur 11: HRP-T6F5 und bcF5cF9; Spur 12: HRP-T6F5.

2.2.1.2 Kinetische Untersuchungen

Die künstlichen BK wurden durch Inkubation der Komponenten durch Selbstassemblierung gebildet. In einer Kontrollprobe wurden beide DNA-Enzymkonjugate ohne Trägerstrang inkubiert, was den Vergleich mit den freien Enzymen ermöglicht. Wegen der in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen unvollständigen Komplexbildung wurde das stöchiometrische Verhältnis des Trägerstranges relativ zur eingesetzten Enzymmenge variiert. Um Verluste durch Adsorption an Gefäßwänden zu minimieren, wurden die

Verdünnungen in Low Binding Cups angesetzt und dem Puffer 0,1 mg/mL BSA zugesetzt. In einer Mikrotiterplatte wurde anschließend die Anfangsgeschwindigkeit nach Zugabe von Glukose und Amplex Red bestimmt. Die auf die eingesetzte Enzymkonzentration normierten Anfangsgeschwindigkeiten $v_0/[E]_0$ sind in Abbildung 19 als Säulendiagramm aufgetragen.

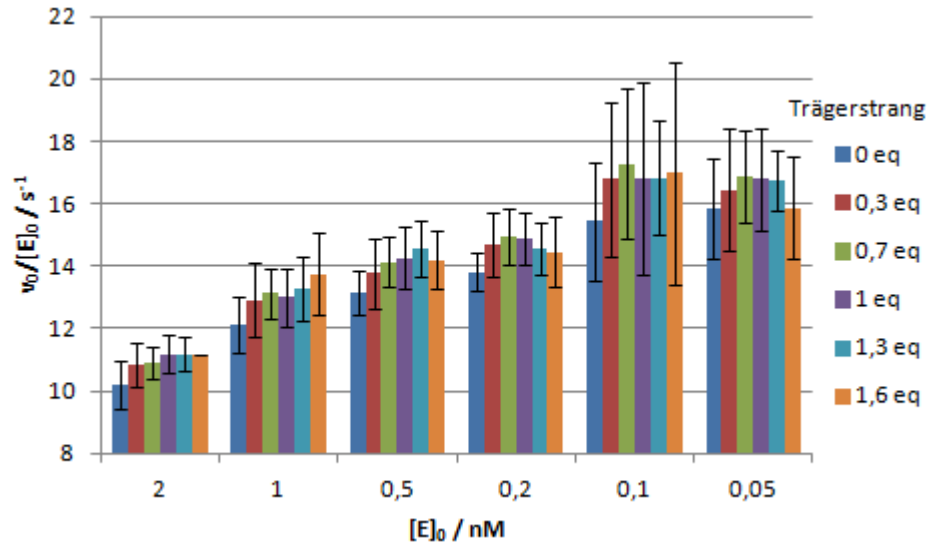


Abbildung 19: Kinetikmessungen des BK in Lösung. Die beiden Konjugate HRP-T6F5 und GOX-T6F9 wurden mit variablen Mengen (0 – 1,6 eq) des Trägerstranges bcF5cF9 inkubiert. Nach 90 min wurden Aliquots der Ansätze als Verdünnungsreihe ($[E]_0 = 0,05 - 2$ nM) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte transferiert. Durch Zugabe von 20 μ M Amplex Red und 10 mM Glukose wurde die Reaktion gestartet. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte aus drei Messungen der auf die Enzymkonzentration normierten Anfangsgeschwindigkeiten $v_0/[E]_0$.

Die Größenordnung der Ergebnisse stimmt mit den Kinetikmessungen nach Michaelis Menten in Abschnitt 2.1.2.4 überein. Dort wurden bei 10 mM Glukose $v_0/[E]_0 \approx 16$ s⁻¹ gemessen. Wie schon in der Gelelektrophorese beobachtet wurde, lagen die Enzyme bei Abwesenheit des Trägerstranges homogen verteilt in der Lösung vor. Bei Anwesenheit des Trägerstranges bildete sich ein Gleichgewicht zwischen freien Enzymen, unvollständigen Komplexen und dem BK aus, vergleiche Abbildung 16A. Bei 0,7 bis 1 eq war der Anteil des BK maximal. Ein Überschuss des Trägerstranges verschob das Gleichgewicht zu den unvollständigen Komplexen. Bei den kinetischen Untersuchungen wurde deshalb eine maximale Aktivität bei den Proben mit 0,7 bis 1 eq des Trägerstranges erwartet. Die Ergebnisse zeigten bei Abwesenheit von DNA die niedrigsten normierten Anfangsgeschwindigkeiten, da alle Enzyme homogen verteilt in der Lösung vorlagen. Allerdings ist das erwartete Maximum nicht eindeutig erkennbar.

Durch die Verdünnung der Proben nahm die Effizienz der Reaktion zu, da verhältnismäßig mehr Substrat pro Enzym zur Verfügung stand und der relative Substratverbrauch sank. Dieser Effekt war an der Erhöhung der $v_0/[E]_0$ -Werte bei niedrigen Enzymkonzentrationen erkennbar. Gleichzeitig nahm durch die Verdünnung der mittlere Abstand zwischen den Komplexen zu. Bei niedrigen Konzentrationen ist die Diffusionsstrecke länger und der intramolekulare Reaktionsweg ist gegenüber dem intermolekularen Reaktionsweg begünstigt. Deshalb waren bei den niedrigen Verdünnungen $[E]_0 = 0,05 - 0,2$ nM die Anfangsgeschwindigkeiten bei 0,7 bis 1 eq des Trägerstranges erhöht. Der Effekt fiel unerwartet niedrig aus und wurde vermutlich durch Reaktion der im Gleichgewicht vorliegenden freien Enzyme überlagert.

Um den intermolekularen Reaktionsweg zu verhindern, wurden Kinetikmessungen in Anwesenheit von Katalase durchgeführt. Katalase ist eins der schnellsten bekannten Enzyme und disproportioniert H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Nur wenn H_2O_2 innerhalb des BK zu HRP gelangt, kann Amplex Red gebildet werden. Diffusion in die Bulklösung führt zu Zersetzung durch Katalase und sollte so die Bildung des Amplex Red verhindern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Die Anwesenheit von Katalase führte zu einer Abnahme der Anfangsgeschwindigkeiten. Besonders bei niedrigen Enzymkonzentrationen wurde absolut betrachtet weniger H_2O_2 gebildet, so dass bei gleichbleibender Katalasekonzentration die zweistufige Reaktion nahezu vollständig unterbunden wurde.

Bei einem direkten Channeling des H_2O_2 innerhalb des BK würde die zweistufige Reaktion weniger unterdrückt werden. In Abbildung 20 wurden allerdings alle Proben gleichermaßen von der Katalase beeinflusst. Ein Vorteil der Proben mit 0,7 oder 1 eq des Trägerstranges ist nicht erkennbar, so dass hier kein Channeling nachgewiesen werden konnte. Bei $[E]_0 = 0,5 - 2$ nM war die Kontrolle ohne DNA erniedrigt, was auch bereits in Abbildung 19 beobachtet werden konnte. Dies ist möglicherweise durch einen stabilisierenden Effekt der komplementären DNA auf die DNA-Konjugate während der 90 minütigen Inkubation erklärbar.

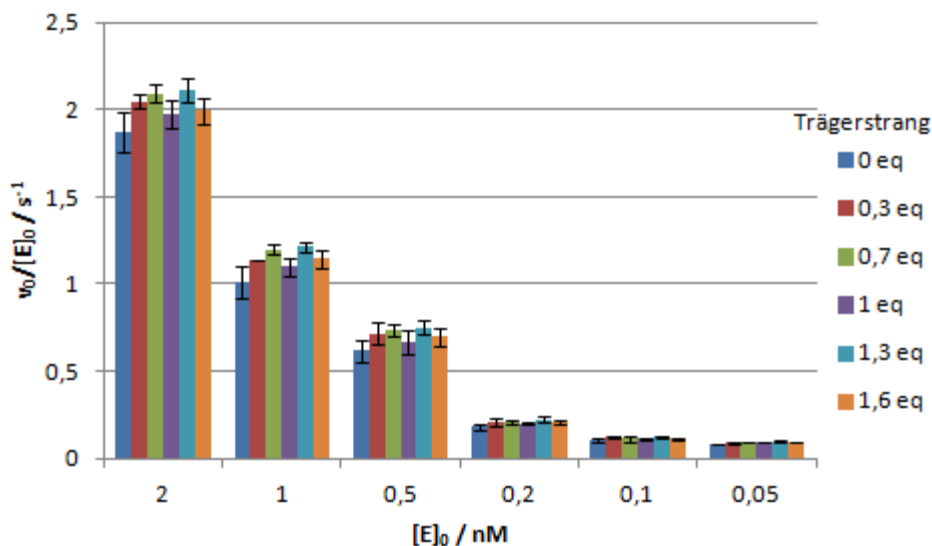


Abbildung 20: Unterdrückung der Kinetikmessungen des BK in Lösung bei Anwesenheit von 100 nM Katalase. Die beiden Konjugate HRP-T6F5 und GOX-T6F9 wurden mit variablen Mengen (0 – 1,6 eq) des Trägerstranges bcF5cF9 inkubiert. Nach 90 min wurden Aliquots der Ansätze als Verdünnungsreihe ($[E]_0 = 0,05 - 2$ nM) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte transferiert. Durch Zugabe von 20 μ M Amplex Red und 10 mM Glukose und 100 nM Katalase wurde die Reaktion gestartet. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte aus drei Messungen der auf die Enzymkonzentration normierten Anfangsgeschwindigkeiten $v_0/[E]_0$.

Diese Ergebnisse sind in der Größenordnung von aktuellen Ergebnissen der Gruppe um Hess. Sie erzeugten chemisch gekoppelte GOX-HRP-Paare und untersuchten die Kinetik auch in Anwesenheit von Katalase.^[23] Ein 20facher molarer Überschuss der Katalase erniedrigte die Aktivität um den Faktor 3,7, und ein 200facher Überschuss führte zu einer Abnahme um den Faktor 40. Bei 400fachem Überschuss wurde die Reaktion sogar vollständig unterbunden. Beim Vergleich von Abbildung 19 und Abbildung 20 ist bei 2 nM BK (50facher Katalaseüberschuss) eine Abnahme um den Faktor 5 bis 6 und bei 0,5 nM BK (200facher Katalaseüberschuss) ein Faktor 20 erkennbar. Da sich die absoluten Enzymkonzentrationen und das Substrat der HRP-Reaktion (ABTS) aber unterschieden, waren die beiden Systeme nur bedingt vergleichbar. Die Abnahme der Aktivität durch Abfangen des H_2O_2 lag aber in der gleichen Größenordnung. Darüber hinaus konnten die Autoren ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen dem gekoppelten und dem freien System feststellen,^[23] so dass bei dem in dieser Arbeit untersuchten System, selbst bei idealen Bindungsgleichgewichten mit optimalen Ausbeuten, ein Channeling unwahrscheinlich sein sollte.

Neben dem hier diskutierten BK wurden auch die anderen in Abbildung 16C dargestellten Konfigurationen gemessen und ergaben ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse. Versuche, die Konjugate mit einer Ligase zu verknüpfen, führten auch nicht zum Erfolg. In weiteren Versuchen wurden Enzyme direkt gekuppelt, um das Problem der Bindungsgleichgewichte zu umgehen.

2.2.2 Direkte Kopplung komplementärer DNA-Enzymkonjugate

Neben der Anordnung der DNA-Enzymkonjugate auf einem Trägerstrang wurde auch die direkte Kupplung komplementärer DNA-Konjugate untersucht. Erste Messungen konnten nicht eindeutig ausgewertet werden, da als Referenz nur die nativen unmodifizierten Enzyme zur Verfügung standen. Allerdings ändert sich die Aktivität durch Anhängen der DNA (Abschnitt 2.1.2.2 und 2.1.2.4) und durch Hybridisierung (Abschnitt 2.1.2.5), so dass sie als Kontrollen nicht geeignet waren.

Durch Strangverdrängung ergab sich aber eine elegante Möglichkeit, die identischen Konjugate gleichzeitig als bienzymatischen Komplex (BK) und einzeln vorliegend als Kontrolle (Doppelstrangkongjugate DSK) zu untersuchen. Das Konzept ist in Abbildung 21 dargestellt.

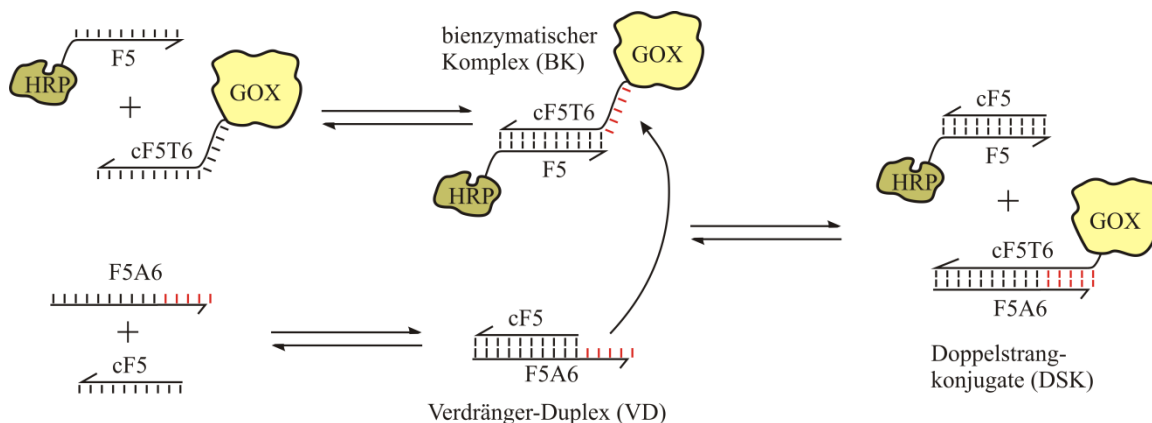


Abbildung 21: Direkte Hybridisierung komplementärer DNA-Konjugate. Die komplementären DNA-Konjugate HRP-F5 und GOX-T6cF5 hybridisieren und bilden den bienzymatischen Komplex (BK). Der T6-Abstandshalter ist dabei ein überhängendes Ende des Doppelstranges. Als Kontrolle werden die unmodifizierten Oligonucleotide F5A6 und cF5 zugegeben, die ebenfalls komplementär sind und einen Doppelstrang (VD) mit überhängendem Ende ausbilden. Zwischen VD und BK stellt sich ein Gleichgewicht mit den Doppelstrangkongjugaten (DSK) cF5/HRP-F5 und F5A6/GOX-T6cF5 ein, die als Kontrolle dienen.

Die Triebkraft der Strangverdrängung ist die Ausbildung des längeren Doppelstrangs F5-A6/GOX-T6cF5, bei dem statt 22 Basen 28 Basen gepaart sind. Durch Stapelwechselwirkung und zusätzliche Wasserstoffbrücken ist der längere Doppelstrang energetisch günstiger und verschiebt das Gleichgewicht.^[121] Ohne die komplementären Einzelstränge bildet sich also der BK. Bei Anwesenheit der komplementären Einzelstränge bilden sich die Kontrollen, bei denen die Enzyme einzeln als DSKe vorliegen.

2.2.2.1 Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Komplexbildung

Die Strangverdrängung sowie die Bindungseffizienz des direkt hybridisierten BKs wurden zunächst mittels nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Alle Proben enthielten die beiden Konjugate, die mit 0, 1 und 10 eq der beteiligten Einzelstrang-DNA inkubiert wurden. Ein Foto des Gels ist in Abbildung 22 dargestellt.

Das Gel zeigt in Spur 1 – 3 die Strangverdrängung mit 10 eq der komplementären Einzelstränge. Durch Interkalation des Farbstoffs SybrGold war die Fluoreszenzintensität bei Doppelsträngen erhöht, so dass die Banden einfach zugeordnet werden konnten. Spur 1 enthielt, neben den beiden Konjugaten, nur cF5, so dass sich das HRP-DSK (500 bp) bildete, das neben freiem GOX-T6cF5 (1000 bp) vorlag. Spur 2 enthielt nur F5A6 und es bildete sich das GOX-DSK (1200 bp), während HRP-F5 (600 bp) frei vorlag. In Spur 3 waren beide komplementären Einzelstränge verfügbar, und es bildeten sich beide DSK. Wie schon in Abschnitt 2.2.1.1 beobachtet, nahm die Mobilität der GOX-Konjugate durch Hybridisierung ab, während die der HRP-Konjugate durch Hybridisierung beschleunigt wurden.

Die im Überschuss vorliegenden nicht gebundenen Oligonucleotide wanderten in den diskutierten Spuren mit der Lauffront und sind bei 200 bp als Banden erkennbar. Die Auflösung des Gels war aber für die Enzyme optimiert, so dass hier nicht zwischen dem 22- und 28mer oder dem Doppelstrang unterschieden werden kann.

Spur 4 enthielt nur die beiden Konjugate ohne komplementäre Einzelstränge. Hier ist der BK eindeutig bei etwa 1700 bp erkennbar. Schwache Banden bei 1000 bp und 600 bp lassen aber vermuten, dass neben dem Komplex auch geringe Mengen freier Konjugate im Gleichgewicht vorlagen.

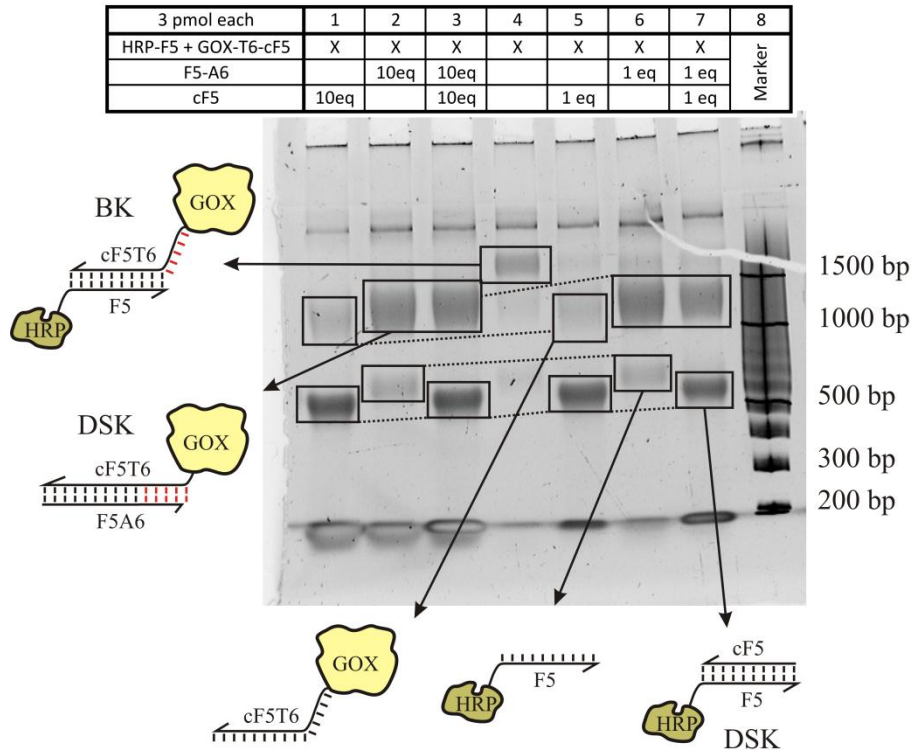


Abbildung 22: Analyse des direkt hybridisierten bienzymatischen Komplexes (BK) und der durch Strangverdrängung erzeugten Kontrollen mittels nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese (8,5 %, Sybr Goldfärbung). Spur 1-7: Konjugate (HRP-F5 und GOX-T6cF5); Spur 1-3: zusätzlich 10 eq der komplementären Verdrängungsstränge F5-A6 und cF5 in verschiedenen Kombinationen; Spur 5-7 zusätzlich 1 eq der komplementären Verdrängungsstränge F5A6 und cF5 in verschiedenen Kombinationen; Spur 7: Marker (100 bp O'Range Leiter, Thermo Scientific). Der gewünschte Komplex ist in Spur 4 bei etwa 1700 bp erkennbar.

Die Spuren 5 – 7 sind vergleichbar mit den Spuren 1 – 3 mit dem Unterschied, dass nur 1 eq der komplementären Einzelstrang-DNA vorlag. Das Bandenmuster ist identisch, aber bei 1600 bp ist eine schwache Bande des BK erkennbar. Bei nur 1 eq Einzelstrang-DNA erfolgte der Strangaustausch also nicht vollständig.

Der BK konnte also in hohen Ausbeuten erzeugt werden. Bei Überschuss von Einzelstrang-DNA bildeten sich durch Strangverdrängung die DSKe, die in den folgenden Kinetikmessungen als Referenz dienten.

2.2.2.2 Kinetische Untersuchungen

Die direkt hybridisierten bienzymatischen Komplexe (BK) wurden zusammen mit den Kontrollen, die durch Strangverdrängung (DSK) erzeugt wurden, kinetisch untersucht. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion mit Amplex Red und Glukose sind in Abbildung 23

als Säulendiagramm aufgetragen. Die für die Bildung der Kontrollen eingesetzte komplementäre Einzelstrang-DNA wurde in variablen Verhältnissen eingesetzt.

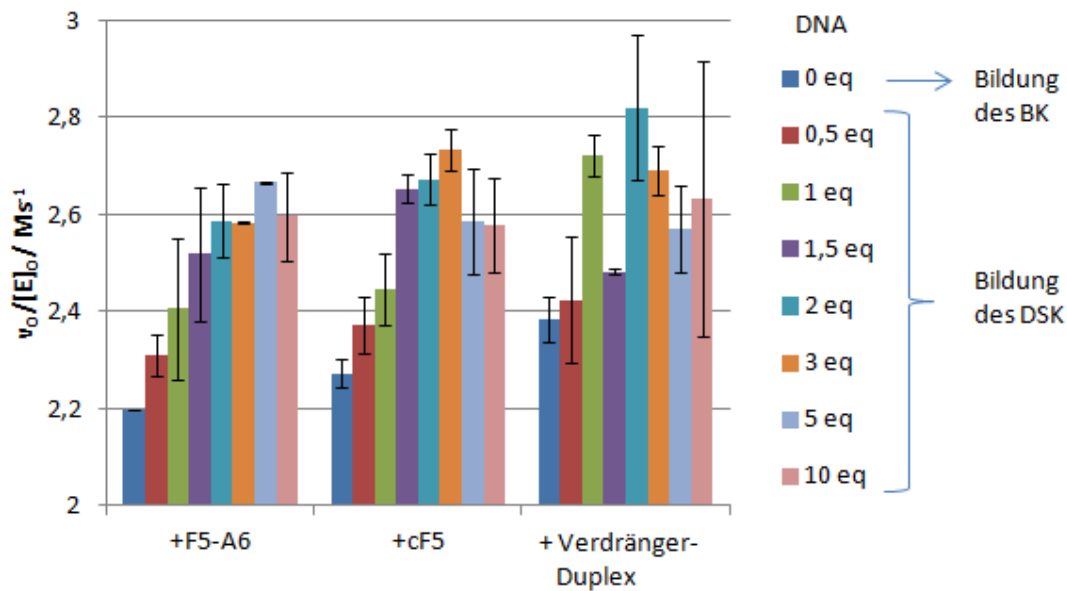


Abbildung 23: Kinetikmessungen des direkt hybridisierten bienzymatischen Komplexes (BK) (0 eq DNA) und der Doppelstrang-Konjugate (DSK) als Kontrollen (0,5 eq – 10 eq DNA). Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit 20 μM Amplex Red und 1 mM Glukose gemessen. Die Konzentration der Enzyme betrug 0,5 nM. Die Proben ohne DNA enthielten den BK und sollten aktiver sein, als die Kontrollen mit steigender DNA-Konzentration.

Die Aktivitäten fielen insgesamt niedriger aus, als in Abbildung 19, da hier nur 1 mM Glukose eingesetzt wurden. Die Daten sind jedoch in Übereinstimmung mit den Kinetikmessungen nach Michaelis Menten in Abschnitt 2.1.2.4 für 1 mM Glukose. Die Proben ohne DNA (0 eq) enthielten den direkt hybridisierten BK. Alle DNA-enthaltenden Proben (0,5 – 10 eq) zeigten höhere Aktivität, unabhängig davon, ob nur ein komplementärer Strang (F5-A6 bzw. cF5) anwesend war oder beide (Verdränger-Duplex). Dieser Effekt stieg mit größerem Einzelstrang-Überschuss. Obwohl die Gelelektrophorese in Abschnitt 2.2.2.1 zeigte, dass gute Ausbeuten des BK möglich waren, war hier kein kinetischer Vorteil durch räumliche Nähe der beiden Enzyme zu erkennen. Stattdessen wurde das Gegenteil beobachtet, dass die einzeln vorliegenden Konjugate, die durch Strangverdrängung erzeugt wurden, insgesamt sogar reaktiver waren. Dies könnte, wie bereits in Abschnitt 2.2.1 diskutiert, durch die stabilisierende Wirkung der zusätzlichen DNA verursacht werden.

Weitere Experimente mit ABTS als Substrat, niedrigeren Glukosekonzentrationen (um die H_2O_2 -Produktion zu verringern) und Verdünnungsreihen des BK (um den mittleren

Abstand zwischen den Komplexen zu erhöhen) führten nicht zu besser interpretierbaren Ergebnissen. Mit dem direkt hybridisierten BK konnte also keine Aktivitätssteigerung durch räumliche Nähe der beiden Enzyme nachgewiesen werden. Eine vergleichende Diskussion, auch aus theoretischer Sicht, erfolgt in Abschnitt 2.2.5.

2.2.3 Alternierende Anordnung auf einer ausgedehnter linearen Hexagonträgerstruktur

Während der experimentellen Phase dieser Doktorarbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Itamar Willner konzeptionell ähnliche Versuche durchgeführt. Das GOX/HRP-Enzympaar wurde, wie in Abbildung 24A und B dargestellt, auf einem repetitiven DNA-Hexagonband immobilisiert und die Aktivität mit ABTS gemessen. Die veröffentlichten Ergebnisse (Abbildung 24C) zeigten eine um den Faktor 20 erhöhte Aktivität verglichen mit den frei in Lösung vorliegenden Enzymen.^[35] Da in den bisher diskutierten Experimenten keine eindeutigen Nachbarschaftseffekte nachgewiesen werden konnten, wurde das von Willner beschriebene System nachgestellt, um deren Ergebnisse zu reproduzieren.

Die dafür benötigten DNA-Enzymkonjugate wurden nach den publizierten Bedingungen synthetisiert und aufgereinigt (vgl. Abschnitt 4.3.1.2). Die DNA-Trägerstruktur wurde nach dem in der Veröffentlichung angegebenen Temperaturprofil assembliert und anschließend mit den DNA-Enzymkonjugaten hybridisiert. Die so präparierten Proben wurden in einer Küvette durch Zugabe von Glukose und ABTS im Photometer auf ihre Aktivität untersucht. Abbildung 24C zeigt die publizierten Ergebnisse, Teilabbildung D die eigenen Ergebnisse.

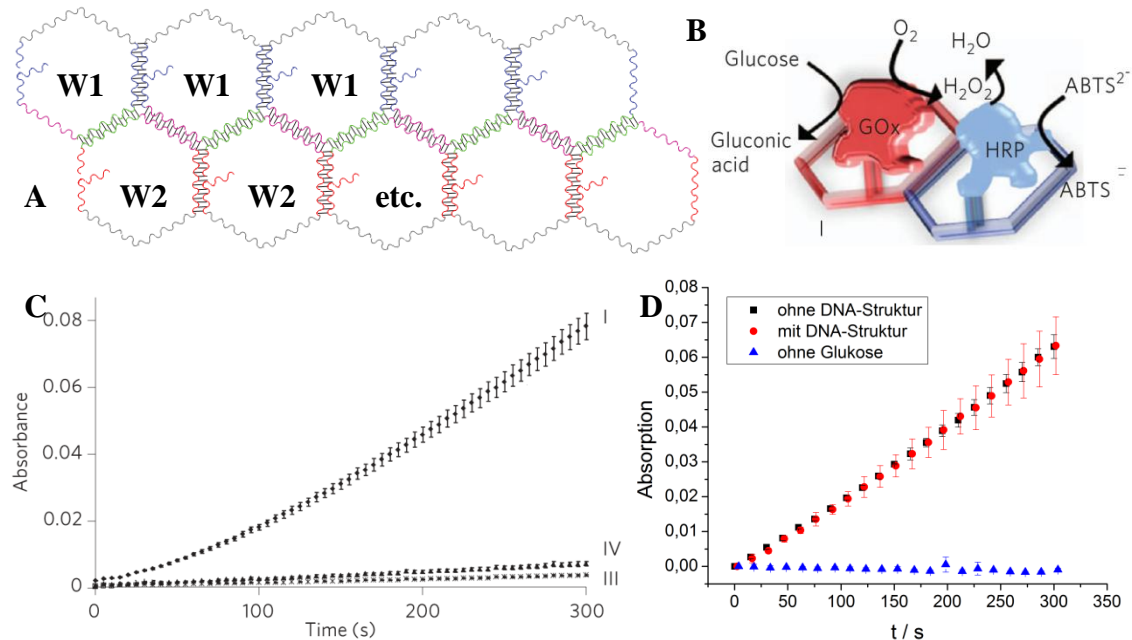


Abbildung 24: **A:** Aufbau der linearen DNA-Hexagonstruktur aus zwei 70mer Oligonucleotiden (W1 und W2). Die teilkomplementären Bereiche der Oligonucleotide hybridisieren und bilden sechseckförmige Strukturen. Überhängende Enden mit einer Länge von 10 Basenpaaren dienen zum Binden der komplementären DNA-Konjugaten GOX-W8 und HRP-W7. **B:** Durch Hybridisierung mit den freien Enden konnte die GOX/HRP-Enzymkaskade auf der Struktur angeordnet werden. Durch die räumliche Nähe wird eine Beschleunigung der Reaktion vermutet. **C:** Ergebnisse der Aktivitätsmessungen mit 0,4 mM ABTS und 100 mM Glukose bei $[E]_0 = 0,2$ nM aus der Publikation von Willner.^[35] Nur Probe I enthält die Hexagon DNA-Struktur, Probe III enthält keine DNA und in Probe IV wurde Kalbsthymus-DNA zugegeben. Nur die Probe mit der DNA-Hexagon-Struktur zeigt Aktivität. **D:** Die Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Probe mit dem DNA-Konstrukt und der Kontrolle ohne DNA. Der Effekt ließ sich somit nicht reproduzieren. Die Teilabbildungen A-C wurden der Originalpublikation entnommen.^[35]

Warum beobachtete Willner bei Anwesenheit der DNA-Struktur eine um den Faktor 20 erhöhte Aktivität? Eine Erklärung könnte sein, dass nicht die DNA-Struktur zu einer Aktivierung führt, sondern dass es ohne sie zu einer Deaktivierung der Kontrolle kommt. Die nahezu identischen Werte in Abbildung 24C und D unterstützen diese Theorie.

Studien zum Alterungsverhalten zeigten, dass verdünnte DNA-Enzymkonjugate in KP300 innerhalb von 30 min etwa 30 % ihrer Aktivität verloren. Nach 2 h betrug die Aktivität nur noch etwa 10 %. Bei Anwesenheit von freier DNA konnten die Konjugate stabilisiert werden, so dass innerhalb von 20 h keine Abnahme der Aktivität durch Alterung gemessen wurde. Dabei konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen komplementärer und nicht-komplementärer DNA beobachtet werden. Nach dieser Theorie müsste in Abbildung 24C die Probe IV (Kalbsthymus DNA) ebenfalls zu einer Stabilisierung der Konjugate führen und höhere Aktivität zeigen.

Der Grund der Abnahme wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Eine Diskussion des von Willner postulierten Channelings, auch aus theoretischer Sicht, erfolgt in Abschnitt 2.2.5.

2.2.4 Definierte Koimmobilisierung auf DNA-funktionalisierten Oberflächen

Da bei den bisher diskutierten Experimenten der Enzymkaskaden auf DNA-Gerüsten in Lösung immer eine Verteilung zwischen hybridisierten und frei in Lösung vorliegenden Konjugaten bestand, wurden mögliche Geschwindigkeitsvorteile stets von der Reaktion der freien Konjugate überlagert. Um den Effekt des Channelings zu messen, waren Messungen in Lösung also nicht geeignet. Deshalb wurden die Komplexe hier über DDI an Oberflächen gebundenen DNA-Trägersträngen assembliert, um überschüssige und ungebundene Konjugate einfach wegwaschen zu können. Der Aufbau des DDI mit zwei Enzymen ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt. Im Gegensatz zu den Messungen in Abschnitt 2.1.2.5 enthielten die Fängerstränge komplementäre Sequenzen für beide Konjugate.

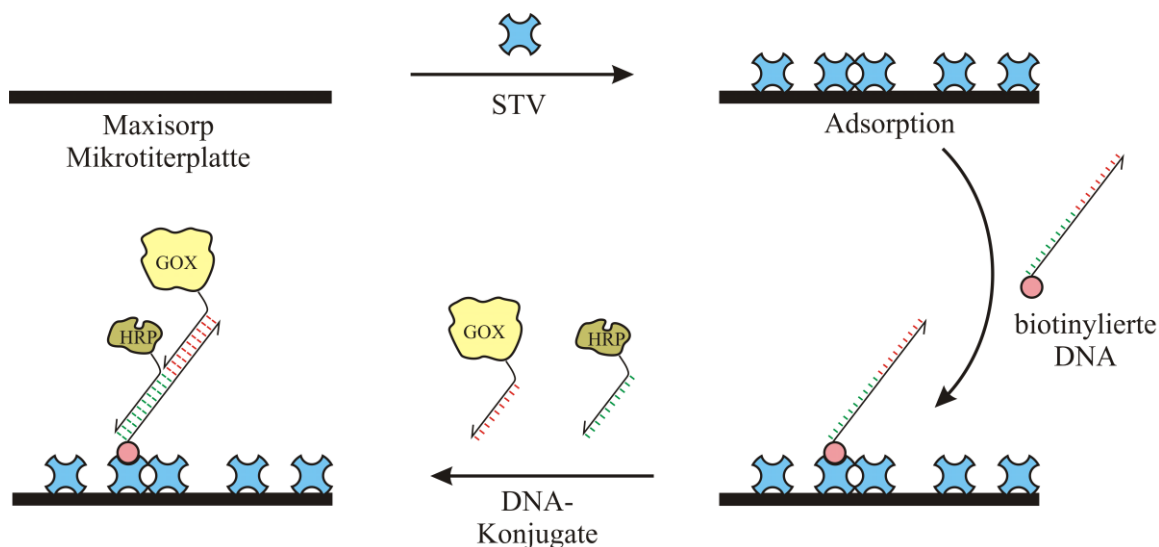


Abbildung 25: DNA-vermittelte Immobilisierung am Beispiel von GOX- und HRP-Konjugaten. Im ersten Schritt wird Streptavidin (STV) auf Maxisorp Mikrotiterplatten unspezifisch adsorbiert. Im zweiten Schritt binden biotinylierte Fängeroligonucleotide, deren Sequenzen zu denen der DNA-Enzymkonjugate komplementär sind. Auf der DNA-funktionalisierten Oberfläche können anschließend die DNA-Enzymkonjugate durch Hybridisierung immobilisiert werden.

In vorherigen Arbeiten wurde über Bindungsstudien die maximale Bindungskapazität der STV-Platte für Oligonucleotide zu 1 pmol/Vertiefung bestimmt.^[96] Bei den

Kinetikmessungen auf STV-Platten in Abschnitt 2.1.2.5 wurde ein Überschuss der Fängeroligonucleotide immobilisiert (Ansatz 12 pmol, davon finden etwa 1 pmol auf der Oberfläche Platz), um damit die niedrigere Konzentration der Enzymkonjugate (100 fmol) komplett zu immobilisieren. So konnte davon ausgegangen werden, dass annähernd 100 % der eingesetzten Konjugate immobilisiert wurden und die Enzymmenge darüber abgeschätzt werden. Bei den hier benötigten Fängersträngen mit zwei Bindungsstellen würden die Konjugate aber statistisch verteilt binden, so dass die meisten Fängerstränge frei oder mit nur einem Konjugat besetzt vorlägen. Aus diesem Grund wurden hier die Fängerstränge von 30 – 500 fmol limitiert, so dass die zugegebenen Konjugate (150 fmol) teilweise im Überschuss vorlagen. Bezogen auf die Fängerstränge sollten so bei 30 – 150 fmol annähernd 100 % der Bindungsstellen besetzt sein, das heißt, dass alle Fängerstränge doppelt mit Konjugaten hybridisiert vorliegen. Die übrigen, nicht-gebundenen Konjugate konnten dann einfach durch Waschen entfernt werden, und die STV-Platte sollte ausschließlich vollständige Komplexe enthalten. Die Messungen mit 300 und 500 fmol Fängeroligonucleotiden dienten als interne Kontrolle.

In Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob sich nach den Waschschritten innerhalb der Zeitspanne der Kinetikexperimente wieder ein Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Enzymkonjugaten einstellt. Dazu wurden mittels DDI immobilisierte HRP-F5-Konjugate in KPi300 inkubiert und nach 10, 20 und 30 min Aliquots des Überstandes entnommen. Aktivitätsmessungen zeigten, dass die Konzentration der HRP-Konjugate im Überstand mit der Zeit leicht zunahm, der Anteil nach 30 min aber immer noch unter 3 % der immobilisierten Konjugate lag (Daten nicht gezeigt). Die schlechten Ausbeuten bei der Assemblierung der Komplexe in homogener Lösung (Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2) lagen vermutlich in unterschiedlichen Subpopulationen der Enzymkonjugate begründet. So unterschieden sich beispielsweise die zur Kopplung verwendeten Aminogruppen (mehrere möglich Lysinreste oder N-Terminus) und damit die benachbarten funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Enzyms, mit denen der DNA-Strang wechselwirkten und Tertiärstrukturen aufbauen konnten. Durch die Waschschriffe wurden diese weniger effizient bindenden Konjugate aus dem Gleichgewicht entfernt, und es sollten höhere Ausbeuten intakter Komplexe erhalten werden.

Bei ersten Experimenten mit der immobilisierten Enzymkaskade stellte sich jedoch die Wahl der Kontrollen als Problem heraus. Bei der Anordnung, die in Abbildung 26A skizziert ist, bestanden die Kontrollen aus einer Mischung von Oligonucleotiden (bcF9 und bcF5), die jeweils nur eine Bindungsstelle für die GOX-F9- und HRP-F5-Konjugate enthielten. Die Aktivität dieser Kontrollen war in allen Experimenten immer 10-20 % höher, als bei den vollständig assemblierten Komplexen auf bcF5cF9 und bcF9cF5 (Daten nicht gezeigt). Daraus konnte auf eine schlechtere Hybridisierungseffizienz der doppelt besetzten Stränge aus sterischen Gründen geschlossen werden.

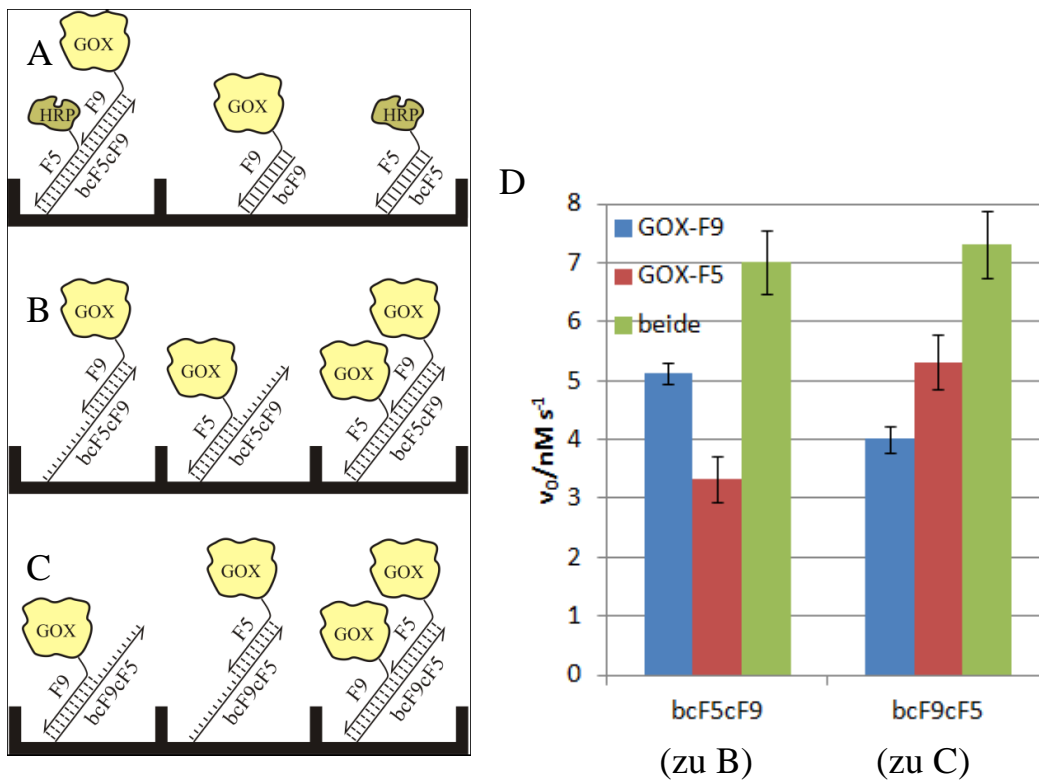


Abbildung 26: Positionsabhängige Hybridisierungseffizienz der GOX-Konjugate. **A:** Ursprünglich geplanter Aufbau der immobilisierten Enzymkaskade mit einem doppelt besetzten Fängerstrang und zwei jeweils einfach besetzten Strängen als Kontrolle. Die Kontrollen zeigten aufgrund der besseren Hybridisierungseffizienz höhere Aktivität (Daten nicht gezeigt). **B und C:** Untersuchungen zu sterischen Effekten bei der Hybridisierung von GOX-Konjugaten. 30 fmol der immobilisierten Fängeroligonucleotide **B:** bcF5cF9 und **C:** bcF9cF5 wurden mit 150 fmol GOX-F5, GOX-F9 oder einer Mischung der beiden Konjugate hybridisiert. **D:** Die Aktivität wurde durch Zugabe von 20 μM Amplex Red, 10 mM Glukose und 1 nM nHRP im Mikrotiterplattenleser gemessen und die Anfangsgeschwindigkeiten als Säulendiagramm aufgetragen. Die Hybridisierung an der Bindungsstelle, die näher an der Oberfläche liegt, ist in beiden Fällen niedriger, als die Hybridisierung an der äußeren Bindungsstelle. Außerdem führt die gemeinsame Hybridisierung beider Konjugate auf einem Strang nur zu etwa 80 % der Aktivität, die durch Addition der beiden Signale der jeweils einzeln hybridisierten Konjugate zu erwarten wäre.

Um diesem Effekt zu quantifizieren, wurde die Hybridisierungseffizienz des sterisch anspruchsvolleren GOX an den zwei möglichen Positionen und für den doppelt beladenen Fängerstrang systematisch untersucht. Der Aufbau und die Konfiguration der Komplexe sind in Abbildung 26B und C dargestellt, die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in Teilabbildung D.

Die Ergebnisse in Abbildung 26D zeigen eine eindeutige Abhängigkeit vom Abstand zur Oberfläche. So wiesen die einzeln hybridisierten Konjugaten (blaue und rote Säulen) jeweils an der Position, die näher an der Oberfläche lag, eine etwa 30 % niedrigere Aktivität auf, als die Konjugate am Ende des Fängerstranges. Vermutlich kam es hier zu sterischer Hinderung durch die Oberfläche, was zu einer schlechteren Hybridisierungseffizienz führte. Die gemessene Aktivität könnte zusätzlich durch eine schlechtere Zugänglichkeit der Substrate beeinflusst worden sein. Die Position am Ende des Fängerstranges war sterisch günstiger, was zu einer höheren Immobilisierungseffizienz führt. Der Kontakt der Enzyme mit der Substratlösung war dort ebenfalls besser. Interessant ist auch, dass die doppelt besetzten Stränge (grüne Säulen) nur etwa 80 % der aufsummierten Aktivitäten der einzeln hybridisierten Konjugate entsprachen. Auch hier war vermutlich sterische Hinderung der voluminösen GOX-Einheiten die Ursache für die geringere Hybridisierungseffizienz.

Als weitere Fehlerquelle könnte vermutet werden, dass die beiden Konjugate (GOX-F5 und GOX-F9) synthesebedingt unterschiedlich aktiv waren. Die Effekte waren aber bei beiden Konjugaten in der gleichen Größenordnung (die blaue Säule bei bcF5cF9 entspricht der roten Säule bei bcF9cF5 und umgekehrt). Auch die DNA-Fängerstränge schieden als Fehlerquelle aus, da bei falschen Konzentrationen oder einem unterschiedlichen Biotinylierungsgrad die grünen Säulen nicht bei beiden Sequenzen gleich hoch wären.

Die in Abbildung 26A vorgeschlagenen Kontrollen führten also aus sterischen Gründen zu ungleichen Hybridisierungen. Um diesen Effekt zu kompensieren, wurden die in Abbildung 27B dargestellten homodimeren Komplexen aufgebaut und als Kontrollen verwendet. Dazu wurden statt der benötigten Sequenzen bcF5 und bcF9 einfach die Sequenzen bcF5-2 und bcF9-2 eingesetzt, die die Fängersequenz jeweils zweifach enthielten. Um die gleiche Anzahl Bindungsstellen zu erhalten, wurde von beiden Sequenzen nur 0,5 eq eingesetzt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Abbildung 27A als normierte

Anfangsgeschwindigkeit gegen die Stoffmenge der immobilisierten Fängeroligonucleotide aufgetragen.

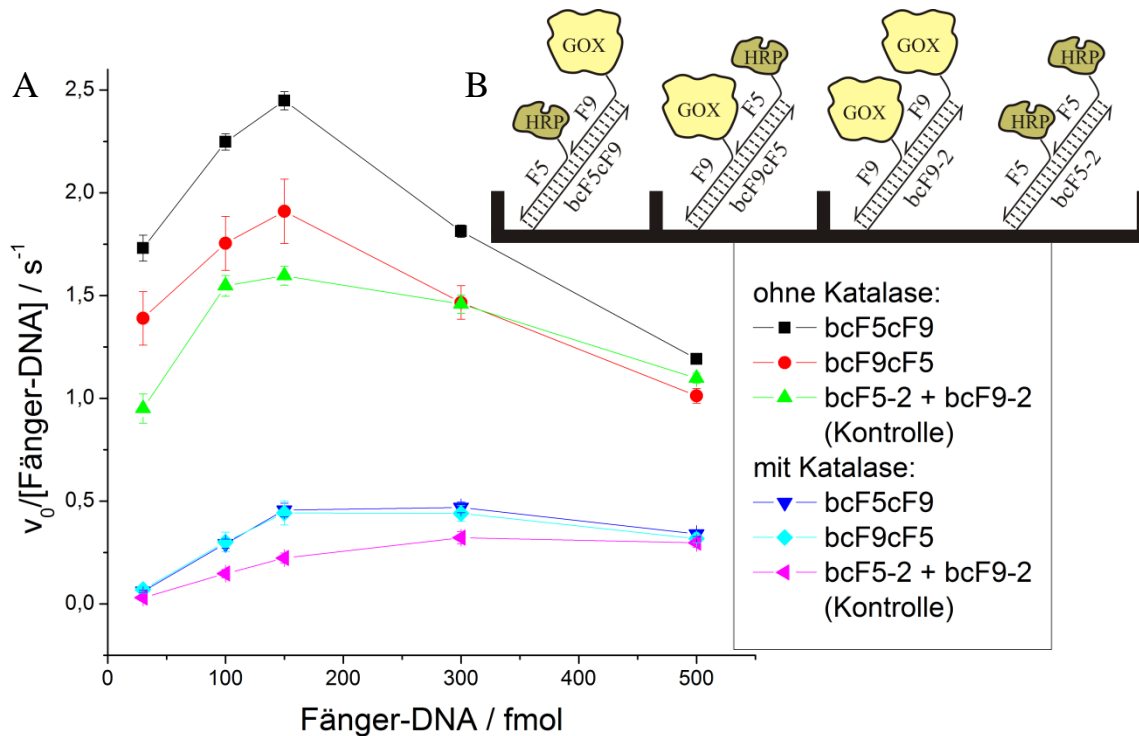


Abbildung 27: **A:** Kinetikmessungen der mittels DDI immobilisierten bienzymatischen Komplexe (BK). 150 fmol der Konjugate (GOX-F9 und HRP-F5) wurden mit variablen Mengen (30-500 fmol) immobilisierter Fänger-DNA inkubiert. Die Kontrollen enthielten komplementäre Fängeroligonucleotide mit je zwei identischen Bindungsstellen für die Konjugate, um die schlechtere Hybridisierungseffizienz doppelt besetzter Stränge nachzuahmen. Nach Zugabe von 1 mM Glukose und 20 μ M Amplex wurden die Anfangsgeschwindigkeiten im Mikrotiterplattenleser bestimmt. Bei Anwesenheit von 1 μ M Katalase wurde das gebildete H_2O_2 in der Bulklösung abgebaut. **B:** Schematische Darstellung des Aufbaus der beiden Proben und der Kontrollen.

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt zum besseren Verständnis von rechts nach links. Bei den drei Proben mit 500 fmol Fänger-DNA waren die Signale nahezu identisch, da nur 150 fmol Konjugate eingesetzt wurden, die keine BK ausbildeten, sondern statistisch verteilt jeweils einzeln auf den im Überschuss vorliegenden Strängen hybridisiert waren. Die Signale stiegen, wegen der Normierung auf die Fänger-DNA, bis 150 fmol Fänger-DNA an, da nun die Fängerstränge zunehmend doppelt besetzt wurden. Erst bei DNA-Mengen unter 150 fmol lagen die Konjugate im Überschuss vor, die Fängerstränge sollten statistisch alle doppelt besetzt vorliegen, und überschüssige Enzymkonjugate wurden gewaschen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die BK, vor allem bei niedrigen Fängeroligonucleotidmengen, eine höhere Aktivität aufwiesen als die Kontrollen. Je weniger Fänger-DNA vorlag,

desto größer war der mittlere Abstand zwischen den immobilisierten Enzymen. Damit musste das H_2O_2 bei den Kontrollproben eine weitere Strecke durch Diffusion zurücklegen, als bei der auf demselben Strang immobilisierten Enzymkaskade. Insgesamt war die Aktivität des auf bcF5cF9 immobilisierten Komplexes höher, da bei dieser Anordnung das GOX am Ende des Trägerstranges immobilisiert war, was sterisch günstiger ist.

Da die Unterschiede relativ gering waren und vermutlich auch durch sterische Hinderung bzw. verschiedene Hybridisierungseffizienzen beeinflusst wurden, wurden im gleichen Experiment Proben mit $1 \mu\text{M}$ Katalase untersucht, die das frei in der Lösung diffundierende H_2O_2 abfängt und damit besonders die Kontrollproben unterdrücken sollte. Die drei unteren Kurven in Abbildung 27A zeigen jedoch, dass alle Proben von Katalase beeinflusst wurden. Damit diffundierte auch bei den auf einem Strang gemeinsam immobilisierten Enzymkaskaden ein Großteil des H_2O_2 aus der lokalen Umgebung des Enzymkomplexes in die Bulklösung und wurde dort von Katalase abgebaut.

Um die Nachbarschaftseffekte zu quantifizieren, wurden die Daten in Abbildung 27A auf die Kontrollen normiert und in Abbildung 28A als Säulendiagramm aufgetragen. Der Einfluss der Katalase wird in Abbildung 28B als relative Restaktivität der Proben dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 28A zeigen, dass die Aktivität des immobilisierten BK bezogen auf die Kontrolle bis auf 180 % anstieg. Bei höheren Mengen der Fänger-DNA nahmen die Werte ab, da, wie oben diskutiert, nur 150 fmol Konjugate immobilisiert wurden, so dass statistisch betrachtet nur bei Fängermengen unter 150 fmol ein Großteil der Stränge doppelt besetzt war. Die normierte Darstellung verdeutlicht außerdem den Einfluss des mittleren Abstandes der Fängerstränge. Bei 30 fmol Fänger bestand die größte mittlere Distanz zwischen den Strängen, so dass das H_2O_2 bei den getrennt immobilisierten Kontrollen den weitesten Weg zurücklegen musste. Bei den gemeinsam immobilisierten Proben diffundierte ein Teil des H_2O_2 direkt von GOX zum HRP am gleichen Strang, was sich durch eine um 80 % erhöhte Aktivität auswirkte.

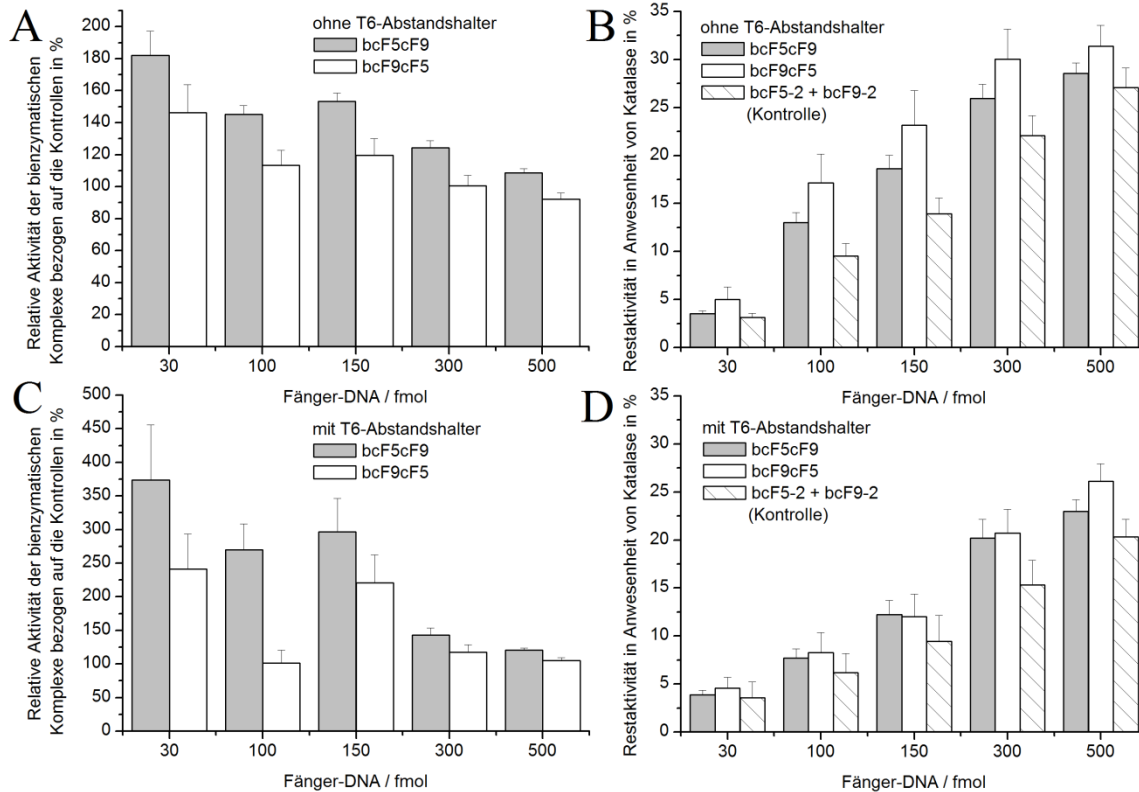


Abbildung 28: Quantitative Auswertung der Kurven aus Abbildung 27. **A:** Relative Aktivitäten der Enzymkomplexe aus GOX-F9 und HRP-F5 immobilisiert auf bcF5cF9 (grau), bcF9cF5 (weiß) bezogen auf die auf bcF5-2 und bcF9-2 einzeln immobilisierten Kontrollen (100 %). **B:** Die Aktivität der Proben mit Katalase wurde auf die Aktivität der Proben ohne Katalase normalisiert. Die y-Achse entspricht also der Restaktivität in Anwesenheit von 1 μM Katalase. Die gestreiften Säulen entsprechen der Restaktivität der Kontrollen, die am stärksten unterdrückt werden sollten. **C und D:** Ergebnisse der gleichen Experimente unter Verwendung von Konjugaten mit T6-Abstandshalter (GOX-T6F9 und HRP-T6F5).

Die Zugabe von Katalase sollte besonders die Kontrollen beeinflussen, bei denen das H_2O_2 über längere Distanzen zum HRP diffundieren musste und damit leichter von Katalase abgefangen werden konnte. In der Tat zeigten alle Kontrollen in Abbildung 28B die geringsten Aktivitäten, was ein Hinweis auf Channeling ist. Allerdings wurden auch sämtliche Bienzymproben beeinflusst, was bestätigt, dass immer ein Teil des gebildeten H_2O_2 in die Bulklösung entwich.

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 2.2.1.2 diskutierten Experimenten mit 100 nM Katalase wurde hier 1 μM Katalase eingesetzt, was einem molaren Überschuss von 660 bis 3300 entsprach. Trotzdem nahm die Aktivität hier nur maximal um den Faktor 20 – 25 ab. Der Einfluss der Katalase war damit weniger ausgeprägt, als beim gelösten BK. Bei Hess

wurde die Reaktion bei 400fachem Überschuss sogar komplett unterbunden, so dass hier ein weiterer Hinweis auf Channeling vorliegt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass bei Anwesenheit von Katalase die bcF9cF5 Anordnung, bei der GOX näher an der Oberfläche immobilisiert war, die höchsten Aktivitäten zeigte. Dem von GOX gebildete H_2O_2 wurde durch das am Ende des Stranges lokalisierte HRP quasi der Weg in die Bulklösung versperrt, so dass weniger H_2O_2 entweichen konnte. Umgekehrt wurde die gelöste Katalase durch HRP abgeschirmt und kam nicht so nah zur Quelle des gebildeten H_2O_2 , wo die lokale Konzentration am höchsten war.

Abbildung 28C zeigt die Ergebnisse von analogen Experimenten, bei denen Konjugate mit einem T6-Abstandshalter eingesetzt wurden. Die bereits in Abschnitt 2.2.1 eingesetzten Konjugate sollten durch den Abstandshalter eine verbesserte Hybridisierungseffizienz aufweisen. In der Tat erhöhte sich die relative Aktivität auf über 300 % bezogen auf die Kontrollen. Die in Abbildung 28D gezeigte Restaktivität bei Anwesenheit von Katalase ist aber in der gleichen Größenordnung, wie bei den Konjugaten ohne Abstandshalter (Abbildung 28B). Auch Experimente mit anderen Katalasekonzentrationen führten nicht zu eindeutigeren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die BK durch Immobilisierung in höheren Ausbeuten erhalten wurden, als bei den in Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2 diskutierten Assemblierungsmethoden in Lösung. Die Komplexe zeigten im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Aktivitäten, die auf den Effekt des Channeling hinweisen. Die Experimente mit Katalase verdeutlichten jedoch, dass immer ein Großteil des H_2O_2 in die Bulklösung entwich. Somit konnte in diesem System ein „leaky channeling“ nachgewiesen werden.

2.2.5 Diskussion der Ergebnisse aus theoretischer Sicht

Die bisher diskutierten in Lösung vorliegenden Multienzymkomplexe konnten zwar erfolgreich assembliert werden, ließen aber keine eindeutigen Rückschlüsse auf ein Channeling zu. Einzig die immobilisierte Enzymkaskade zeigte eine Erhöhung der Aktivität bei großen Abständen der Komplexe, was als „leaky channeling“ identifiziert wurde. Für die weitere Forschung in diesem Bereich wäre eine Abschätzung des theoretisch zu erwartenden Effekts vorteilhaft, insbesondere die Zusammenhänge zwischen den Diffusionszeiten, Konzentrationen, Geschwindigkeitskonstanten und Abständen der an der Kaskade beteiligten

Enzyme. Teile dieser Diskussion wurden bereits im kürzlich akzeptierten Übersichtsartikel veröffentlicht.^[26]

Mit Hilfe einfacher Gleichungen^[122] kann aus der Konzentration eines Multienzymkomplexes $[E]$ über Gleichung (10) auf das zur Verfügung stehende Volumen V , über Gleichung (11) die mittleren Abstände $\langle x \rangle$ sowie über Gleichung (12) die Zeit t_{diff} , die ein Intermediat zur Diffusion der Strecke benötigt, berechnet werden. Die Daten wurden mit $D = 1500 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$,^[123] dem Diffusionskoeffizienten von H_2O_2 , für typische Enzymkonzentrationen berechnet und sind in Tabelle 4 angegeben.

$$V = \frac{1}{[E] \cdot N_A} \quad (10)$$

$$\langle x \rangle = \sqrt[3]{V} \quad (11)$$

$$t_{diff} = \frac{\langle x^2 \rangle}{6D} \quad (12)$$

Tabelle 4: Für typische Enzymkonzentrationen $[E]$ wurden das in Lösung zur Verfügung stehende Volumen V und der mittlere Abstand $\langle x \rangle$ berechnet. Aus den Abständen und $D = 1500 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurden die Diffusionszeiten t_{diff} für das Intermediat H_2O_2 berechnet.

Größe	$[E] / \text{nM}$				
	0,001	0,01	0,1	1	10
$V / \mu\text{m}^3$	1661	166	16,6	1,66	0,166
$\langle x \rangle / \mu\text{m}$	11,8	5,50	2,55	1,18	0,550
t_{diff} / ms	15,6	3,36	0,723	0,156	0,0336

Die Zusammenstellung zeigt, dass bei einer Verdünnung um den Faktor 1000 der mittlere Abstand der Enzymkomplexe um den Faktor 10 zunimmt und die Diffusionszeit um den Faktor 100 steigt. Allerdings benötigt ein Intermediat selbst bei der niedrigsten hier angenommenen Konzentration von 1 pM nur 16 ms, um einen nächsten Enzymkomplex zu erreichen. Damit ist die Diffusion schneller, als die Dauer der Reaktionszyklen typischer Enzyme wie GOX oder HRP, die je nach Wechselzahl und Substratkonzentration etwa in der Größenordnung von 50 ms liegen.^[23]

In der Endphase dieser Dissertation wurde von Idan und Hess ein komplexeres Modell zur Quantifizierung des Channelings entwickelt, das auch die diffusiven Transportprozesse bei solchen Reaktions-Diffusions-Systemen berücksichtigt.^[16]

Das Modell geht von einem räumlich definiert angeordneten Enzympaar in einem geschlossenen Container aus, der entweder ein Mikrokompartiment darstellt, oder als mittlerer freier Raum des homogen in Lösung vorliegendem Enzympaars interpretiert werden kann, und damit dem Volumen V in Tabelle 4 entspricht. Wie in Abbildung 29A skizziert, wird das vom ersten Enzym (GOX) gebildete Intermediat (H_2O_2) in zwei Diffusionsströme aufgeteilt, die entweder direkt zum zweiten Enzym (HRP) oder in die Bulklösung fließen. Über Random-Walk-Algorithmen wurde das Verhältnis der Ströme simuliert, das vom Abstand der beiden Enzyme und der Größe des zweiten Enzyms abhängt. Der direkte Diffusionsstrom führt zur Produktbildung (Resorufin) mit einer konstanten Geschwindigkeit k_{direkt} . Der zweite Diffusionsstrom entweicht in die Bulklösung und führt dort zu einem linearen Anstieg der Intermediatkonzentration. Aus der Bulklösung kann das Intermediat schließlich mit der Geschwindigkeit k_{bulk} mit dem zweiten Enzym reagieren.

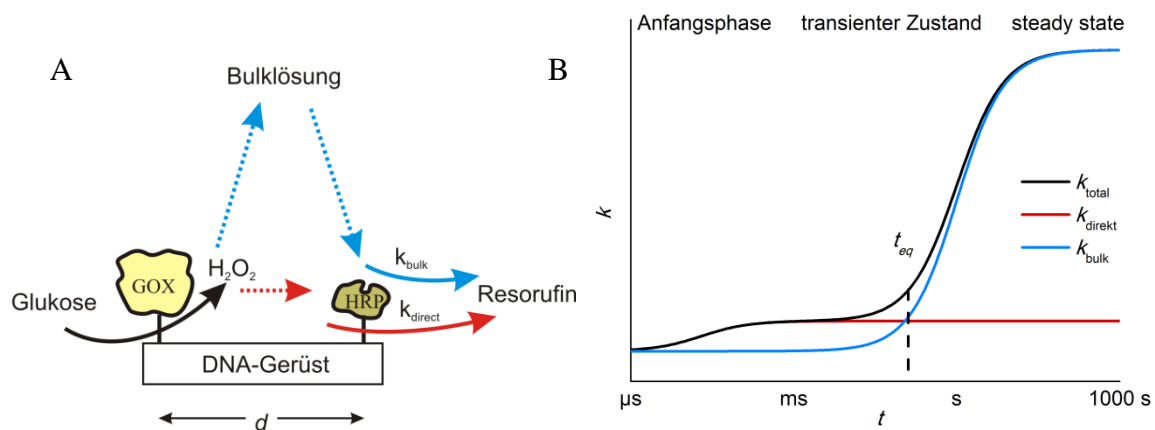


Abbildung 29: Diffusionsmodell nach Idan und Hess.^[16] **A:** Skizze des Diffusionsmodells einer definiert angeordneten Enzymkaskade am Beispiel von GOX und HRP. Das von GOX gebildete H_2O_2 diffundiert (gestichelte Pfeile) entweder in die Bulklösung und zurück (blau), oder es gelangt direkt zum zweiten Enzym (rot). Mit HRP findet die Umsetzung (durchgezogene Pfeile) zum Produkt (hier Resorufin) mit der zugehörigen Geschwindigkeitskonstante k_{bulk} (blau) oder k_{direkt} (rot) statt. **B:** Darstellung der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Zeitskala. Aus k_{direkt} und k_{bulk} resultiert k_{total} , die makroskopische messbare Reaktionsgeschwindigkeit, die nach kurzer Zeit von k_{bulk} dominiert wird. Beide Abbildungen modifiziert aus der Originalpublikation.^[16]

Wie in Abbildung 29B skizziert, durchläuft die makroskopisch messbare Geschwindigkeit k_{total} , die sich aus k_{direkt} und k_{bulk} zusammensetzt, insgesamt drei Phasen. In der ersten Phase erreicht der direkte Diffusionsstrom in weniger als 1 ms das zweite Enzym, und es kommt zu einem sprunghaften Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit k_{direkt} . In der zweiten Phase, dem transienten Zustand, wird der Bulkcontainer langsam mit Intermediat gefüllt, was die Geschwindigkeit k_{bulk} linear ansteigen lässt, da der Umsatz des zweiten

Enzyms linear von der Intermediatkonzentration abhängt. Am Zeitpunkt t_{eq} sind beide Ströme zu gleichen Teilen an der Produktbildung des zweiten Enzyms beteiligt. Die Geschwindigkeit nimmt auf einer Zeitskala von Sekunden bis Minuten weiter zu, bis der steady state erreicht ist.

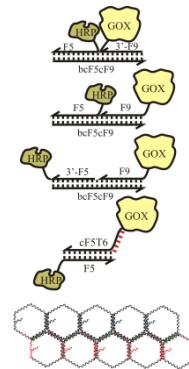
Der Geschwindigkeitsvorteil durch räumliche Nähe tritt also, wenn die Diffusion nicht räumlich begrenzt ist, nur während der Anfangsphase der Reaktion auf, und wird verdeckt, sobald die Bulklösung ausreichend Intermediat enthält, um in ausreichender Geschwindigkeit mit dem zweiten Enzym zu reagieren. Als Maß für die Dauer der Anfangsphase kann der Zeitpunkt t_{eq} dienen, für den Idan und Hess eine Näherungsformel (13) hergeleitet haben. Danach ist t_{eq} interessanterweise nicht von den kinetischen Eigenschaften der Enzyme, sondern nur vom Containervolumen V , dem Abstand der beiden Enzyme d und dem Diffusionskoeffizienten des Intermediats D abhängig.

$$t_{eq} \approx \frac{V}{4\pi D \cdot d} \quad (13)$$

Mit Hilfe von Gleichung (13) wurde t_{eq} für die in dieser Arbeit untersuchten Anordnungen der GOX/HRP-Kaskade berechnet. Das Containervolumen V konnte aus Tabelle 4 übernommen werden, bzw. nach Gleichung (10) für verschiedene Konzentrationen berechnet werden, da es dem zur Verfügung stehendem Volumen pro Enzympaar entspricht. Die Abstände d zwischen den beiden Enzymen wurden geometrisch abgeschätzt. Für die Kopf-Kopf-Anordnung wurden, unter Annahme direkten Kontakts der beiden Enzyme, die beiden Enzymradien aus der PDB-Datenbank abgeschätzt und addiert. Für die Kopf-Schwanz- und Schwanz-Schwanz-Anordnung sowie beim direkt hybridisierten Komplex wurden die Abstände aus der Länge der DNA-Stränge (22, 44 und 28 bp) abgeschätzt. Bei der Hexagonstruktur nach Willner wurde der Abstand ebenfalls geometrisch abgeschätzt. Die resultierenden Ergebnisse für t_{eq} sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Berechnung von t_{eq} für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme bei verschiedenen Konzentrationen nach Gleichung (10). Die Abstände der Enzyme d wurden geometrisch aus den Stranglängen und den Enzymdurchmessern abgeschätzt. Rechts sind die fünf verschiedenen DNA-Enzym-Konstrukte skizziert.

DNA-Gerüst	d / nm	$[E] / \text{nM}$			
		0,001	0,01	0,1	1
44mer Trägerstang...		t_{eq} / s			
-Kopf-Kopf	≈ 5	17,6	1,76	0,176	0,0176
-Kopf-Schwanz	7,5	11,8	1,18	0,118	0,0118
-Schwanz-Schwanz	15,0	5,89	0,59	0,059	0,0059
direkt hybridisiert	9,5	9,25	0,93	0,093	0,0093
Hexagone nach Willner	≈ 6	14,9	1,49	0,149	0,0149



Die Daten zeigen, dass in der Größenordnung der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (0,1 und 1 nM) bereits nach 0,2 s der Beitrag der beiden Diffusionsströme an der Gesamtreaktion gleich ist. Die Anfangsphase verlängert sich, wenn die Enzymkomplexe noch weiter verdünnt würden, allerdings nahm die Signalqualität bei Konzentrationen unter 0,1 nM stark ab. Bei der parallelen Messung von 16-32 Proben in der Mikrotiterplatte betrug die Zeitauflösung mit dem Mikrotiterplattenleser 20-30 s, so dass die Anfangsphase der Reaktion nicht aufgelöst werden konnte.

Theoretisch wäre die Kopf-Kopf-Anordnung am besten geeignet, ein Channeling nachzuweisen, da die Enzyme den geringsten Abstand aufweisen. Diese Konfiguration war aber aus sterischen Gründen unvorteilhaft. Bei der Hexagonstruktur fällt auf, dass der Abstand d nur etwas größer als die Enzymdurchmesser sind. Die Enzyme liegen also extrem dicht gepackt vor, so dass aus sterischen Gründen vermutlich nicht alle Bindungsstellen besetzt sind. Da die Struktur aber repetitiv ist, und nahezu beliebig lang werden kann, dürften Fehlstellen keine Rolle spielen.

Die Daten in Tabelle 5 sind in Übereinstimmung mit aktuellen Ergebnissen aus Berechnungen auf der Basis von Brown'scher Molekularbewegung für steady state Bedingungen.^[19] Die Autoren berechneten, dass selbst bei hohen Bildungsgeschwindigkeiten und kleinem Diffusionskoeffizienten keine signifikante Akkumulation des Intermediates innerhalb eines Kugelradius von 1 μm um das erste Enzym entstehen sollte. Wenn der steady state erreicht ist, werden alle neu gebildeten Intermediatmoleküle zu Produktmolekülen umgesetzt, so dass die Intermediatkonzentration in der Summe konstant bleibt. Im steady state und ohne Nebenreaktionen, sollte die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion dann

unabhängig von der Anordnung und dem Abstand der beteiligten Enzyme sein, und eine Beschleunigung ist nicht zu erwarten.^[19] Im steady state kann das Intermediat deshalb als homogen in der Lösung verteilt betrachtet werden. Auch jüngst publizierte stochastische Simulationen bestätigen, dass eine Reaktion mit anfänglichem Channeling im steady state keinen Geschwindigkeitsvorteil mehr aufweist.^[124]

Ein Channelingeffekt kann dauerhaft nur auftreten, wenn die Intermediatkonzentration in der Bulklösung niedrig bleibt, was bei labilen Intermediaten oder bei konkurrierenden Enzymreaktionen (z.B. Katalase) der Fall ist. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt Channeling in der Natur vor allem in Systemen vor, in denen die Diffusion des Intermediats eingeschränkt ist oder in Enzymclustern. Idan und Hess untersuchten Willners Hexagonstruktur genauer und berechneten, dass der Vorteil der Gerüststruktur, der für ein individuelles Enzympaar zu vernachlässigen ist, bei einer großen Zahl von Enzym bis zu mehreren Minuten bestehen kann. Die Ursache ist aber nicht die präzise, möglichst dichte Anordnung der Enzympaare, sondern die große Anzahl der zweiten Enzyme in der Nähe des ersten Enzyms, welches das Intermediat bildet.^[16] In einem weiteren Modell schätzten die Autoren den Einfluss einer diffusionslimitierenden Grenzschicht, z. B. einer Proteinoberfläche oder eines ausgedehnten DNA-Gerüsts ab. Abhängig von der Stärke der attraktiven Wechselwirkungen ergaben die Berechnungen eine lokale Akkumulation des Intermediats, die bis zu mehreren Stunden erhalten blieb und den Durchsatz der Enzymkaskade signifikant erhöhte.^[16]

Dagegen sprechen Simulationen von Roberts und Chang, die isolierte Enzympaare auf DNA-Origami mithilfe dynamischer coarse grained Brownian Modelle simulierten.^[125] Sie fanden heraus, dass der Abstand und die relative Orientierung der Enzyme die Hauptfaktoren für die Wirksamkeit des Systems waren, während die diffusive Barriere nur eine untergeordnete Rolle spielt und sich erst bei größeren Abständen auswirkte.

Eine andere Erklärung für die Vielzahl positiver Berichte über Channeling der GOX/HRP-Kaskade (vgl. Abschnitt 1.2.2), insbesondere mit den Hexagonstrukturen von Willner als Gerüst^[35] und als Enzympaar auf DNA-Origami,^[34] wurde von Zhang et al. veröffentlicht.^[23] In ihren Experimenten zeigten sie, dass ein Fusionsprotein der beiden Enzyme nicht zu einer Beschleunigung der Gesamtreaktion führte, und dass die Zugabe von Katalase in 400fachem Überschuss die Reaktion vollständig unterband. Da das H₂O₂ zu

schnell in die Lösung diffundierte und damit die Bulkkonzentration zu schnell anstieg, waren keine Channelingeffekte möglich. Sie untersuchten jedoch die pH-Abhängigkeit der beiden Enzymreaktionen und stellten diese in Zusammenhang zu dem lokalen pH-Wert in der Nähe von negativ-geladenen DNA-Strukturen. Sie stellten die These auf, dass die publizierten Beschleunigungen nicht auf Channeling beruhen, sondern dass der lokale pH-Wert der DNA-Strukturen eine günstigere pH-Umgebung für die verankerten Enzyme bietet und damit das Channeling nur vortäuscht.^[23]

Die Ergebnisse der Modellrechnungen und der Simulationen zeigen, dass bei den auf einem Trägerstrang assemblierten Enzymkaskaden (Abschnitt 2.2.1) und den direkt hybridisierten Enzymkaskaden (Abschnitt 2.2.12.2.2) kein Channeling auftreten konnte. Bei Willners Hexagonstrukturen (Abschnitt 2.2.3) könnte es zu einer Beschleunigung der Anfangsphase der Reaktion kommen, was aber ein Effekt der Enzymagglomeration ist und durch den lokalen pH-Wert der DNA-Strukturen verstärkt wird. Die Ergebnisse von Willner konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, da die Kontrollen dieselbe Aktivität wie die assemblierten Enzyme zeigten. Die Ergebnisse der immobilisierten Enzymkaskade (Abschnitt 2.2.4) zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied zu den getrennt immobilisierten Kontrollen. Da hier auch die Kontrollproben auf der DNA-beschichteten Oberfläche immobilisiert waren, sollten alle Proben gleichermaßen durch den lokalen pH-Wert der negativ geladenen DNA-Stränge beschleunigt werden. Die Aktivitätsunterschiede konnten also nur durch die verschiedenen Abstände der Enzyme verursacht werden. Dies und besonders die nicht vollständige Unterdrückung der Reaktion durch Katalase deuten auf ein leaky channeling hin, was nach dem Modell von Idan und Hess durch dimensional begrenzte Diffusion in der Hydrathülle der Grenzfläche zwischen Lösung und der auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisierten DNA-Stränge möglich ist.

2.3 Immobilisierung von Enzymen auf Mikropartikeln

Die Enzyme GOX und HRP sollten in einem mehrstufigen mikrofluidischen Festbettreaktor eingesetzt werden, um darin die Kinetik der einzelnen Enzyme und der Reaktionskaskade zu untersuchen. Der hier verwendete Mikroreaktor wird in Abschnitt 2.4 ausführlich beschrieben. Zur Herstellung des Systems wurden die Enzyme biotinyliert und auf Oberflächen von kommerziell erhältlichen 10 µm STV-funktionalisierten Polystyrolmikropartikeln immobilisiert. Der Syntheserfolg wurde anhand der Bindungsfähigkeit untersucht (Abschnitt 2.3.1), das optimale Bindungsverhältnis von Enzym zu Partikel wurde bestimmt (Abschnitt 2.3.2) und schließlich wurde die Kinetik nach Michaelis Menten für die partikelgebundenen Enzyme in der Mikrotiterplatte untersucht (Abschnitt 2.3.4).

2.3.1 Biotinylierung der Enzyme

Die Biotinylierung von GOX und HRP erfolgte nach dem in Abbildung 30A gezeigten Reaktionsschema durch Kupplung mit NHS-PEG4-Biotin. Die Enzyme wurden durch Gelfiltration mit NAP-Säulen aufgereinigt und anschließend spektroskopisch quantifiziert. Der Erfolg der Reaktion wurde in STV-beschichteten Mikrotiterplatten (vgl. Abschnitt 2.1.2.5) nachgewiesen. Das Säulendiagramm in Abbildung 30B und C zeigt die Aktivität der immobilisierten Enzyme. Eine ausführlichere Bestimmung der Kinetik nach Michaelis Menten erfolgt in Abschnitt 2.3.4.

Die in Abbildung 30B aufgetragene Aktivität von nHRP und bHRP in Lösung (rote Säulen, aq) ist annähernd gleich. Also kam es durch die Biotinylierung nicht zu einer Veränderung der Enzymaktivität. Die anschließende Immobilisierung in der STV-beschichteten Mikrotiterplatte (blaue Säulen, imm) führte jedoch zu einer Abnahme der Aktivität von mindestens 50 %, was verschiedene mögliche Ursachen hat.

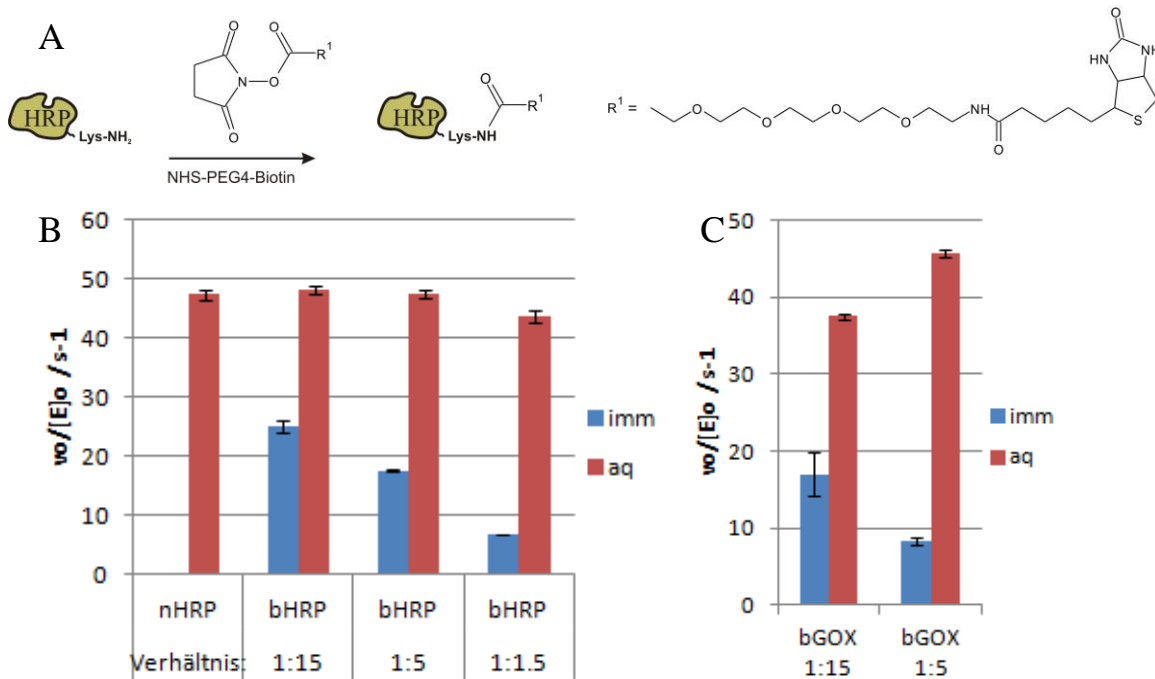


Abbildung 30: **A**: Reaktionsschema der Biotinylierung der Enzyme mit NHS-PEG4-Biotin am Beispiel von HRP, Enzym nicht maßstabsgetreu abgebildet. Der im Überschuss vorliegende NHS-Aktivester kann mit den Aminogruppen der Lysine und mit dem N-Terminus reagieren. **B**: Vergleich der Aktivität von nativer nHRP und biotinylierter bHRP in Lösung (aq) und immobilisiert (imm) auf STV-beschichteten Mikrotiterplatten. Messung mit 20 μM Amplex Red und 1 mM H_2O_2 . **C**: Vergleich der Aktivität biotinylierter Glukose-Oxidase (bGOX) in Lösung (aq) und immobilisiert (imm). Messung mit 10 mM Glukose, 20 μM Amplex Red und 1 nM nHRP. Auf der x-Achse sind außerdem die verschiedenen molaren Verhältnisse von Enzym zu Biotinylierungsreagenz im Reaktionsansatz aufgetragen.

Immobilisierte Enzyme besitzen häufig, wie auch beim DDI in Abschnitt 2.1.2.5 beobachtet, eine geringere Aktivität.^[109] Wegen des geringen Abstands zur Oberfläche ist die Zugänglichkeit der aktiven Tasche verringert. Gleichzeitig führt die hohe lokale Enzymkonzentration auf der Oberfläche zu überproportionalem Substratverbrauch, der zu Substratverarmung (vgl. S. 35) führt.^[109] Hier wurden die Enzyme nicht wie in Abschnitt 2.1.2.5 mittels DDI immobilisiert, sondern durch direkte Biotinylierung. Die Länge der PEG4-Einheit wurde vom Hersteller (Sigma-Aldrich) mit 2,9 nm angegeben, während in Abschnitt 2.1.2.5 Fängeroligonukleotide von 22 bzw. 28 Basenpaaren eingesetzt wurden, die als Doppelhelix (0,34 nm/bp) eine Länge von 7,5 bzw. 9,5 nm aufwiesen. Die Enzyme waren also dichter an der Oberfläche. Das könnte sich negativ auf die Substratzugänglichkeit auswirken, da immer ein Teil der aktiven Zentren ungünstig zur Oberfläche orientiert vorlag und die Einflugschneise der Substrate durch die Nähe zur Oberfläche limitiert war.^[109] Die

Anzahl der immobilisierten Enzyme dürfte demnach größer sein, als die verringerte Aktivität vermuten lässt.

Das Diagramm zeigt weiterhin, dass ein größerer Überschuss des Biotinylierungsreagenz zu höheren Aktivitäten führte. Vermutlich erfolgte beim Verhältnis von 1:1,5 und 1:5 noch keine vollständige Biotinylierung aller eingesetzten Enzyme. Je mehr Biotinylierungsreagenz eingesetzt wurde, desto geringer wurde der Anteil nicht-biotinylierten Enzyme. Außerdem waren Mehrfachbiotinylierungen möglich, die durch den kooperativen Effekt zu einer besseren Immobilisierungseffizienz führen könnten.

Die Bindungsfähigkeit der biotinylierten Glukose-Oxidase (bGOX) wurde ebenfalls durch Aktivitätsmessungen in STV-beschichteten Mikrotiterplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30C dargestellt und entsprechen denen von bHRP in Abbildung 30B. Daraus folgt, dass GOX ebenfalls erfolgreich biotinyliert wurde und auf STV-beschichteten Oberflächen binden konnte.

Die Bestimmung der tatsächlich gebundenen Enzymmenge war mit dieser Methode nicht möglich, da die Aktivität der immobilisierten Enzyme aus oben genannten Gründen reduziert ist. Die Daten konnten also nur relativ zueinander bewertet werden. Eine exakte Quantifizierung erfolgt später in Abschnitt 2.3.3 aus Differenzmessungen des Überstandes. Für die weiteren Experimente wurden bei beiden Enzymen die Ansätze mit 1:15 Stöchiometrie ausgewählt.

2.3.2 Bestimmung des optimalen Immobilisierungsverhältnisses

Zur Immobilisierung der biotinylierten Enzyme auf den STV-beschichteten Partikeln wurde zunächst das optimale Mischungsverhältnis bestimmt. Das zugehörige Bindungsgleichgewicht könnte spektroskopisch über Differenzmessungen bestimmt werden. Da es sich bei den zu immobilisierenden Proteinen aber um katalytisch aktive Enzyme handelt, eignen sich die um den Faktor 10000 sensitivere Aktivitätsmessungen besser. In diesem Abschnitt wurden zunächst die Aktivitäten der immobilisierten Enzyme ermittelt, die aber, aus den in Abschnitt 2.3.1 diskutierten Gründen, nur relativ zueinander interpretiert werden konnten. In Abschnitt 2.3.3 wurden schließlich die Aktivitäten der Enzyme im Überstand bestimmt, aus denen die absolute Beladung der Partikel berechnet werden konnte.

Für die Experimente wurden Filterplatten im Mikrotiterplattenformat verwendet, die paralleles Inkubieren verschiedener Mischungsverhältnisse ermöglichten. Ungebundene Enzyme konnten durch Waschen der Partikel durch mehrfache Zugabe von Puffer und anschließendes Zentrifugieren einfach entfernt werden. Die Membranen hielten dabei die Partikel zurück. Typische Probleme beim Pipettieren von Suspensionen entfielen, da die Partikel durchgehend – während der Inkubation, während aller Waschschritte und bei der anschließenden Analytik – in denselben Vertiefungen der Filterplatte blieben.

In den Experimenten wurde die Partikelzahl (2500 pro Vertiefung) konstant gehalten und die Enzymmenge über einen großen Bereich variiert (1 – 10000 fmol, entspricht 0,01 – 100 nM). Die inkubierten Partikel wurden anschließend 10x (durch Zugabe von Puffer und Zentrifugation) gewaschen, um überschüssige und unspezifisch an Partikeln und Membranen adsorbierte Enzyme zu entfernen. Nach Zugabe der Substratlösung wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion gemessen. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 31 gegen die Enzymmenge aufgetragen.

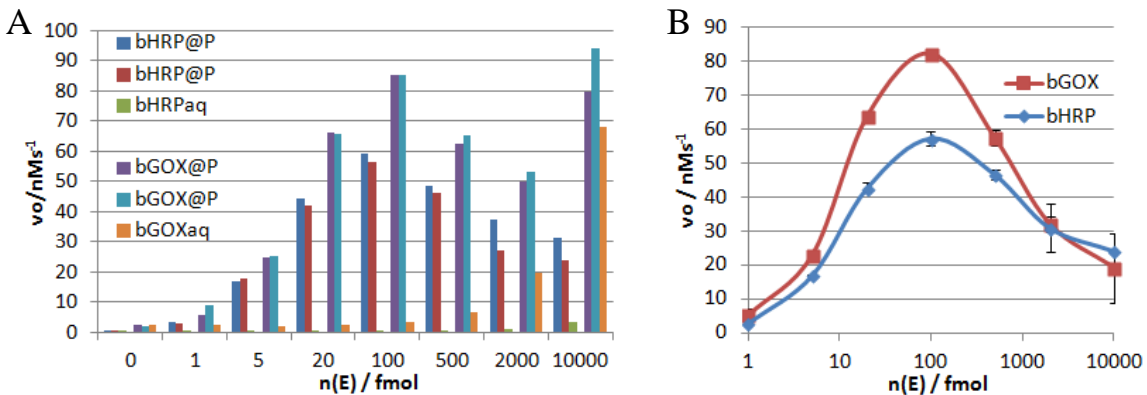


Abbildung 31: **A:** Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der in der Filterplatte gewaschenen funktionalisierten Partikel. In jeder Vertiefung wurden 2500 Partikel mit verschiedenen Mengen bHRP bzw. bGOX inkubiert (1 – 10000 fmol, entspricht 0,01 – 100 nM). Nach zehn Waschzyklen wurde die Aktivität im Fall von HRP mit 100 μ M H₂O₂ und 20 μ M Amplex Red und im Fall von GOX mit 100 mM Glukose, 20 μ M Amplex Red und 1 nM nHRP bestimmt. Die mit @P bezeichneten Daten entsprechen den aufgereinigten Partikeln und wurden als Duplikate gemessen, die mit aq benannten Ergebnisse enthielten keine Partikel und dienten als Negativkontrolle. **B:** Von den gemittelten Daten wurden Negativkontrollen (aq) und Hintergrund (0 fmol) abgezogen, und die Ergebnisse wurden gegen die logarithmisch skalierte Stoffmenge der Enzyme aufgetragen.

Die Partikel enthaltenden Vertiefungen wurden jeweils als Duplikate inkubiert und gemessen. Die Werte unterschieden sich nur bei hohen Enzymmengen signifikant. Als Negativkontrolle wurden Vertiefungen ohne Enzyme (0 fmol) und ohne Partikel („aq“) präpariert. In der Kontrolle ohne Enzym war bei bHRP keine Aktivität erkennbar, während

bei bGOX unspezifische Oxidation mit dem Reporterenzym nHRP stattfand.^[126] Die Kontrollen ohne Partikel („aq“) unterschieden sich deutlich. bHRPaq stieg erst bei 10000 fmol erkennbar an, während die Aktivität des bGOXaq einerseits durch die unspezifische Reaktion des Reporterenzym ein höheres Grundrauschen zeigte, aber bei 500, 2000 und besonders 10000 fmol exponentiell zunahm. Dies könnte durch unspezifische Adsorption der bGOX Moleküle an die Oberfläche der Mikrotiterplatten oder der Membranen verursacht worden sein. Vom Hersteller wurden die Membranen zwar mit 0,45 µm Porengröße angegeben, aber vermutlich verstopfte das größere bGOX (160 kDA)^[80] bei hohen Konzentrationen als Agglomerate die Poren und konnte selbst durch zehn Waschzyklen nicht vollständig entfernt werden.

Um die Daten weiter zu analysieren, wurde zunächst die Negativkontrolle (0 fmol) abgezogen, die Duplikate gemittelt und zuletzt die Kontrollen ohne Partikel („aq“) subtrahiert. Die Kurven wurden in Abbildung 31B gegen die logarithmisch skalierte Stoffmenge aufgetragen.

Beide Enzyme zeigten ein deutliches Maximum bei 100 fmol. Die erwartete sigmoidförmige Kurve für Bindungsgleichgewichte trat nicht auf. Stattdessen wurde ein Maximum erreicht, und bei weiterer Erhöhung der Enzymmenge nahmen beide Kurven wieder ab. Das Bindungsgleichgewicht konnte also durch weiteren Enzymüberschuss nicht weiter verschoben werden. Stattdessen kam es zur Abnahme der Aktivität bei zu großem Enzymüberschuss. Interessant ist, dass beide Enzyme dieses unerwartete Verhalten zeigten und das Maximum bei ähnlichen Konzentrationen aufwiesen.

Die unerwarteten Kurvenformen waren vermutlich auf die hohe lokale Enzymkonzentration zurückzuführen. Dadurch könnten die Enzyme aggregieren, was die Aktivität verringert. Auch die Oberflächenstruktur der Membran könnte sich auf die Enzymaktivität auswirken, wie bei der erhöhten Aktivität der Kontrollen beobachtet wurde. Eine quantitative Auswertung, um aus der Aktivität die tatsächlich gebundene Enzymmenge zu berechnen, war aus den in Abschnitt 2.3.1 diskutierten Gründen nicht möglich. Aus den

Maxima in Abbildung 31B konnte aber das optimale Inkubationsverhältnis von 100 fmol Enzym zu 2500 Partikel (40 amol:Partikel¹) abgeschätzt werden.

Ein vergleichbares System wurde von kürzlich von Heo untersucht.^[70] Er verwendete ebenfalls STV-beschichtete Mikropartikel mit 10 µm Durchmesser. Er inkubierte die Partikel mit variablen Mengen der biotinylierten Enzyme und bestimmte ihre Aktivität in der Mikrofluidik mit Amplex Red. Bei bHRP und bGOX führte das Inkubationsverhältnis von 9,5 amol:Partikel zu maximaler Beladung. Der in Abbildung 31B bestimmte Wert von 40 amol:Partikel könnte durch einen niedrigeren Biotinylierungsgrad der Enzyme, größere STV-Mengen auf der Partikeloberfläche und Unterschiede beim Waschen erklärt werden, lag aber in der gleichen Größenordnung.

Um aus dem optimalen Inkubationsverhältnis die tatsächliche Beladung pro Partikel zu bestimmen, ging Heo von einer vollständigen Bindung aller eingesetzten Enzyme aus und verwendete diesen Wert direkt als Beladung. Da es sich aber bei der hochaffinen STV-Biotin Wechselwirkung strenggenommen um ein Gleichgewicht handelt, das durch sterische Hinderung und durch Immobilisierung beeinflusst werden kann, ist diese Vorgehensweise fehlerhaft. Exakter ist die in Abschnitt 2.3.3 diskutierte Bestimmung der Beladung durch Differenzmessungen aus dem Überstand.

2.3.3 Bestimmung der Beladung aus dem Überstand

Die Beladung der Enzyme auf den Partikeln kann, wie bereits diskutiert, nicht über die Aktivität der immobilisierten Enzyme bestimmt werden. Stattdessen kann aus der Abnahme der Enzymkonzentration in der Inkubationslösung die immobilisierte Enzymmenge berechnet werden. Die Bestimmung der Enzymkonzentration im Überstand kann entweder über die Absorption der charakteristischen Banden der prosthetischen Gruppen, über einen Proteinassay nach Lowry oder nach Bradford, oder enzymatisch über ihre Aktivität erfolgen.

Am Beispiel von HRP können die Konzentrationsbereiche grob abgeschätzt werden. Mittels UV-Vis-Spektroskopie können Absorptionen bis ca. 0,001 gemessen werden, was mit

¹ Die Schreibweise amol:Partikel soll verdeutlichen, dass es sich um die Stöchiometrie der eingesetzten Enzyme pro Partikel in der Inkubationslösung handelt. Die tatsächliche Beladung, also die Stoffmenge der gebundenen Enzyme pro Partikel, wird in Abschnitt 2.3.3 bestimmt und hat zur besseren Unterscheidung die Einheit amol/Partikel.

$\epsilon_{403} = 102 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ^[127] einer HRP-Konzentration von ca. 10 nM entspricht. Der Lowrytest ist sensitiver als der Bradfordtest, seine Nachweisgrenze wird mit 0,1 $\mu\text{g/mL}$ angegeben,^[128] was bei der Proteinmasse von 44 kDa^[87] ca. 2 nM entspricht. Enzymkinetisch können dagegen HRP-Konzentrationen bis etwa 1 pM bestimmt werden. Da nur die Aktivität des gelösten Enzyms betrachtet wird, ist dessen Aktivität proportional zur Enzymkonzentration. Die enzymkinetischen Messungen sind also um den Faktor 10^4 bis 10^5 sensitiver als die anderen Proteinbestimmungsmethoden.

Ein Testexperiment mit HRP über Absorptionsmessungen bestätigte, dass die Signaldifferenzen in der Größenordnung der Fehlerstreuung lagen und die Ergebnisse dadurch sehr ungenau wurden. Deshalb, und wegen des ebenfalls um den Faktor 10^5 erhöhten Materialverbrauchs, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, und die Beladung der Partikel wurde in dieser Arbeit ausschließlich enzymkinetisch bestimmt.

Die biotinylierten Enzyme wurden im optimierten Verhältnis (100 fmol Enzym auf 2500 Partikel, entspricht 40 amol:Partikel) inkubiert. Zur Verifikation der Ergebnisse aus Abschnitt 2.3.2 wurde zusätzlich bei gleicher Enzymmenge 750 und 7500 Partikel eingesetzt, was 133 bzw. 13 amol:Partikel entspricht. Nach 45 min wurden Aliquots des Überstandes entnommen und die Aktivität mit dem Amplex Red Assay gemessen. Eine Probe ohne Partikel diente als Referenz, um aus den Aktivitäten die zugehörige Enzymmenge auszurechnen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Bei bHRP (Abbildung 32A) nahm die Enzymmenge im Überstand mit steigender Partikelzahl ab. Die daraus berechnete immobilisierte Enzymmenge nahm entsprechend zu, da mehr Partikel auch mehr Enzym binden konnten. Die Differenzbildung führte zu Standardabweichungen von bis zu 190 %, da die gemessenen Konzentrationsunterschiede bei geringer Partikelzahl an der Grenze der Messgenauigkeit lagen. Außerdem ist die Pipettiergenauigkeit bei Suspensionen generell niedriger, was zu größeren Abweichungen bei den Rohdaten führt.

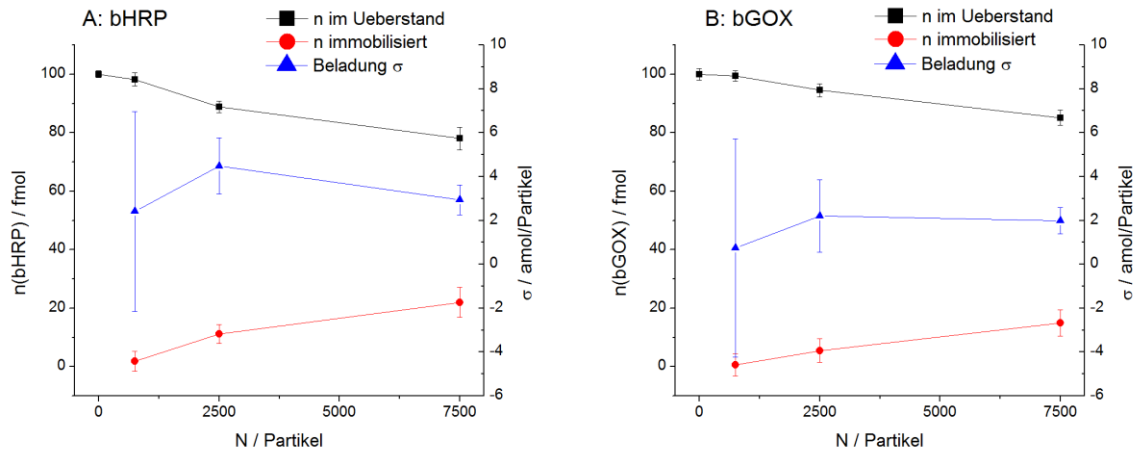


Abbildung 32: Bestimmung der Beladung über die Aktivität des Überstandes. **A:** bHRP, **B:** bGOX. Die Proben wurden in verschiedenen Verhältnissen inkubiert. Nach 45 min wurden Aliquots des Überstandes entnommen und die Aktivität durch Zugabe von 20 μM Amplex Red und 1 mM H_2O_2 (für bHRP) bzw. 20 μM Amplex Red, 10 mM Glukose und 2 nM nHRP (für bGOX) bestimmt. Durch Normierung auf die Kontrolle ohne Partikel (100 fmol) konnte die vorliegende Enzymmenge im Überstand berechnet werden. Differenzbildung lieferte die Menge immobilisierter Enzyme, aus der schließlich durch Normierung auf die Partikelzahl N die Beladung σ berechnet werden konnte, die auf der rechten Achse aufgetragen wurde.

$$\sigma = n(\text{E})_{\text{geb}} / N \quad (14)$$

Nach Gleichung (14) konnte schließlich die Beladung σ als Quotient der gebundenen Enzymmenge $n(\text{E})_{\text{geb}}$ und der Partikelzahl N berechnet werden. Die Werte für σ lagen zwischen 2,4 und 4,5 amol/Partikel mit relativ hohen Standardabweichungen von 23–190 %, die ebenfalls aus der vorherigen Differenzbildung resultieren.

Die Beladung erreichte bei 2500 eingesetzten Partikeln einen Maximalwert, was dem Verlauf der Kurven in Abbildung 31B in Abschnitt 2.3.2 entsprach und damit das optimale Inkubationsverhältnis von 100 fmol pro 2500 Partikel (40 amol:Partikel) bestätigte.

Beim Maximum wurde eine Beladung von $\sigma = 4,5 \pm 1,3$ amol/Partikel gefunden, was bezogen auf die eingesetzten 40 amol:Partikel einer Immobilisierungseffizienz von 11 ± 3 % entsprach. Die niedrige Immobilisierungseffizienz ist ein Hinweis auf nicht vollständige Biotinylierung aller HRP-Enzyme und eine Verschiebung des Gleichgewichts durch sterische Hinderung. Die Differenzbildung quantifiziert jedoch nur die immobilisierten Enzyme und somit ist der Wert valide.

Die vom Hersteller (Kiesker) angegebene Bindungskapazität der Partikel für Biotin-Fluorescein beträgt 32,2 amol/Partikel. STV besitzt als tetrameres Enzym vier identische Bindungsstellen für Biotin. Durch die kovalente Bindung auf der Partikeloberfläche kann

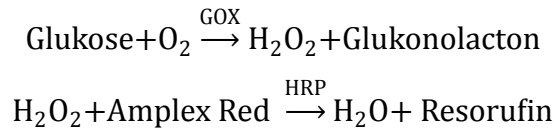
angenommen werden, dass nur drei Bindungsstellen pro STV frei zugänglich sind, die vierte ist verdeckt. Somit können bis zu drei Moleküle Fluoreszein pro STV binden. HRP besitzt mit 44 kDa^[87] eine vergleichbare Größe wie STV, so dass aus sterischen Gründen vermutlich nur maximal ein HRP pro STV-Molekül binden kann. Die Bindungskapazität der Partikel für HRP läge demnach bei maximal 10 – 11 amol/Partikel. Dies ist im Einklang mit der oben diskutierte Beladung von $\sigma = 4,5 \pm 1,3$ amol/Partikel.

Die von Heo verwendete Beladung $\sigma = 9,5$ amol/Partikel^[70] war etwa doppelt so hoch, da er eine unrealistische Immobilisierungseffizienz von 100 % annahm. Seong et al. verwendeten 15,5 μm STV-Partikel und schätzen aus der Oberfläche der Partikel ($750 \mu\text{m}^2$) und dem Platzbedarf von HRP (80 nm^2) die Beladung ab.^[112] Für die hier verwendeten Partikel mit dem Durchmesser von 10 μm entspricht die Oberfläche $315 \mu\text{m}^2$, so dass dort etwa $4 \cdot 10^6$ Enzyme Platz haben, was einer maximalen Beladung von $\sigma = 6,5$ amol/Partikel entspricht und damit gut zu dem Ergebnis $\sigma = 4,5 \pm 1,3$ amol/Partikel passt.

Für bGOX wurde in Abbildung 32 ein ähnliches Verhalten wie für HRP gefunden. Die Enzymmenge im Überstand nahm aber weniger ab, woraus eine geringere Zahl immobilisierter Enzyme resultierte. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Inkubationsverhältnis 40 amol:Partikel wurde die höchste Beladung von $\sigma = 2,2 \pm 1,6$ amol/Partikel gefunden, was einer Immobilisierungseffizienz von $5,5 \pm 4,1$ % der eingesetzten bGOX entsprach. Die geringere Beladung im Vergleich zu bHRP kann durch die unterschiedliche Größe der Enzyme erklärt werden. Das homodimere GOX hat eine Masse von 160 kDa^[80] und hat im Vergleich zum kleineren bHRP (44 kDa)^[87] einen höheren Platzbedarf auf der Oberfläche.^[129] Heo nahm auch für bGOX eine Immobilisierungseffizienz von 100 % an und setzte die Beladung dem optimalen Inkubationsverhältnis von 9,5 amol/Partikel gleich.^[70]

2.3.4 Kinetik der enzymbeladenen Mikropartikel nach Michaelis Menten

Mit dem optimierten Mischungsverhältnis aus Abschnitt 2.3.2 und der Kenntnis der Beladung aus Abschnitt 2.3.3 wurde nun die Kinetik der enzymfunktionalisierten Partikel nach Michaelis Menten bestimmt. Die Enzyme reagieren dabei nach dem folgenden Schema (vgl. Abbildung 5, S. 18):



In den späteren Mikrofluidikexperimenten der zweistufigen Enzymkaskade produziert die vorgelagerte bGOX je nach Flussrate und Glukosekonzentration eine variable H_2O_2 -Menge, die der flussabwärts liegenden bHRP als Substrat dient. Um aus der gemessenen Resorufinkonzentration auf die Kinetik der GOX-beladenen Fritte schließen zu können, musste die Kinetik von HRP hier – umgekehrt zu den Messungen in der Mikrotiterplatte in Abschnitt 2.1.2.1 – bei konstanter Amplex Red Konzentration aber variabler H_2O_2 -Konzentration bestimmt werden. Die kinetischen Parameter dienen dann in der Mikrofluidik als Referenz, um die vorliegende H_2O_2 -Konzentration zu berechnen, die von der vorgelagerten GOX-Reaktion produziert wurde. Da in der Mikrofluidik die Zahl der Partikel einfach messbar ist, wurden die Enzyme hier wie ein heterogener Katalysator betrachtet und die Geschwindigkeiten nicht auf die Enzymkonzentration, sondern auf die Partikelzahl bezogen.

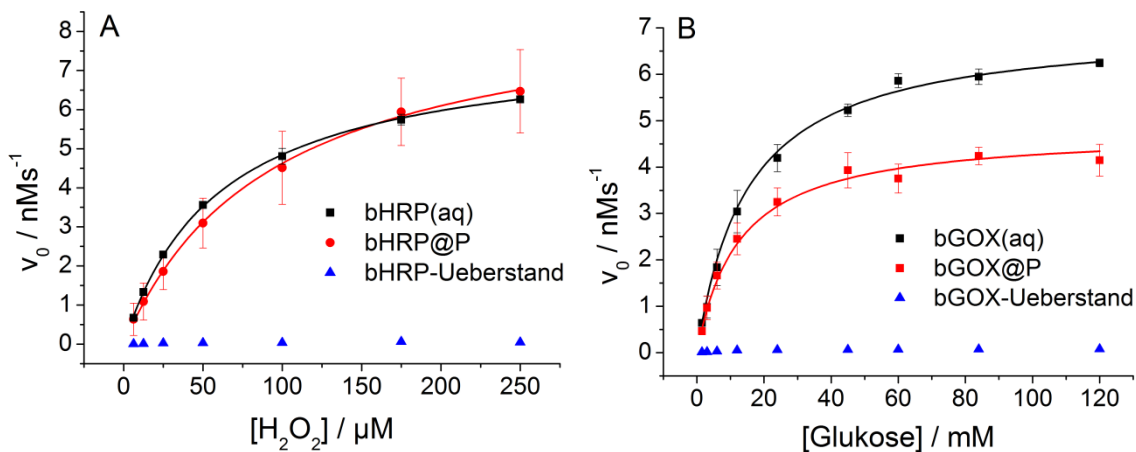


Abbildung 33: **A:** Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten von bHRP(aq) (20 pM), der funktionalisierten gewaschenen Partikel bHRP@P (N = 1470) und des Überstandes der Partikelsuspension gegen die H_2O_2 -Konzentration sowie nichtlinearer Fit nach Michaelis Menten (Gleichung (3)). Messungen mit 100 μM Amplex Red. **B:** Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten von bGOX(aq) (20 pM), der funktionalisierten gewaschenen Partikel bGOX@P (N = 1940) und der Partikelsuspension gegen die Glukose-Konzentration sowie nichtlinearer Fit nach Michaelis Menten. Messungen mit 100 μM Amplex Red und 2 nM nHRP.

Die funktionalisierten und gründlich aufgereinigten Partikel wurden mit der Neubauer Zählkammer gezählt und kinetisch in der Mikrotiterplatte untersucht. Zusätzlich wurde der

Überstand der Suspension gemessen, um den Aufreinigungserfolg zu belegen. Zum Vergleich wurden parallel Messungen mit bHRP und bGOX Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse der Kinetikmessungen sind in Abbildung 33 dargestellt.

Alle Kurven zeigten typisches Michaelis Menten Verhalten. Die Immobilisierung auf Partikel änderte also nicht den Reaktionsmechanismus, allerdings nahm die Datenqualität ab. Bei den immobilisierten Enzymen waren die Fehler größer, da hier Suspensionen vorliegen. Dies führte zu geringerer Pipettiergenauigkeit, und die Fluoreszenzmessungen wurden durch Streueffekte gestört.

Eine Kontrollmessung, die den Überstand der zentrifugierten Partikelsuspension enthielt, lag in der Größenordnung von 1 % des Signals und bewies, dass die Waschschrte nahezu quantitativ waren und die gemessene Geschwindigkeit nicht durch verschlepptes gelöstes Enzym, sondern ausschließlich durch die immobilisierten Enzyme erzeugt wurde.

Alle Datensätze wurden nach Michaelis Menten angepasst und deren Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Zusammenstellung der kinetischen Daten für gelöste und auf Partikel immobilisierte bHRP und bGOX.

	bHRP(aq)	bHRP@P	bGOX(aq)	bGOX@P
$[E]_0 / \text{pM}$	20	66 ± 19	20	43 ± 32
Partikel pro Vertiefung ($V = 100 \mu\text{L}$)		1470 ± 80		1940 ± 150
Beladung σ [amol/Partikel]		$4,5 \pm 1,3$		$2,2 \pm 1,6$
$v_{max} / \text{nM s}^{-1}$	$7,78 \pm 0,07$	$8,9 \pm 0,2$	$7,05 \pm 0,06$	$4,8 \pm 0,1$
k_{cat} / s^{-1}	389 ± 3	135 ± 39	353 ± 3	112 ± 84
$K_M / \mu\text{M}$	$60,5 \pm 0,7$	93 ± 5	$(15,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(13 \pm 1) \cdot 10^3$
r_{max}/N [$\frac{\text{amol}}{\text{Partikel} \cdot \text{s}}$]		608 ± 35		251 ± 21

Die K_M -Werte sind etwas größer, als in der Literatur für konstante Amplex Red Konzentration beschrieben wurde. Seong et al. bestimmten $K_M = 1,55 \mu\text{M}$ mit $10 \mu\text{M}$ Amplex Red^[112], was umgerechnet auf die hier verwendeten $100 \mu\text{M}$ Amplex Red etwa $15,5 \mu\text{M}$ entspräche (vgl. Abschnitt 2.1.2.1). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem von Rho et al. bei $100 \mu\text{M}$ Amplex Red gemessenem K_M -Wert von $14,3 \mu\text{M}$.^[111] Beide Autoren gaben keine k_{cat} -Werte an, da die Enzymmengen nur in Units quantifiziert wurden.

Durch Immobilisierung von bHRP wurde der K_M -Wert um 50 % erhöht, was auf eine Interaktion des Substrats mit der Oberfläche der Partikel hindeutet. Die Kurven in Abbildung 33A sind jedoch innerhalb der Fehler von bHRP@P identisch, so dass es sich auch um ein Artefakt der Regression handeln könnte.

Die v_{max} -Werte in Tabelle 6 sind nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche Enzymmengen vorlagen. Durch Normierung auf $[E]_0$ konnte für die gelösten Enzyme die Wechselzahl k_{cat} berechnet werden. Für die partikelgebundenen Enzyme konnte aus der Partikelzahl N , der Beladung σ und dem betrachteten Volumen eine Pseudokonzentration berechnet werden, aus der ebenfalls die Wechselzahl berechnet werden konnte. Der Wert war, bezogen auf das homogen gelöst Enzym, etwa um den Faktor 3 erniedrigt, was durch die bereits in Abschnitt 2.1.2.5 und Abschnitt 2.3.1 diskutierten Gründe wie sterische Effekte, hohe lokale Enzymkonzentration und schlechte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums erklärt werden kann.

Wegen der nur ungenau bestimmbaren Beladung, wurde v_{max} für die spätere Auswertung der Mikrofluidik nach Gleichung (15) auf die Partikelkonzentration N/V normiert. Die so berechnete maximale Reaktionsrate pro Partikel r_{max}/N wird später für die Auswertung der Mikrofluidik benötigt und beschreibt, wie viel Substrat pro Zeiteinheit pro Partikel bei Sättigung umgesetzt wird.

$$\frac{r_{max}}{N} = \frac{v_{max} \cdot V}{N} = \frac{(8,9 \pm 0,2) \text{ nMs}^{-1} \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}}{1470 \pm 80 \text{ Partikel}} = 608 \pm 35 \frac{\text{amol}}{\text{Partikel} \cdot \text{s}} \quad (15)$$

Die Messungen mit bGOX wurden mit einem zwanzigfachen Überschuss des Reporterenzym nHRP durchgeführt, damit das gebildete Resorufin 1:1 der H_2O_2 -Konzentration entsprach. Die nach Michaelis Menten bestimmten Parameter waren dann im Gegensatz zu den Ergebnissen in Abschnitt 2.1.2.4 nicht apparent, sondern absolut.

Für bGOX erfolgte die Auswertung wie oben für HRP diskutiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 6 angegeben. Wegen des im Überschuss eingesetzten Reporterenzym ist ein Vergleich mit Literaturwerten nun möglich. Zhang et al. fanden ebenfalls mit zwanzigfachen Überschuss des Reporterenzym aber unter Verwendung von ABTS als Substrat einen k_{cat} -Wert von 250 s^{-1} und einen K_M -Wert von 15 mM .^[23] Der höhere k_{cat} -Wert von 353 s^{-1} in dieser Arbeit könnte auf das reaktivere Amplex Red zurückzuführen sein. Die K_M -Werte sind aber identisch.

Beim Vergleich der in Tabelle 6 angegebenen Ergebnisse von freier bGOX mit auf Partikel immobilisierter bGOX ist erkennbar, dass der K_M Wert nahezu konstant blieb, während bei k_{cat} , wie schon im Fall von bHRP, ebenfalls eine Abnahme um den Faktor 3 auftrat. Wegen der unsicheren Beladung lag der relative Fehler hier ebenfalls bei 75%, so dass als Referenz für die Mikrofluidik die oben diskutierten r_{max}/N -Werte besser geeignet sind. Sie konnten ohne Kenntnis der exakten Beladung sowohl in der Mikrotiterplatte, als auch in der Mikrofluidik einfach bestimmt werden und sind damit direkt vergleichbar.

2.4 Der Mikrofluidische Reaktor

Die GOX/HRP-Enzymkaskade wurde in dem in Abbildung 34 skizzierten mikrofluidischen Festbettreaktor aus Polydimethylsiloxan (PDMS) untersucht. Um einen besseren Kontakt zwischen Enzymen und Substratlösung zu erreichen, wurden die Enzyme wie in Abschnitt 0 diskutiert auf Mikropartikeln immobilisiert. Dadurch wurde die Oberfläche vervielfacht, was zu höheren Enzymdichten führte. Außerdem befanden sich die Enzyme nicht wie in STV-Platten als zweidimensionale Schicht auf dem Boden des Kanals, sondern waren im ganzen Volumen des Kanals verteilt. Die funktionalisierten Partikel konnten über die Seitenkanäle S1 und S2 in den Hauptkanal injiziert werden und an den Fritten F1 und F2 aufgeschüttet werden. Fritte F0 diente als vorgeschaltetes Sieb, um PDMS-Trümmer oder mögliche Verunreinigungen der Substratlösung herauszufiltern oder driftende Partikel zurückzuhalten. Beide Schüttungen waren dann von je zwei Fritten eingerahmt und bildeten getrennte Reaktionskammern.

Im Vergleich zu den Experimenten in der Mikrotiterplatte erfolgte die Reaktion unter kontinuierlichem Fluss, so dass ständig frisches Substrat durch den Hauptkanal nachgeliefert wurde. Ein weiterer Vorteil war, dass die Enzyme räumlich getrennt voneinander immobilisiert werden konnten, da das Zwischenprodukt H_2O_2 mit der Strömung zum zweiten Enzym GOX transportiert wurde. Auf diese Art war eine getrennte Betrachtung der beiden Reaktionen möglich.

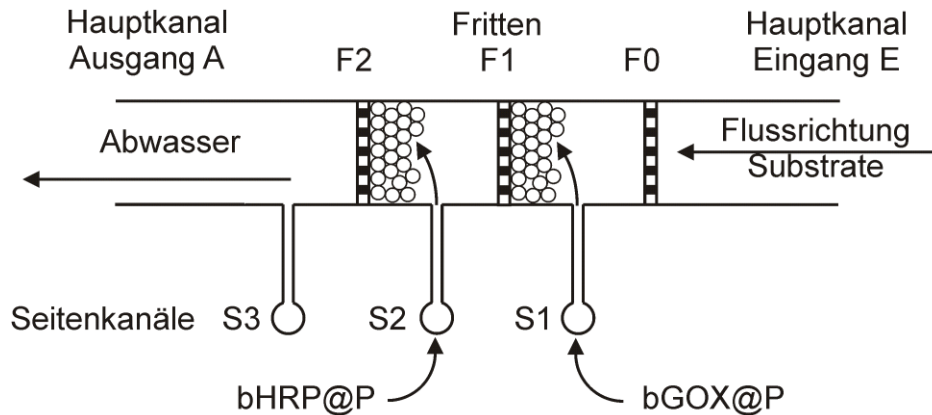


Abbildung 34: Schematische Darstellung des mikrofluidischen Festbettreaktors für eine zweistufige Enzymkaskade.

2.4.1 Design des mikrofluidischen Reaktors

Der Festbettreaktor wurde von Jonathan West am ISAS Dortmund ursprünglich für dreistufige Enzymreaktionen entwickelt. Er enthält einen 250 µm breiten Hauptkanal, darin drei senkrecht zur Flussrichtung verlaufende Fritten sowie drei Seitenkanäle zum Füllen der Fritten. In Abbildung 35 ist die CAD Vorlage dargestellt. Alle Kanäle beginnen bzw. enden in großen kreisrunden Reservoirs mit einem Durchmesser von 1,5 mm, die nach dem Gießen und Erhärten des Reaktors je nach Bedarf als Ein- und Auslässe aufgestochen werden. Sie enthalten ein hexagonales Säulenmuster zur Stabilisierung und damit die Positionen für das Auge besser erkennbar sind. Die drei Seitenkanäle werden von den Eingängen zunächst aufeinander zugeführt und dann parallel Richtung Hauptkanal geleitet. Der Durchmesser nimmt dabei bis zur Verbindung mit dem Hauptkanal kontinuierlich ab, damit es an den Kreuzungen zu geringeren Turbulenzen kommt. Die drei Fritten bestehen aus 12 Segmenten und ergeben 13 schmale Durchlässe. Auf der linken Seite sind sie kreisförmig vertieft, damit sich die Partikel nicht direkt vor die Durchlässe absetzen, wodurch ein höherer Widerstand entstände.

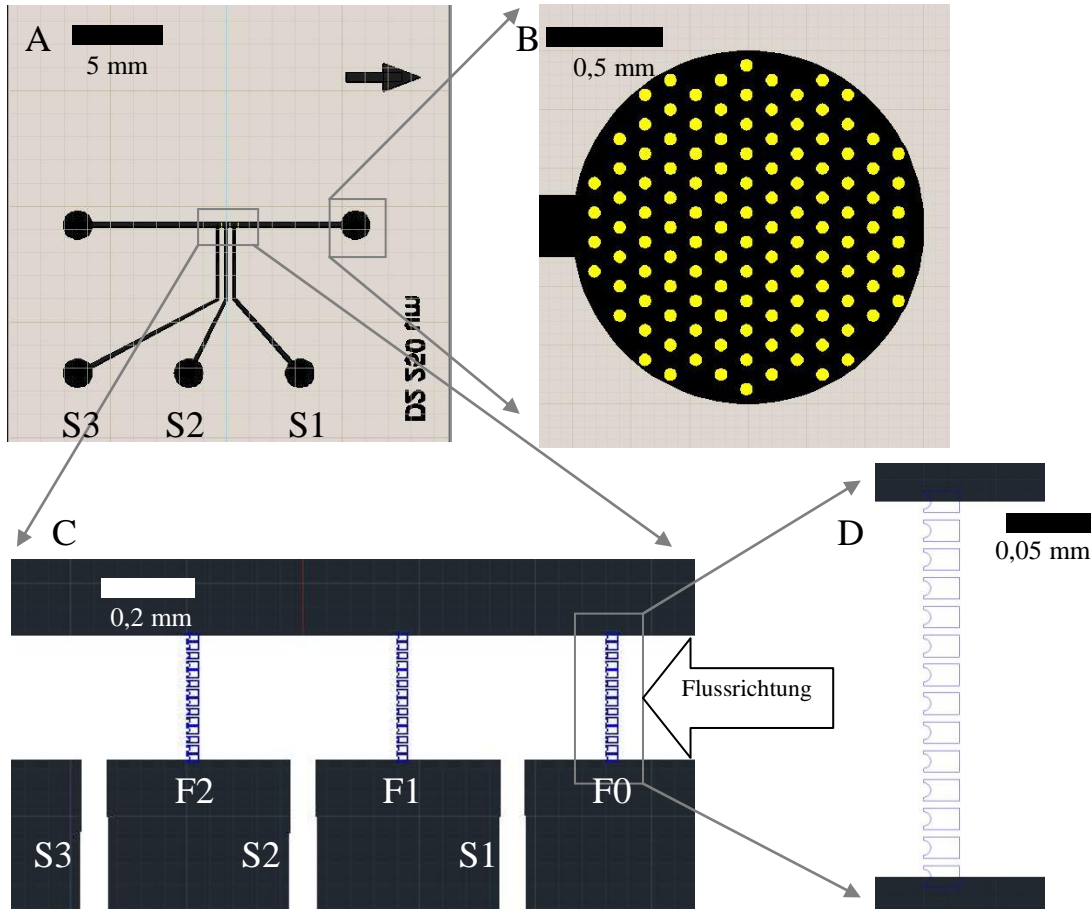


Abbildung 35: Layout des Mikroreaktors (A) sowie Details der Elemente (B – D), geätzte Höhe 30 μm .

2.4.2 Herstellung des mikrofluidischen Reaktors

Der mikrofluidische Reaktor wurde durch Softlithographie hergestellt. Als Form diente ein mit dem photosensitiven Epoxyharz SU-8 beschichteter Siliziumwafer, der am Dortmunder ISAS Institut nach dem Design aus Abbildung 35 photolithographisch geätzt wurde. Die Strukturtiefe betrug 30 μm . Abbildung 36A zeigt Fotos eines Wafer sowie eines darauf gesetzten mit entgastem PDMS gefüllten Gießrahmens (B). Nach dem Aushärten bei 80 °C konnten die transparenten PDMS-Reaktoren aus der Form gelöst werden. Abbildung 36C zeigt den rohen Reaktor, die Mikrostruktur ist schwach erkennbar. Mit einer Biopsiestanze wurden alle fünf Eingänge aufgestochen, auch die, die später nicht benötigt wurden. (Abbildung 36D) Anders ließ sich eingeschlossene Luft nicht vollständig entfernen.

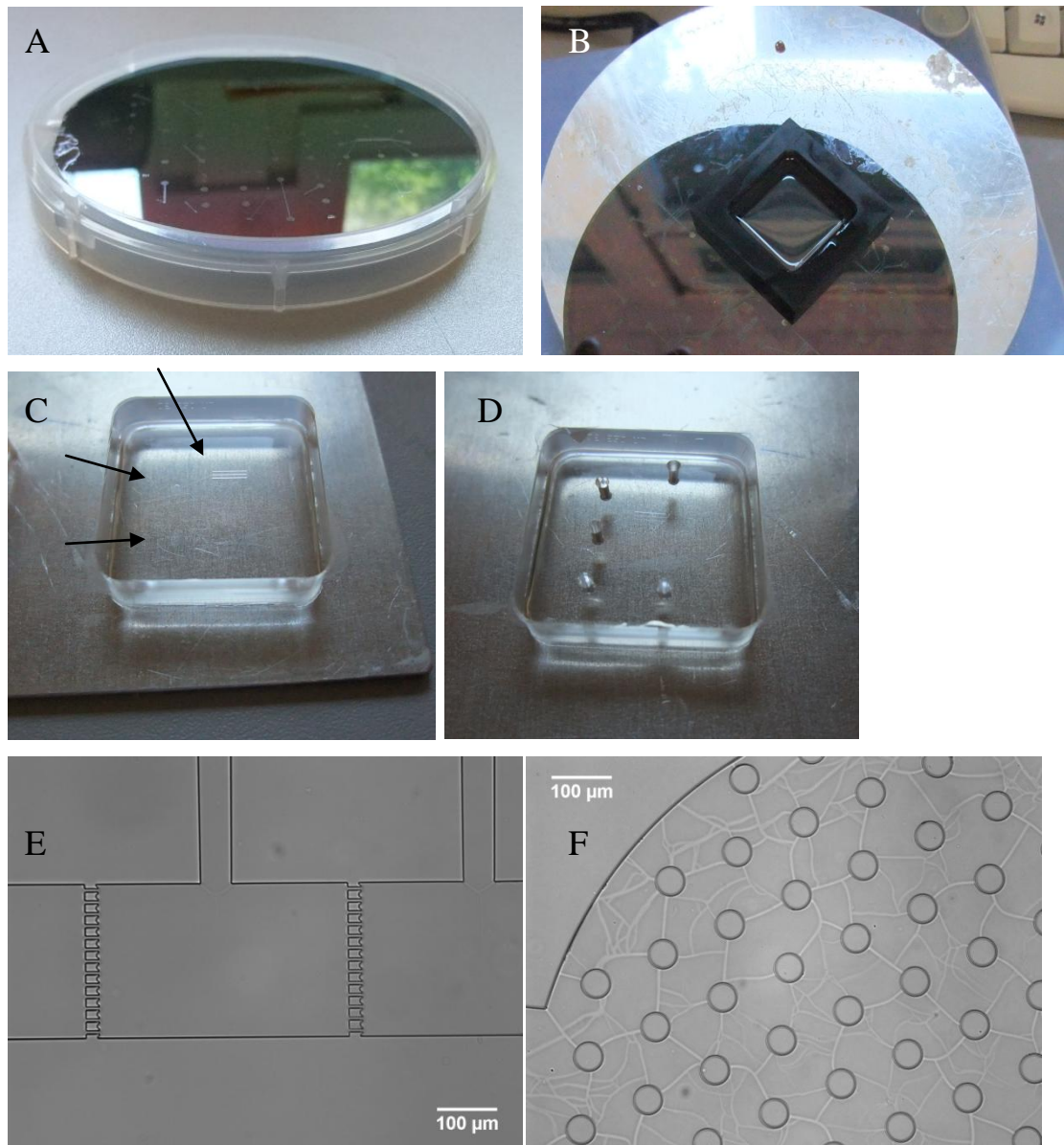


Abbildung 36: **A:** Fertig geätzter Wafer mit mehreren Reaktorlayouts, **B:** Wafer mit PDMS-gefüllten Gießrahmen auf Heizplatte. **C:** Ausgehärteter Reaktor. Auf der Oberfläche sind die Mikrostrukturen schwach erkennbar. **D:** Gleicher Reaktor mit allen 5 Einlässe durchgestochen. **E-F:** Durchlichtbilder des ausgehärteten PDMS-Reaktors und der darin enthaltenen Mikrostrukturen (Einlass noch nicht durchgestochen).

Teilabbildungen **E – F** zeigen Mikroskopiebilder der Mikrostrukturen des Reaktors. Die Fritten waren regelmäßig und zeigten ein exaktes Profil. Auch die Strukturen in den Einlässen wurden detailliert abgebildet..

Als Unterseite zum Verschließen des Reaktors wurden passende Deckgläser verwendet, die zuvor einseitig mit PDMS beschichtet wurden. Die Reaktoren und die beschichteten Unterseiten wurden mit O_2 -Plasma behandelt (Abbildung 37A und B), was zu

einer Aktivierung der Silikonoberflächen durch Anbindung zusätzlicher funktioneller OH-Gruppen und O-Radikale führte.^[130] Durch vorsichtiges Zusammendrücken bilden sich kovalente Bindungen zwischen den aktivierten Oberflächen, so dass ein dicht abgeschlossener Mikroreaktor erhalten wurde (Abbildung 37C). Dieses Verfahren wird in der Literatur auch als „Bonding“ bezeichnet.

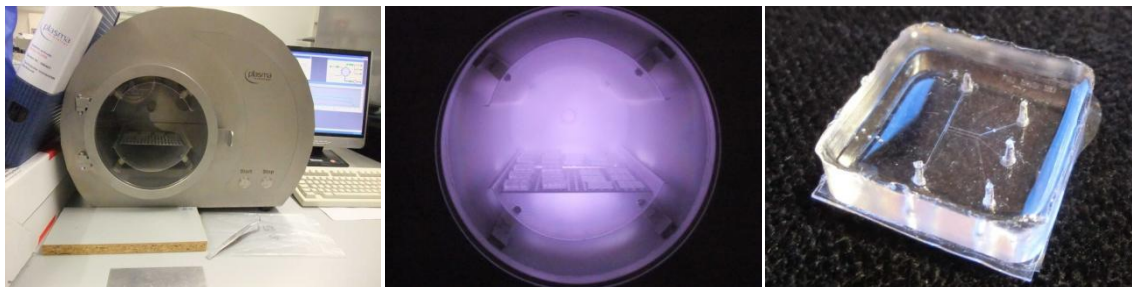


Abbildung 37: **A:** Plasmakabine **B:** Behandlung der PDMS-Mikrokanäle (2 Reihen links) und PDMS-beschichteten Deckgläsern (2 Reihen rechts) mit O₂-Plasma **C:** Fertiger Reaktor mit „gebondeter“ Unterseite.

2.4.3 Befüllen des mikrofluidischen Reaktors

In diesem Abschnitt wird die Strategie zum Befüllen des Reaktors mit Partikeln erläutert. Der gesamte Vorgang wurde mit dem Mikroskop beobachtet, damit die Flussraten manuell angepasst werden konnten. In Abbildung 38 sind Fotos des im Fluoreszenzmikroskops aufgebauten und konfigurierten Experiments gezeigt.

In den Seitenkanälen eingeschlossene Luft störte bei den späteren Experimenten die Messungen, da sie je nach Druck im Reaktor unterschiedliche Volumina einnahm. In der Folge kam es zu Strömungen in oder aus den Seitenkanälen. Der Reaktor sollte deshalb beim Experiment absolut blasenfrei sein. Eine weitere Beobachtung war, dass sich die Fritten nach Kontakt mit Puffer als Barriere für Luftblasen erwiesen, die nur durch hohe Flussraten entfernt werden konnten. Zum Entfernen sämtlicher Blasen an den Fritten und in den Seitenkanälen wurden insgesamt etwa 100 µL Puffer durch den Reaktor gepumpt. Da durch das Einstecken der Einlässe immer PDMS-Abrieb entstand, der sich an den Fritten sammelte, wurde dieser Schritt, wie in Abbildung 39A schematisch dargestellt, mit entgegengesetzter Flussrichtung durchgeführt. Die PDMS-Verunreinigungen sammelten sich dann an Fritte F3. Auf diese Weise wurde vor dem Experiment das komplette Kanalsystem mit Puffer geflutet, bis es absolut blasenfrei war.

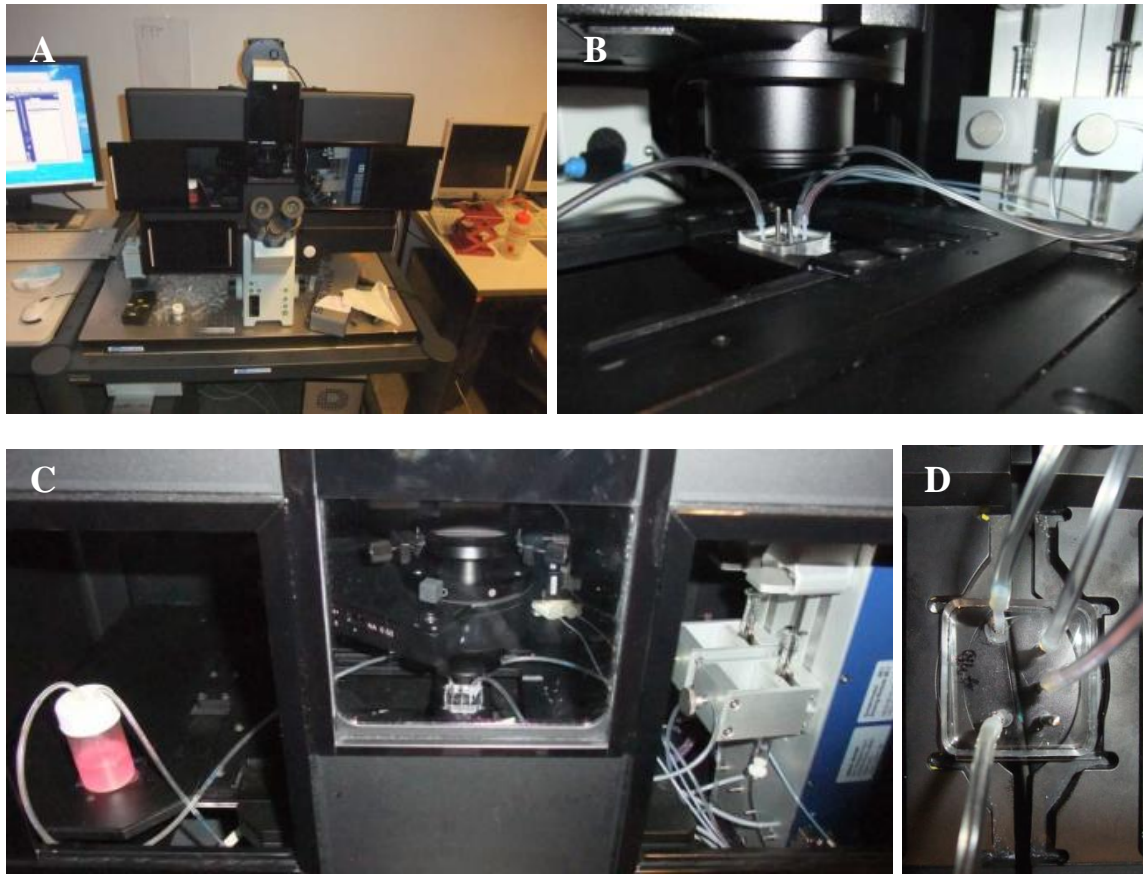


Abbildung 38: **A:** Fluoreszenzmikroskop mit geöffneter Dunkel- und Temperierkammer. **B:** Nahaufnahme des Reaktors. Eine Spritze ist über einen Schlauch mit dem Hauptkanal verbunden, die andere mit dem Seitenkanal S1. Seitenkanäle S2 und S3 sind durch Metallstifte verschlossen. Ganz links führt ein Schlauch zum Abwasser. **C:** Der Blick in die Kammer zeigt rechts das Doppelpumpenmodul mit den zwei Glasspritzen. In der Mitte befindet sich der Reaktor im Strahlengang des Mikroskops. Auf der linken Seite wird das Abwasser gesammelt. Die Rosafärbung beruht auf das Reaktionsprodukt Resorufin. **D:** Nahaufnahme des Reaktors mit zwei angeschlossenen Seitenkanälen S1 und S2.

Anschließend wurde die mit Substrat gefüllte Spritze am Hauptkanal angeschlossen und der Seiteneingang S3 mit einem Metallstift verschlossen. Durch Pumpen wurden eventuell neu eingebrachte Blasen entfernt. Danach wurden je $1,5 \mu\text{L}$ der Partikelsuspension (bGOX und bHRP) in die Schlauchenden von zwei mit Puffer gefüllten Spritzen aufgezogen und in der in Abbildung 39B dargestellten Konfiguration angeschlossen.

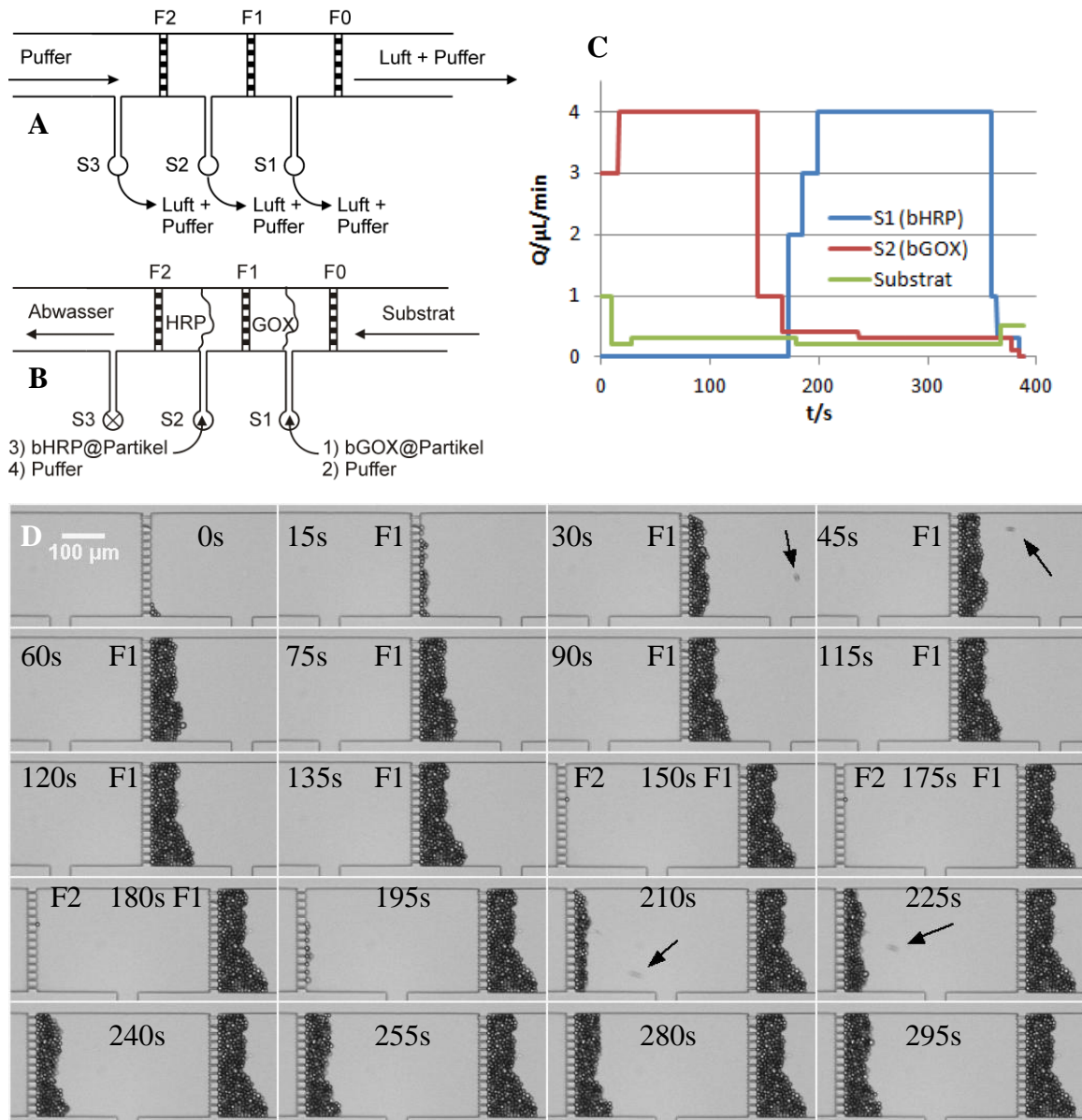


Abbildung 39: Manuelles Befüllen der zwei Fritten mit enzymbeladenen Partikeln. **A**: Fluten mit Puffer und komplettes Entfernen der Luft in Gegenrichtung. Danach wurden die Schläuche umkonfiguriert: die substratenthaltende Spritze an den Hauptkanal angeschlossen und in Vorwärtsrichtung gepumpt, um mögliche neue Luftblasen zu entfernen. (nicht dargestellt) **B**: Anschlusschema mit 3 Spritzen: Nach verschließen des Seitenkanals S3 mit einem Metallstift wurde zum Einbringen der Partikel die Strömung im Hauptkanal auf ca. 0,2 – 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ gedrosselt. In das Ende der Schläuche von zwei pufferenthaltenden Spritzen wurden je 1,5 μL Partikelsuspension (bGOX bzw. bGOX) aufgezoogen, was etwa 375 Partikeln entspricht. Beide Schläuche wurden nach dem Schema vorsichtig an die entsprechenden Seitenkanäle angeschlossen. Zuerst wurden die bGOX-beladenen Partikel mit 3 – 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ über S1 in den Reaktor eingeleitet, anschließend die mit bHRP-beladenen über S2. In **C** sind die zugehörigen Flussraten der manuell gesteuerten Pumpen gegen die Zeit aufgetragen. **D**: Montage des während des Füllens aufgenommenen Films, Belichtungszeit 2 ms, Zeitintervall 15 s. Die Zahlen geben die Zeit in s an. Nach ca. 140 s wurde der Reaktor im Mikroskop mit dem X-Y-Tisch verschoben, damit die Fritte F2 in den Fokus gelangte. Die Pfeile zeigen einströmende Partikel, die wegen ihrer hohen Geschwindigkeit bei der Belichtungszeit von 2 ms nur unscharf abgelichtet sind.

In Abbildung 39C sind die Flussraten eines typischen Füllvorgangs aus der Logdatei der Pumpen gegen die Zeit aufgetragen, und in Teilabbildung D ist die zugehörige Bilderserie dargestellt. Während des manuell gesteuerten Füllens wurde die Strömung im Hauptkanal nicht gestoppt, da sonst Partikel in die Gegenrichtung drifteten und sich an der flussaufwärts liegenden Fritte F0 absetzten. Die Flussrate musste allerdings gedrosselt werden, damit sich die Partikel gleichmäßig an F1 verteilen. Gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Flussrate im Hauptkanal ca. 10 % der Flussrate aus dem Seitenkanal entsprach. Bei asymmetrischen Partikelverteilungen wurden die Flussraten bzw. ihr Verhältnis individuell angepasst, um eine geschlossene Schüttung mit möglichst gleichmäßiger Dicke zu erreichen.

Zuerst wurden die GOX-Partikel in den Reaktor gefüllt, damit herausgewaschenes GOX nicht flussabwärts an den HRP Partikeln bindet. Wegen des höheren Widerstands der sich füllenden Fritte F1, wurde hier wie in Abbildung 39C erkennbar nach 30 s die Flussrate der Substratlösung etwas erhöht. Dadurch wurde verhindert, dass die Partikel gegen die Kanalrichtung fließen und sich an F0 absetzen. Mit Pfeilen wurden einströmende Partikel markiert, die aber wegen der hohen Geschwindigkeit bei einer Belichtungszeit von 2 ms verschwimmen. Nach ca. 130 s war der Füllvorgang der GOX-Fritte abgeschlossen. Nach weiteren 20 s waschen wurde die Flussrate der GOX-Pumpe reduziert, und der Druck im Reaktor äquilibrierte sich neu.

Zum Befüllen von Fritte F2 wurde, wie in Abbildung 39C erkennbar, die Flussrate der HRP-Pumpe schrittweise erhöht. Hier bestand das Risiko, dass durch den steigenden Druck aus S2 die GOX-Partikel an F1 wieder fortgeschwemmt werden. Gleichzeitig wurden die Flussraten der beiden anderen Pumpen weiter erniedrigt, bis ab ca. 200 s die HRP Partikel einströmten. Der Füllvorgang war nach weiteren ca. 100 s abgeschlossen.

Um die beladene Fritte zu waschen und eventuell verbliebene Partikel und Enzyme aus den Zuläufen zu waschen, wurde bis 350 s weiter gepumpt. Anschließend wurde die HRP-Flussrate erniedrigt und dabei die Stabilität der Partikelschüttungen beobachtet. Die Flussrate des Substrats wurde auf $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ erhöht, während die Flussraten der Seitenkanäle unter Beobachtung der Schüttungen behutsam auf Null reduziert wurden. Unter den nun erreichten Anfangsbedingungen der eigentlichen Messung wurde das System noch weitere 5 min gewaschen und äquilibriert. Auf diese Weise konnten stabile Schüttungen der enzymbeladenen Partikel hergestellt werden.

In dieser Arbeit wurden auch Experimente mit nur einer beladenen Fritte durchgeführt, dazu wurde Seitenkanal S2 ebenfalls verschlossen, und das oben beschriebene Verfahren nur für F1 mit einer Spritze an S1 durchgeführt.

Im Rahmen einer Kooperation mit Mathematikern der Arbeitsgruppe von Prof. Turek (TU-Dortmund) entstanden Computational Fluid Dynamics (CFD) Simulationen zum Befüllen einer Fritte, die in Abbildung 40 dargestellt sind.^[131] Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, dass die Flussrate von unten (Q_u) für eine gleichmäßige Verteilung der Partikel etwa das zehnfache der Flussrate von rechts (Q_r) betragen sollte. Ein interessantes Ergebnis ist auch die Farbverteilung, die die unterschiedlichen lokalen Strömungsgeschwindigkeiten darstellt. Im Bereich zwischen den Frittenelementen wird die Lösung durch ein engeres Volumen gepresst. Nach dem Kontinuitätsgesetz erhöht sich dabei die Strömungsgeschwindigkeit. Auch der Seitenkanal hat einen reduzierten Durchmesser, so dass bei gleicher Flussrate $Q_u = Q_r$ hier eine höhere Strömungsgeschwindigkeit der eingeleiteten Partikelsuspension vorliegt. Die wachsende Schüttung verkleinert die Durchlässe der Fritten, so dass die Strömungsgeschwindigkeit hinter der Schüttung (gut erkennbar in Abbildung 40C) zunehmend inhomogener wird.

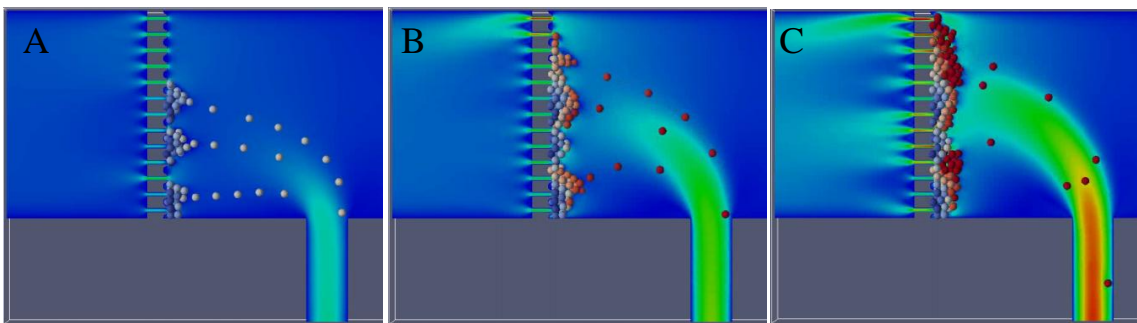


Abbildung 40: CFD-Simulation der Befüllung der Fritten mit zunehmender Flussrate. Die Flussrate von rechts $Q_r = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ wurde konstant gehalten. Die Flussrate von unten Q_u wurde gesteigert. **A:** $Q_u = 1 \mu\text{L}/\text{min}$, **B:** $Q_u = 2 \mu\text{L}/\text{min}$, **C:** $Q_u = 5 \mu\text{L}/\text{min}$. Die Strömungsgeschwindigkeiten sind durch Farben kodiert, dabei gilt blau < grün < gelb < rot.

Für die späteren Kinetikmessungen sollte sich eine geschlossene Schüttung bilden, die sich über den gesamten Kanal erstreckt, damit keine Lösung ohne Kontakt mit den Enzymen vorbeiströmen kann. Große Schüttungen erhöhen die Kontaktzeit und ermöglichen nahezu vollständigem Umsatz des eingesetzten Substrats. Kinetische Daten sind aber nur bei

niedrigen Umsätzen zuverlässig bestimmbar, deshalb erwiesen sich mittlere Schüttungen mit 200-600 Partikeln als ideal.

2.4.4 Quantifizierung der Partikelzahl einer Schüttung

Die Quantifizierung der Partikelzahl einer Schüttung erfolgte individuell anhand der Mikroskopiebilder. Da die Partikel nicht mehr vereinzelt vorlagen, sondern sich gepackt in 2-3 Schichten übereinander als Schüttung vor den Fritten ansammelten, war ein direktes Zählen der einzelnen Partikel nicht möglich. Deshalb erfolgte die Quantifizierung grafisch, indem aus der belegten Fläche über das Volumen der Partikel, der Packungsdichte und der Geometrie des Reaktors die Anzahl der Partikel abgeschätzt wurde.

In einer unendlichen Anordnung würde sich die dichteste Kugelpackung ausbilden, die eine Raumausfüllung von 74 % aufweist. Im Inneren des Mikroreaktors bildet sich idealerweise auch eine dichteste Kugelpackung aus, die aber in allen drei Dimensionen durch die Geometrie beschränkt wird. In Abbildung 41 ist eine Ebene der endlichen Kugelpackung skizziert. Die Breite des Kanals beträgt $b = 250 \mu\text{m}$. Entlang der Fritte passen bei einem Partikeldurchmesser von $10 \mu\text{m}$ also 25 Partikel nebeneinander was auf den Radius r_p bezogen einer Breite von $b = 50r_p$ entspricht. Für die Bestimmung der Länge wird zunächst der Abstand benachbarter Reihen a berechnet. Im dargestellten rechtwinkligen Dreieck gilt nach Pythagoras $(2r_p)^2 = r_p^2 + a^2$ und somit $a = \sqrt{4r_p^2 - r_p^2} = \sqrt{3} \cdot r_p$. Bei einer angenommenen Füllung von 11 Reihen ergibt sich für die Länge l :

$$l = 10a + 2r_p = 10r_p\sqrt{3} + 2r_p = 2r_p(1 + 5\sqrt{3}) \approx 19,3 r_p \quad (16)$$

Die Gesamtfläche A der Monoschicht beträgt damit

$$A = b \cdot l = 50r_p \cdot 2r_p(1 + 5\sqrt{3}) = 100r_p^2(1 + 5\sqrt{3}) \approx 966 r_p^2 \quad (17)$$

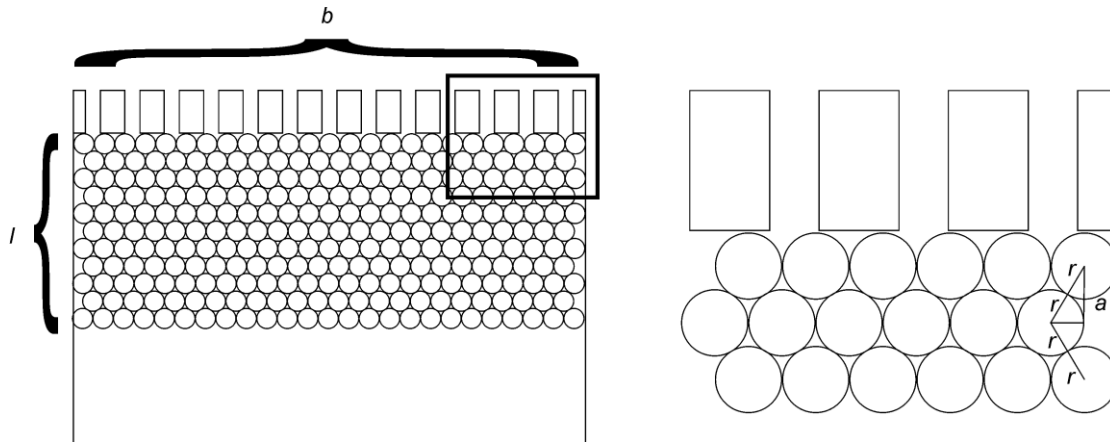


Abbildung 41: Herleitung der endlichen Kugelpackung in der Reaktorgeometrie

Die Höhe des Kanals beträgt $30 \mu\text{m}$. Bei der dreidimensionalen dichtesten Kugelpackung liegen die Kugeln der höheren Schichten immer in den Vertiefungen der darunterliegenden Schicht. 4 Schichten würden allerdings $36 \mu\text{m}$ benötigen, so dass nur 3 Lagen möglich sind mit einem Freiraum über der obersten Schicht. Dadurch kann die Schüttung als 3 übereinander liegende Monolagen von je 270 Partikeln vereinfacht beschrieben werden. Die Höhe beträgt dann $6r_p$ und das Volumen $V_{\text{Schüttung}} = 6r_p \cdot A$. Daraus kann schließlich nach Gleichung (18) die Packungsdichte bestimmt werden.

$$\frac{N \cdot V_{\text{Partikel}}}{V_{\text{Schüttung}}} = \frac{3 \cdot 270 \cdot \frac{4}{3}\pi \cdot r_p^3}{6r_p \cdot 100r_p^2 \cdot (1 + 5\sqrt{3})} = \frac{1080\pi}{5796} = 58,5 \% \quad (18)$$

Die Schüttung ist damit um fast 20 % geringer gepackt, als bei der dichtesten Kugelpackung. Der höhere Platzbedarf liegt vor allen in der Begrenzung auf drei Monoschichten und dem darüber liegenden nicht weiter füllbaren Raum.

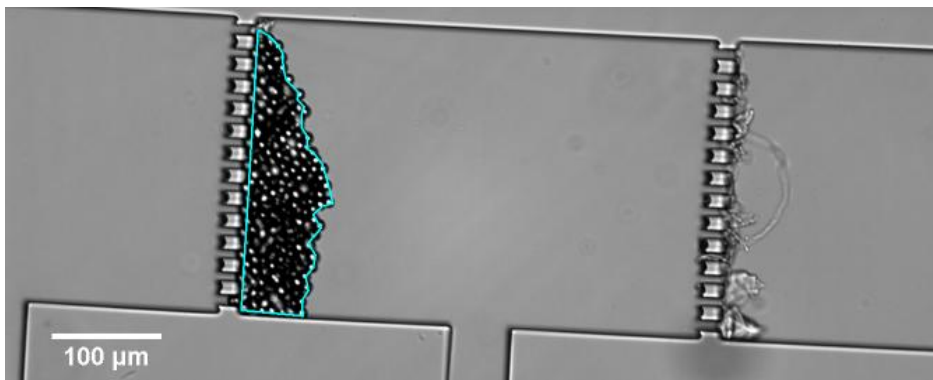


Abbildung 42: Bestimmung der von den Partikeln belegten Fläche A mit ImageJ, um daraus die Partikelzahl zu berechnen.

Aus den Mikroskopiebildern kann auf diese Weise nun die Partikelzahl bestimmt werden, was hier am Beispiel einer typischen Schüttung gezeigt wird. Mit der Software ImageJ wird in Abbildung 42 die von den Partikeln belegte Fläche $A_{Schüttung} = 12,9 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ vor der Fritte bestimmt.

Daraus kann nun auf umgekehrten Weg über Gleichung (18) die Partikelzahl bestimmt werden.

$$\frac{N \cdot V_{Partikel}}{V_{Schüttung}} = 58,5 \% \Rightarrow N = 58,5 \% \cdot \frac{h \cdot A_{Schüttung}}{V_{Partikel}} \quad (19)$$

Das Volumen eines Partikels ($r_p = 5 \mu\text{m}$) kann als Kugel angenommen werden:

$$V_{Partikel} = \frac{4}{3}\pi \cdot r_p^3 = 523,6 \mu\text{m}^3 \quad (20)$$

Einsetzen der Werts von $A_{Schüttung}$ und $V_{Partikel}$ aus Gleichung (20) in Gleichung (19) ergibt:

$$N = \frac{58,5\% \cdot 30\mu\text{m} \cdot A_{Schüttung}}{523,6 \mu\text{m}^3} = 0,0335 \cdot A_{Schüttung} = 432 \text{ Partikel} \quad (21)$$

Nach dieser Formel wurden die Partikelzahlen von 24 Schüttungen bestimmt, um sie statistisch zu validieren. Von ursprünglich 375 in den Reaktor injizierten Partikeln wurden durchschnittlich 365 ± 110 an den Fritten detektiert. Mit einer Abweichung von 3 % vom Erwartungswert ist die grafische Methode valide und kann zur Bestimmung der Partikelzahl eingesetzt werden.

Mit 433 Partikeln liegt dieses Beispiel 15 % über dem Erwartungswert, liegt aber innerhalb der Standardabweichung von 30 %. Diese Streuung um den Erwartungswert entsteht durch mögliche Fehlstellen der Schüttung, durch Absetzen von Partikeln im Einlass bzw. Seitenkanal sowie generelle Ungenauigkeiten, die beim Pipettieren von Suspensionen auftreten. Wegen der Standardabweichung von 30 % wurde die Partikelzahl für jedes einzelne Experiment quantifiziert.

2.5 Mikrofluidik mit HRP-funktionalisierten Partikeln

Die Schüttungen der enzymfunktionalisierten Partikeln wurden nun zur Messung von Kinetik in der Mikrofluidik eingesetzt. Zuerst wurden Experimente mit dem immobilisierten Reporterenzym HRP durchgeführt, da die Konzentration des fluoreszenten Produkts

Resorufin mit einem Fluoreszenzmikroskop direkt am Entstehungsort orts- und zeitaufgelöst gemessen werden konnte.

Im Vergleich zur Mikrotiterplatte entspricht in der Mikrofluidik die Reaktionszeit der Kontaktzeit der Substrate mit den Partikeln. Diese kann aus dem Zwischenraumvolumen und der Flussrate berechnet werden. Aus der Konzentrationsänderung und der Kontaktzeit kann dann die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit berechnet werden.

Interessanter ist aber, die Konzentrationsänderungen nach verschiedenen Reaktionszeiten zu bestimmen. Dazu muss entweder die Dicke der Schüttung oder die Flussrate verändert werden. Die Dicke bzw. Partikelzahl der Schüttungen ließ sich nicht gut regulieren. Jedoch ließen sich verschiedenen Flussraten einfach mit den Pumpen programmieren. Bei langsamen Flussraten wird die Kontaktzeit länger und es sollte, gerade bei niedrigen Substratkonzentrationen, zu merklichen Verbrauch des Substrats kommen, was wiederum die Reaktionsgeschwindigkeit verringert. Diese Experimente werden in Abschnitt 2.5.3 diskutiert.

Ein weiteres Ziel war, im mikrofluidischen Reaktor auch die kinetischen Parameter nach Michaelis Menten zu bestimmen. Wie in der Mikrotiterplatte musste dafür die Konzentration der Substrate variiert werden. Diese Experimente werden in Abschnitt 2.5.3.3 diskutiert.

2.5.1 Experimente mit konstanter Flussrate und konstanter Konzentration

Um die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich Signalstärke und Stabilität zu finden, wurde zunächst mit konstanter Flussrate und konstanter Substratkonzentration gemessen. Der Aufbau des Experiments ist in Abbildung 43 schematisch dargestellt. Die HRP-beladenen Partikel wurden wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben über den Seitenkanal S1 in den Reaktor geleitet und bildeten eine stabile Schüttung an F1.

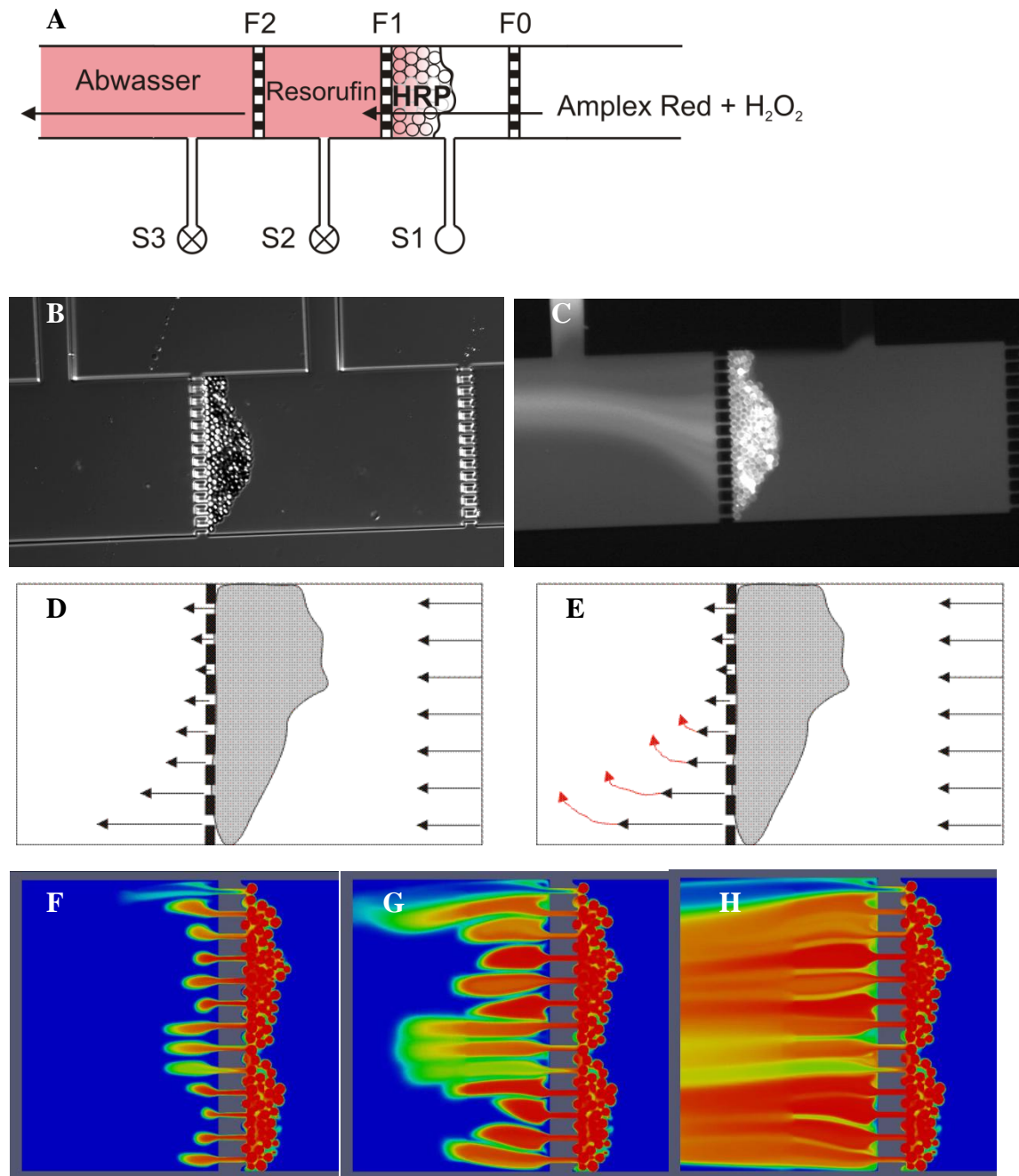


Abbildung 43: **A:** Anschlusschema der Experimente mit HRP-funktionalisierten Partikeln in der Mikrofluidik. Der Reaktor wurde wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben durch S1 befüllt. Durch den Hauptkanal wird Substratlösung geleitet, die beim Durchqueren der Schüttung zu fluoreszente Resorufin umgesetzt wird. (vgl. Reaktionsschema in Abbildung 10, Seite 26) **B:** Lichtbild der Schüttung **C:** Fluoreszenzbild der Reaktion von immobilisiertem bHRP mit H₂O₂ / Amplex Red bei $Q = 0,2 \mu\text{L}/\text{min}$. **D - E:** Schematische Darstellung der Strömungsgeschwindigkeiten nach Durchqueren der Fritte. **F - H:** CFD-Simulation der Reaktion der Partikel mit der Substratlösung bei $Q = 0,2 \mu\text{L}/\text{min}$ nach 20; 70 und 500 ms. Die Resorufinkonzentration ist farblich codiert: blau < grün < gelb < rot.

Abbildung 43 zeigt die Aufnahmen des Reaktors im Durchlicht (B) und Fluoreszenzlicht (C). Im Bereich hinter der Fritte wird das fluoreszente Produkt Resorufin deutlich sichtbar, welches von HRP an der Fritte produziert wird (A). Die enzymbeladenen Partikel konnten damit erfolgreich in den mikrofluidischen Reaktor injiziert werden und zeigten die erwartete Funktionalität. Sowohl die Partikel, als auch die Fluoreszenzentwicklung waren durch das Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Durch den kontinuierlichen Fluss entstand eine Fahne aus frisch gebildetem Resorufin, die von den Partikeln wegtransportiert wurde. Aufgrund der unregelmäßigen Verteilung der Partikel an der Fritte kam es zu unterschiedlichen Durchströmungsgeschwindigkeiten, so dass im unteren Bereich der Fritte eine größere Flussrate herrschte als in der Mitte. Wegen des Kontinuitätsprinzips wurde der stärker fluoreszente Bereich nach oben verdrängt (Abbildung 43D und E). Damit der Widerstand und die Kontaktzeit über die gesamte Partikelschüttung gleich sind, wurde in weiteren Experimenten durch manuelles Steuern des Füllvorgangs eine gleichmäßigere Verteilung der Partikel realisiert.

Abbildung 43F – H zeigt die Ergebnisse der Computational Fluid Dynamic (CFD) Simulation der Reaktion, die ebenfalls im Rahmen der Kooperation mit Prof. Turek entstand.^[131] Die Schüttung entspricht der bereits in Abbildung 40 diskutierten simulierten Schüttung. Die enzymkatalysierte Reaktion auf der Partikeloberfläche wurde dabei vereinfacht als Wärmeübertragung von kugelförmigen Wärmequellen auf die umströmende Lösung modelliert. Die Bilder bestätigen, dass in Bereichen niedriger Partikelzahlen aufgrund des geringeren Widerstandes höhere Flussraten entstanden, erkennbar an den längeren „Fahnen“ in Teilabbildung G. Gleichzeitig kam die Lösung mit weniger Partikeln in Kontakt, so dass geringere Konzentrationen resultierten. Nach 500 ms waren die Streifenmuster der Fritte weiterhin erkennbar. Besonders die hellen Fahnen blieben unverändert, was bedeutet, dass nahezu keine makroskopische Vermischung durch Diffusion in diesem Zeitfenster stattfand.

Zusätzlich wurde die zeitliche Fluoreszenzentwicklung untersucht, um Aussagen über die Stabilität des Systems zu treffen. Fluoreszenzbilder ausgewählter Zeitpunkte einer Messung mit einer größeren Schüttung unter konstanter Flussrate und konstanter Substratkonzentration sind in Abbildung 44 dargestellt.

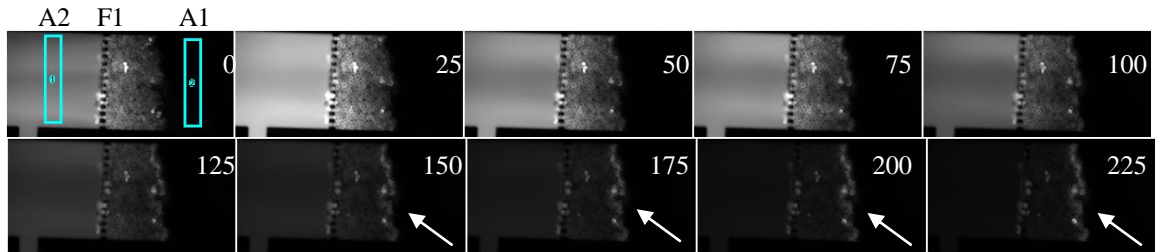


Abbildung 44: Serie von Fluoreszenzbildern der HRP-beladenen Fritte zu Beginn und nach 25, 50, 75 etc. Minuten, Zeiten in den Bildern angegeben. Die Auswertungsbereiche A1 und A2 für die quantitative Auswertung sind durch die Rahmen im ersten Bild markiert. $H_2O_2 = 50 \mu M$, $Ax = 20 \mu M$ in KPI300, $Q = 0,2 \mu L/min$.

Der Mikroreaktor in Abbildung 44 enthielt mehr Partikel, als das in Abbildung 43 gezeigte Beispiel. Zudem waren die Partikel gleichmäßiger verteilt und füllten die gesamte Kanalbreite aus. Dadurch entwickelte sich die Fluoreszenz gleichmäßiger als in Abbildung 43, allerdings auch nicht homogen. In der Mitte des Kanals war die Intensität geringer, was vermutlich an einer höheren Flussgeschwindigkeit in der Mitte des Kanals liegen könnte.

Mit der Zeit nahm die Intensität aufgrund von Alterungserscheinungen ab, auf die bei der quantitativen Auswertung näher eingegangen wird. Außerdem waren hell leuchtende Flecken zwischen den Partikeln erkennbar, wobei es sich vermutlich PDMS-Trümmer vom Einstechen der Seitenkanaleinlässe handelt. Interessant ist auch, dass sich ab etwa 150 min die mit Pfeilen markierte schwach leuchtende Front an den Partikeln ausbildete. Dieser Effekt wurde häufiger bei Langzeitexperimenten beobachtet. Hierbei könnte es sich um Bakterien handeln, die von der Schüttung herausgefiltert werden.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der beiden markierten Flächen A1 und A2 wurde mit ImageJ für jedes Bild bestimmt. Mit Hilfe der Kalibrierkurve (Abbildung 86, Anhang) konnten die Intensitäten nun in die Resorufinkonzentration umgerechnet werden. Diese wurden in Abbildung 45 gegen die Zeit aufgetragen.

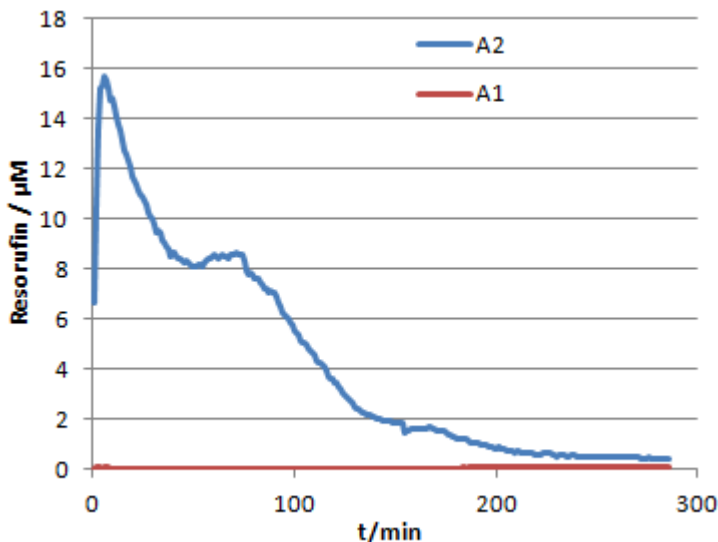


Abbildung 45: Auftragung der mittleren Resorufinkonzentration vor und nach der Reaktion mit der HRP-beladenen Fritte gegen die Zeit. Die Konzentrationen wurden aus der mittleren Fluoreszenzintensität der markierten Auswertungsbereichen in Abbildung 44 über die Kalibrierkurve berechnet. Bedingungen: 50 μM H_2O_2 , 20 μM Amplex Red, konstante Flussrate $Q = 0,2 \mu\text{L}/\text{min}$.

Im Bereich vor der HRP-beladenen Fritte (A1) konnte erwartungsgemäß keine signifikante Resorufinkonzentration gemessen werden. Hinter der Schüttung (A2) war ein deutliches Signal messbar. Dies zeigt, dass Resorufin ausschließlich durch die HRP-Enzyme produziert wurde. Die Konzentration in A2 ist stark zeitabhängig, obwohl mit konstanter Flussrate gepumpt wurde und die Bedingungen während des gesamten Experiments gleich waren. Die Kurve beginnt bei ca. 6,5 μM , steigt steil auf knapp 16 μM und nimmt daraufhin exponentiell mit zwei Sattelpunkten ab.

Der erste steile Anstieg lässt sich durch nicht ausreichende Spülung des Reaktors mit der Substratlösung vor Start der Bilderserie erklären. Einige Minuten später war der Pufferaustausch aber abgeschlossen und das Maximum der Kurve erreicht. Es wurden fast 16 μM Resorufin produziert, was bezogen auf die eingesetzten 20 μM Amplex Red einen Umsatz von fast 80 % entspricht. Die Enzyme reagierten aber nicht konstant. Bis auf einen Sattelpunkt nach ca. 80 min nahm die Resorufinkonzentration von nun an kontinuierlich ab. Der Sattelpunkt könnte durch einen Temperaturanstieg in der Inkubationskammer des Mikroskops (Abbildung 38) erklärt werden. Durch Abwärme des Mikroskops und der Lichtquelle erwärmte sie sich stärker als die Umgebungsluft und führte zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Abnahme der Lebensdauer der Enzyme. In

Folgeexperimenten wurde deshalb ein Thermostat für die Inkubationskammer verwendet. Eine aktive Kühlung war gerätebedingt nicht möglich, deshalb wurde als Temperatur 25 °C eingestellt, die bei Raumtemperaturen von 19 – 23 °C gut gehalten werden konnte, in den Sommermonaten aber teilweise zu leicht erhöhten Temperaturen (26-27 °C) führte.

Aus dem Diagramm ließ sich eine Halbwertszeit von ca. 30 bis 40 min ablesen, was für weitere Experimente nicht ausreichend war. Deshalb wurden in Abschnitt 2.5.2 zunächst die Ursachen für die schnelle Alterung gesucht und durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und des Handlings eine längere Halbwertszeit angestrebt.

2.5.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die in Abschnitt 2.5.1 beobachteten niedrigen Halbwertszeiten haben vier Hauptursachen: Die lange Dauer des Experiments, die regelmäßige Belichtung, die Reaktivität des H₂O₂ und die kontinuierliche Strömung, die sich negativ auf die drei an der Reaktion beteiligten Komponenten (Enzyme, STV-beschichteten Partikel und Substrate) auswirken. In den folgenden Kontrollmessungen wurden diese Einflüsse quantifiziert.

Die **Strömung** wurde untersucht, in dem ein beladener Mikroreaktor bei hohen Flussraten mit 250 µL KPi300 Puffer gewaschen wurde. Die Analyse des Ausflusses zeigte, dass vor allem in der Anfangsphase Enzyme herausgespült wurden (Abbildung 87 im Anhang). Die anschließend mit $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ gemessene Aktivität der gewaschenen Schüttung lag aber in der gleichen Größenordnung des in Abbildung 45 gezeigten Experiments und nahm mit einer Halbwertszeit von etwa 20 min ab. Das ausgiebige Waschen der Schüttung führte also zu leichten Verlusten von Enzymen, aber die starke Abnahme im anschließenden Experiment musste andere Ursachen haben.

Die Stabilität von verdünnten Enzymlösungen wurde in verschiedenen **Puffern** (KPi300 und TBS) und mit Zusatz von BSA und HS-DNA in der Mikrotiterplatte untersucht (Abbildung 88 im Anhang). Ohne Zusätze betrug die Aktivität bereits nach 30 min nur noch Bruchteile der Ausgangsaktivität. Durch den Zusatz BSA und HS-DNA war über 170 min keine signifikante Abnahme der Aktivität messbar. In der Mikrofluidik war jedoch vermehrt der Eintrag von Verunreinigungen und Bakterienwachstum erkennbar, was die Fritten zusetzte. Aus diesen Gründen wurde der frisch angesetzte Puffer mit einem 0,4 µm

Sterilfilter filtriert, aliquotiert und eingefroren. Der neue Puffer wird im Folgenden mit KPi300BDF (KPi300 + BSA, DNA, filtriert) abgekürzt.

Ein Test der **Stabilität** von bHRP, H₂O₂ und Amplex Red zeigte, dass die Einzelkomponenten in KPi300BDF für 6 h stabil waren (Abbildung 89 im Anhang). Es kam also weder zu unspezifischer Alterung, noch zu Reaktionen mit den Pufferkomponenten BSA oder HS-DNA. Auch die Kombinationen waren stabil, nur die gleichzeitige Inkubation von H₂O₂ mit HRP führte zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität um ca. 32 %, die auch in der Literatur beschrieben ist.^[132]

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der **H₂O₂-Konzentration** auf die Stabilität von bHRP in der Mikrotiterplatte untersucht (Abbildung 90 im Anhang). Mischungen mit < 30 µM waren für die untersuchten 400 min stabil. Bei 100 µM nahm die Aktivität um 20 % ab, was einer Halbwertszeit von 1240 min entspricht. Bei 300 µM verkürzte sich die Halbwertszeit auf 460 min. Die H₂O₂-Konzentration in der Mikrofluidik sollte demnach 30 µM nicht übersteigen. Das entspricht nur 3 % der vom Hersteller für den „Amplex Red Assay“ empfohlenen Konzentration von 1 mM,^[133] welche in den Kinetikuntersuchungen in der Mikrotiterplatte in Abschnitt 2.1.2.2 eingesetzt wurden.^[132]

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die **Belichtung** des Reaktors und der Zuleitungen die Stabilität von bHRP und den Edukten beeinflusst. Dazu wurden die Einzelkomponenten, sowie die jeweiligen Mischungen im Strahlengang des Mikroskops dauerhaft für ca. 2,5 h bestrahlt (Abbildung 91 im Anhang). Die intensive Belichtung führte bei allen Amplex Red haltigen Proben zu steigender Fluoreszenz, die durch photochemische Oxidation zu Resorufin verursacht wurde. Durch Spuren von Resorufin oder HRP kann diese sogar verstärkt werden.^[134, 135]

Die dadurch erniedrigte Amplex Red Konzentration führte im anschließenden Kinetikexperiment zu geringeren Aktivitäten. Alle anderen Komponenten (bHRP und H₂O₂) wurden durch die Belichtung nicht beeinflusst und zeigten keine Änderung der Aktivität. Die Fluoreszenzbilder sollten deshalb mit möglichst kurzen Belichtungszeiten und großen Zeitintervallen aufgenommen werden.

In Tabelle 7 sind die Probleme und Gegenmaßnahmen bzw. Optimierung noch einmal zusammenfassend dargestellt. Unter diesen optimierten Bedingungen wurden die weiteren Experimente durchgeführt.

Tabelle 7: Optimierung der Reaktionsbedingungen

Problem	Lösung
Enzym oder STV albert unspezifisch	<ul style="list-style-type: none"> • Zusatz von BSA und HS-DNA zum Puffer • steril filtrierter Puffer • Konstante Temperatur von 25 °C • Flussprofile möglichst kompakt, um kurze Experimentzeiten zu realisieren
Enzym oder STV wird desorbiert	<ul style="list-style-type: none"> • möglichst niedrige Flussraten
Enzym wird oxidiert oder deaktiviert	<ul style="list-style-type: none"> • möglichst geringe H₂O₂-Konzentration • H₂O₂ erst in Reaktor generieren
Amplex Red photolabil	<ul style="list-style-type: none"> • kurze Belichtungszeit • 30 s Zeitintervall • Ummanteln des Zuleitungsschlauchs
Aufwirbeln der Partikel → Verluste	<ul style="list-style-type: none"> • Kein Austausch von Schläuchen bzw. Spritzen, sondern Einsatz von Ventilen • Konzentrationen über Y-Stück einstellen • Sanfte Flussratenwechsel

2.5.3 Variation der Flussrate

Unter den optimierten Bedingungen wurden weitere Experimente mit bHRP im Mikroreaktor durchgeführt. Da die Enzyme nun längere Lebensdauern hatten, konnte während des Experiments die Flussrate stufenweise variiert werden.

Für Kinetikmessungen nach Michaelis Menten musste auch die Substratkonzentration variiert werden. Zum Einstellen der Konzentration während des Experiments stand nur ein Y-Stück im Zulaufschlauch zur Verfügung, das aber wegen des großen Totvolumens und damit einher gehenden langen Misch- und Transportzeiten für H₂O₂ nicht praktikabel war.

Deshalb wurde bHRP in Experimenten mit variabler Flussrate, aber unter konstanter H₂O₂-Konzentration gemessen. In einer Serie dieser Experimente wurde schließlich die H₂O₂-Konzentration variiert, um die Kinetik nach Michaelis Menten auswerten zu können.

2.5.3.1 Das Flussratenprofil

Die Experimente mit bHRP-beladenen Partikeln erfolgten nach dem in Abbildung 46A skizzierten Fließschema. Teilabbildung B zeigt die während der Messung einstellte Flussrate durch den Hauptkanal.

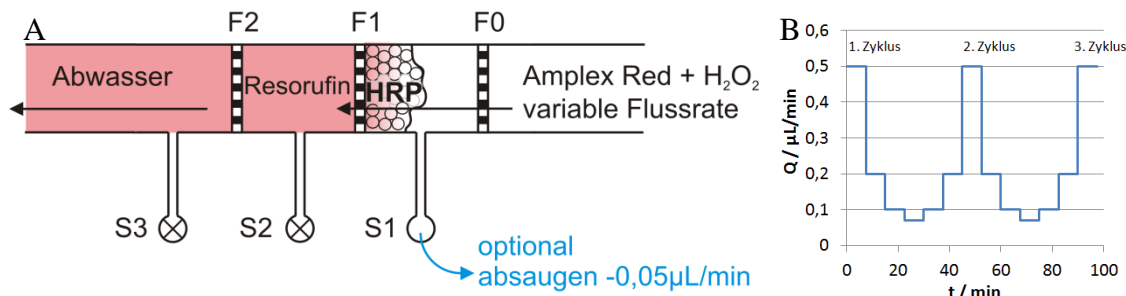


Abbildung 46: **A:** Fließschema für die Kinetikmessungen mit bHRP funktionalisierten Partikeln mit variabler Flussrate in der Mikrofluidik. Bei den optimierten Messungen wurde während des gesamten Experiments kontinuierlich durch den Seitenkanal S1 abgesaugt (vgl. Text). **B:** Darstellung des Flussratenprofils. Ein Zyklus bestand aus sechs Stufen konstanter Flussrate $Q = 0,5; 0,2; 0,1; 0,07; 0,1; 0,2 \mu\text{L}/\text{min}$. Jede Stufe dauerte 7,5 min.

Die Flussrate wurde stufenweise von $Q = 0,5$ bis $0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ und zurück variiert. Während jeder Stufe konnte sich das System stabilisieren bis schließlich konstante Werte erhalten wurden. Noch niedrigere Flussraten führten zu starkem Rauschen verursacht durch den Schrittmotor der Pumpe, und die Resorufinproduktion stabilisierte sich nicht genügend. Höhere Flussraten erwiesen sich auch als nicht praktikabel, da durch die kürzere Kontaktzeit nur wenig Substrat umgesetzt wurde, gleichzeitig aber der Verbrauch (Spritzenvolumen $500 \mu\text{L}$) unverhältnismäßig anstieg. Die Flussratenstufen wurden in abfallender und aufsteigender Abfolge gemessen, um Artefakte durch nicht endgültig stabilisierte Flussraten zu mitteln.

Die Länge der Stufen wurde möglichst kurz gehalten, damit das System wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben nur wenig altert. Dadurch wurde die Gesamtzeit der Experimente kürzer bzw. es waren mehr Zyklen mit der Substratlösung einer Spritzenfüllung möglich.

Ein großer Nachteil der Stufen war aber, dass jeder abrupte Wechsel der Flussrate zu instabilen Signalen führte. Verursacht durch die Druckschwankungen beim Flussratenwechsel kam es zum Eintritt von fluoreszentelem Resorufin aus dem Seitenkanal in den Hauptkanal. Ein Beispiel ist in Abbildung 47 gezeigt.

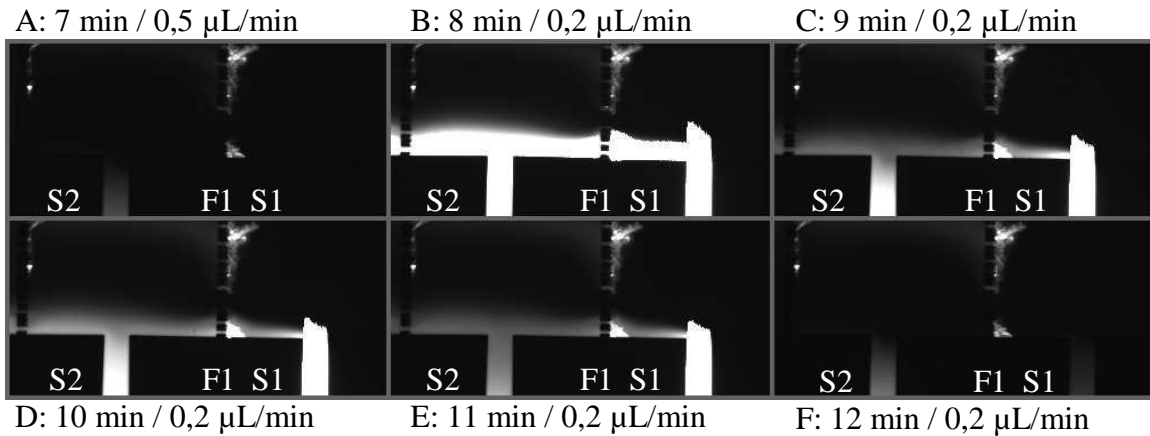


Abbildung 47: Serie von Mikroskopiebildern während des Flussratenwechsels von $Q = 0,5$ auf $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$ nach 7,5 min des Flussratenprofils aus Abbildung 46B. **A:** $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$, **B-F:** $Q = 0,2 \mu\text{L}/\text{min}$.

In A ist lediglich der Seitenkanal S2 leicht fluoreszent. Hinter den ungleichmäßig angeordneten Partikeln an der Fritte ist bei der Flussrate $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ nur ein schwaches Signal erkennbar. Die Erniedrigung der Flussrate auf $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$ senkte den Druck im Reaktor, so dass in B ein hell leuchtender Schwall aus beiden Seitenkanälen S1 und S2 in den Hauptkanal strömte. Bei S1 war der Detektor sogar überstrahlt, so dass die benachbarten Pixel über S1 ebenfalls als hell leuchtend angezeigt wurden. Während der beobachteten 5 min nahm die Fluoreszenz im Hauptkanal wieder ab. Bei niedrigeren Flussraten dauerte der Abtransport des Seitenkanalergusses teilweise länger als die Dauer einer Stufe, nicht gezeigt.

Das starke Signal aus dem Seitenkanal überdeckte fast den Effekt, der gemessen werden sollte: In Teilabbildung A und B nahm die Fluoreszenz im oberen Bereich hinter der Fritte zu. Durch Erniedrigung der Flussrate stieg die Kontaktzeit und es konnte mehr Resorufin produziert werden.

Erklärt werden kann dieses Störung durch drei Transportprozesse:

- 1) Unabhängig von der Strömung erfolgte ein Austausch zwischen Haupt- und Seitenkanal passiv durch Diffusion.
- 2) An Knotenpunkten traten in fluidischen Systemen hydrodynamische Effekte auf, die ebenfalls zu einem Austausch führen.
- 3) Bei Flussratenwechseln änderte sich der Druck im Mikroreaktor und in den Seitenkanälen schlagartig. Die Schläuche und das Silikon des Reaktors waren jedoch elastisch, so dass sich das Material entsprechend ausdehnte oder komprimierte. Bei einer Druckerhöhung erhöhte sich das Volumen und es gelangt

mehr Lösung in die Seitenkanäle. Umgekehrt strömte bei einer Druckerniedrigung Lösung aus den Seitenkanälen in den Hauptkanal. Bei eingeschlossenen Luftblasen in den Seitenkanälen verstärkte sich dieser Effekt noch, da Luft stark komprimierbar ist. Dieses Phänomen wird in der Literatur als **Fluidische Kapazität** bezeichnet.^[42]

Alle drei Effekte führten dazu, dass Substratlösung in die Seitenkanäle gelangte. In S1 lagen aber noch Spuren des eingeleiteten Enzyms vor. Da dort während der Stufen konstanter Flussrate keine Nettoströmung vorlag, war die Verweilzeit in der Größenordnung der Dauer der Stufen, so dass bereits geringste Mengen bHRP ausreichten, um die Produktion signifikanter Mengen Resorufin zu katalysieren. Das sich anreichernde fluoreszente Resorufin führte bei Druckerniedrigungen zu eruptiven Ergüssen in den Hauptkanal und überlagerte das an der Fritte gebildete Resorufin.

Grundsätzlich musste sichergestellt werden, dass die Seitenkanäle frei von Enzym waren, was durch gründliches Waschen nach dem Befüllen und durch Zusatz von blockend wirkender DNA und BSA im Puffer erreicht werden konnte. Weiterhin musste, wie schon in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, absolut blasenfrei gearbeitet werden. Waren Blasen in den Seitenkanälen oder den Einlässen verborgen, führte die Druckabnahme zu einer Volumenzunahme und die Seitenkanäle bluteten aus.

Als Lösung des Problems wurden zwei Strategien entwickelt. Eine Strategie war ein stufenloses abgerundetes Flussratenprofil. Wenn die Flussrate langsam, aber quasi kontinuierlich in kleinsten Schritten verändert wird, kann das System ständig die minimalen Druckschwankungen ausgleichen und es kommt nicht mehr zu den plötzlichen Ausbrüchen aus den Seitenkanälen. Diese Methode wurde bei den Messungen mit bGOX in Abschnitt 2.6.2 angewendet.

Bei den bHRP-Messungen wurde eine zweite Strategie verfolgt, um die Strömung im Hauptkanal zu stabilisieren. Während des Experiments wurde, wie in Abbildung 46A in blau skizziert, kontinuierlich Substratlösung durch den Seitenkanal S1 mit einer Flussrate von $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ aus dem Reaktor gesaugt. Dadurch wurde das Ausbluten des Seitenkanals verhindert, und es wurden insgesamt stabilere Signale erhalten. Zum Ausgleich wurden die Flussraten der Substratlösung entsprechend um $+0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ erhöht ($Q = 0,12 -$

0,55 $\mu\text{L}/\text{min}$), so dass in der Schüttung wieder Flussraten von $Q = 0,07 - 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ vorherrschten.

Mit diesem optimierten Flussratenprofil wurden nun mikrofluidische Experimente mit bHRP-funktionalisierten Partikeln bei verschiedenen konstanten H_2O_2 -Konzentrationen durchgeführt. Für eine spätere Auswertung nach Michaelis Menten wurde die konstante H_2O_2 -Konzentration in zahlreichen Einzelexperimenten über einen großen Bereich variiert. Dabei wurden auch größere Konzentrationen eingesetzt, bei denen es, wie in Abschnitt 2.5.2 diskutiert, zur Deaktivierung der Enzyme kommt.

2.5.3.2 Mikrofluidikexperimente mit HRP mit 100 μM H_2O_2

Die Experimente mit bHRP in der Mikrofluidik erfolgten in mehreren Einzelexperimenten (E1, E2 etc) mit konstanten Substratkonzentrationen mit dem in Abschnitt 2.5.3.1 beschriebenen optimierten Flussratenprofil. Da diese Daten später als Referenz für die Enzymkaskade mit GOX dienen sollten, wurde zweckmäßigerweise die H_2O_2 -Konzentration variiert. Für eine valide Auswertung nach Michaelis Menten war ein großer Konzentrationsbereich erforderlich, so dass hier mit 100 μM H_2O_2 begonnen wurde. Die H_2O_2 -Konzentration war damit höher, als in Abschnitt 2.5.2 diskutiert und schädigte die Enzyme. Niedrigere H_2O_2 -Konzentrationen wurden in weiteren Experimenten gemessen und werden in Abschnitt 2.5.3.3 diskutiert.

Ausgewählte Bilder der Messungen sind in Abbildung 48 gezeigt. Es handelt sich jeweils um das letzte Bild einer Stufe mit konstanter Flussrate.

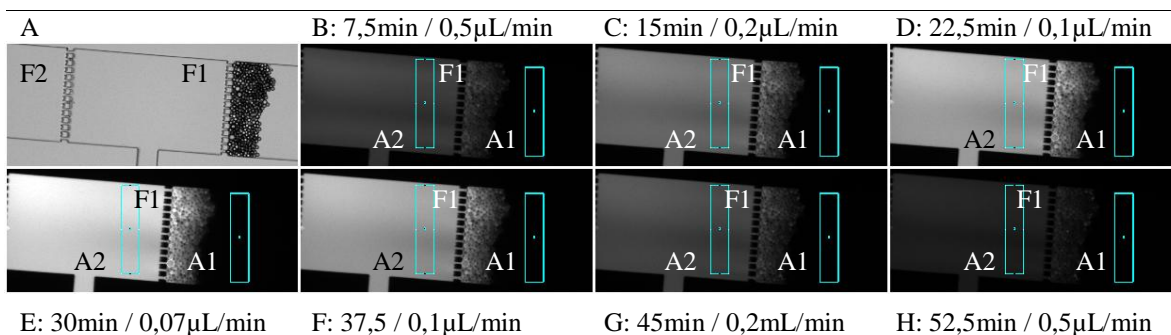


Abbildung 48: Bildserie der Reaktion von bHRP mit 100 μM H_2O_2 und 100 μM Amplex Red in der Mikrofluidik bei verschiedenen Flussraten. **A**: Durchlichtbild der Schüttung vor dem Experiment. **B**:- Die Bilder zeigen die Fluoreszenz jeweils vor Wechsel der Flussrate. Die angegebenen Werte nennen den Zeitpunkt im Reaktionsverlauf und die zugehörige Flussrate. Die Fluoreszenzintensität wurde in den Auswertungsbereichen A1 und A2 mit ImageJ bestimmt.

Im Mikroskopiebild (A) ist eine gleichmäßige Partikelschüttung erkennbar. Nach der in Abschnitt 2.4.4 hergeleiteten Gleichung (19) ergab sich aus der belegten Fläche eine Zahl von 760 Partikeln. Die Fluoreszenzbilder zeigen, dass die Lösung beim Durchqueren der Schüttung zu fluoreszieren begann. Die Intensität war von der Flussrate abhängig. Eine quantitative Auswertung der Bereiche A1 und A2 erfolgte mit Hilfe der in Abbildung 86 (Anhang) gezeigten Kalibrierkurve. Die damit aus der Fluoreszenzintensität berechneten Resorufinkonzentrationen [Res] sind in Abbildung 49 dargestellt.

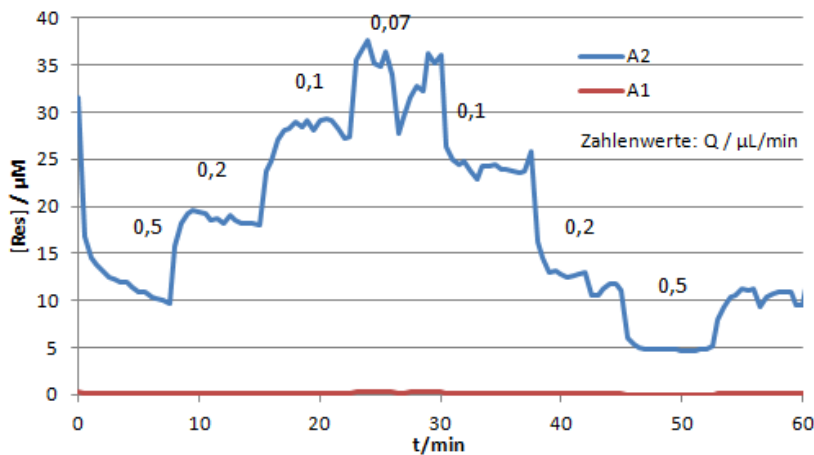


Abbildung 49: Quantitative Auswertung der in Abbildung 48 markierten Bereiche A1 und A2 während des ersten Zyklus der Mikrofluidik mit HRP-funktionalisierten Partikeln ($100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ und $100 \mu\text{M Amplex Red}$, 2 Bilder/min). Aufgetragen ist die Resorufinkonzentration [Res] gegen die Zeit t .

Die Variation der Flussrate lieferte gut erkennbare Stufen. Langsame Flussraten erlaubten längere Kontaktzeiten und führten somit zu höheren Umsätzen. Mit ca. $36 \mu\text{M}$ lagen die Konzentrationen noch im linearen Bereich der Kalibrierkurve (Abbildung 86, Anhang). Bei der niedrigsten Flussrate $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ war das Signal instabil, und es kam während des Plateaus zu einem Einbruch des Umsatzes. Während des insgesamt dreistündigen Experiments kam es nur zweimal bei Flussratenverringerungen zu leichten Fluoreszenzergüssen aus dem ersten Seitenkanal (vgl. Abschnitt 2.5.3.1), die aber bei einer Rate von 2 Bilder/min jeweils auf nur einem isolierten Bild erkennbar waren und damit maximal 59 s anhielten, vermutlich sogar wesentlich kürzer. Die minutenlangen Störsignale wie in Abbildung 47 konnten also durch das kontinuierliche Absaugen verhindert werden.

Die Fluoreszenz in A1 war durchweg sehr gering und lag in der Größenordnung von 0,7 % des Signals. Die Reaktion fand also ausschließlich an der beladenen Fritte statt. Die

kurzen Belichtungszeiten von 20 ms bei einem Zeitintervall von 30 s führten also, anders als in Abschnitt 2.5.2 bei dauerhafter Bestrahlung beobachtet, nicht zu unspezifischer Oxidation von Amplex Red zu Resorufin im Zulauf.

Durch Subtraktion der Hintergrundkonzentration konnte der Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ bestimmt werden. Zusammen mit den Ergebnissen von drei weiteren unabhängigen Experimenten (E1, E2, etc.) in jeweils neu befüllten Reaktoren sind die Kurven in Abbildung 50 dargestellt. Die bisher oben diskutierten Bilder wurden dem 1. Zyklus ($t = 0 - 60 \text{ min}$) von E3 entnommen.

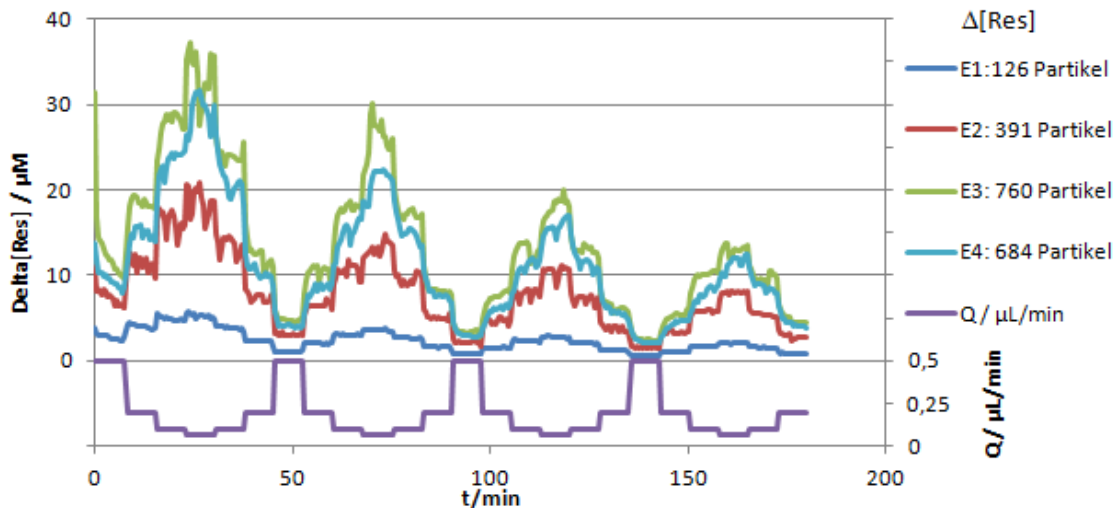


Abbildung 50: Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ der Reaktion von bHRP-beschichteten Partikeln in der Mikrofluidik mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 und $100 \mu\text{M}$ Amplex Red bei variabler Flussrate Q . Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten. In der Legende sind die Partikelzahlen N für jedes Experiment (E1, E2 etc.) angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil die Flussrate Q auf der rechten Achse aufgetragen.

Wie in Abschnitt 2.4.3 diskutiert, unterlag die Partikelzahl N einer großen Streuung, so dass jedes Experiment mit unterschiedlicher Partikelzahl durchgeführt wurde. Dadurch konnte der Einfluss der Partikelzahl auf den Resorufinumsatz untersucht werden. Sie wurde deshalb wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben aus den Mikroskopiebildern grafisch bestimmt und ist in der Legende für jede Serie von Experimenten angegeben. E1, E2 und E3 weisen ein Partikelverhältnis von ca. 1:3:6 auf, was sich proportional auf die zugehörigen Umsätze auswirkt. Große Partikelzahlen bildeten große Schüttungen und verlängerten damit die Kontaktzeit mit den immobilisierten Enzymen, was zu größeren Umsätzen führte.

Wie schon bei Abbildung 49 diskutiert, führte die Variation der Flussrate zur stufenweisen Änderung des Umsatzes. Niedrige Flussraten führten zu längeren Kontaktzeiten und damit zu höheren Umsätzen. Die größten Werte wurden entsprechend bei der höchsten

Partikelzahl (Kurve 3) und der langsamsten Flussrate ($Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$) erreicht. Der Umsatz von ca. $36 \mu\text{M}$ Resorufin entsprach dem Verbrauch von 36 % der eingesetzten Substrate.

Alle Kurven zeigten ein Rauschen, das bei langsamen Flussraten stärker wurde. Je größer die Flussrate, desto größer war der Druck im Reaktor. Bei niedrigeren Flussraten war der Druck geringer und es kam zu stärkeren Druckschwankungen und Turbulenzen an den Kreuzungen. Außerdem entstanden bei Flussratenwechseln Druckunterschiede zwischen Haupt- und Seitenkanal, die sich zu Beginn jeder Stufe äquilibrierten.

Da die Aktivität von HRP in Anwesenheit von H_2O_2 allerdings nicht über die Dauer des Experiments konstant war, wurde der 45-minütige Flussratenzyklus insgesamt viermal durchlaufen, um daraus die Lebensdauer des Systems abzuschätzen.

Der Umsatz nahm besonders zu Beginn des Experiments überproportional ab. Wie schon in Abschnitt 2.5.2 diskutiert, wurde die Fluoreszenzkammer bereits 30 min vor Beginn des Experiments temperiert und die Fluoreszenzlampe mindestens 10 min vorher angeschaltet, so dass diese Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten. Vermutlich wurden in der Anfangsphase unspezifisch oder nur schwach gebundene Enzyme weggewaschen, und das System konnte sich äquilibrieren. Die Abnahme des Umsatzes ist bereits im 1. Zyklus an den jeweiligen Stufen erkennbar, die nicht konstant sind, sondern mit der Zeit abfallen. Die weitere Abnahme des Umsatzes beruhte vermutlich auf Deaktivierung der Enzyme durch die hohe H_2O_2 -Konzentration, wie bereits in Abschnitt 2.5.2 diskutiert wurde.

Die Signale wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Partikelzahl normiert. In Abbildung 51 wurde der Umsatz pro Partikel gegen die Zeit aufgetragen.

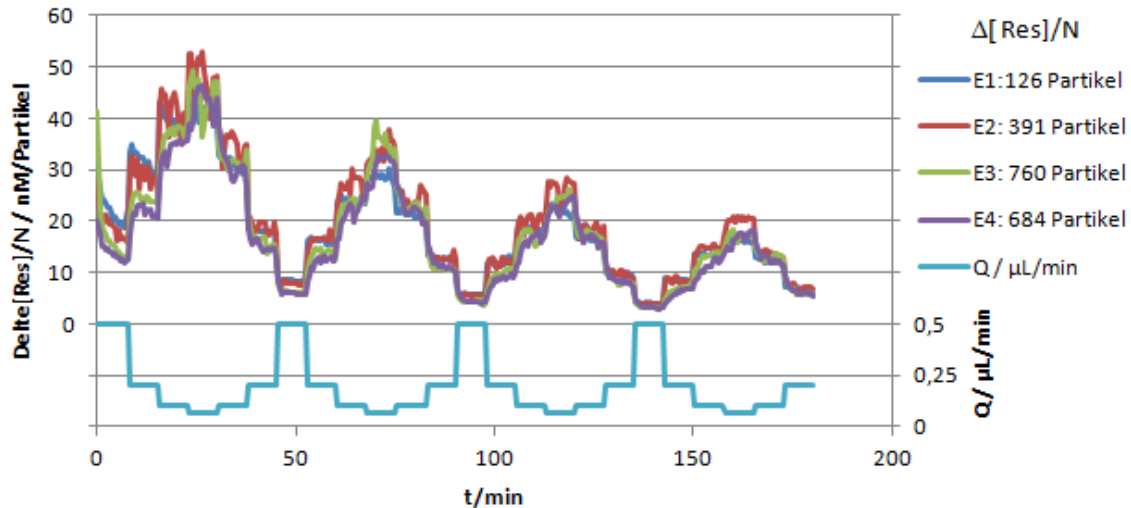


Abbildung 51: Normierte Umsätze $\Delta[\text{Res}]/N$ der Reaktion von HRP-funktionalisierten Partikeln mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 und $100 \mu\text{M}$ Amplex Red bei variabler Flussrate Q . In der Legende sind die Partikelzahlen N für jedes Experiment (E1-E4) angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil die Flussrate Q auf der rechten Achse aufgetragen.

Durch Normierung des Umsatzes auf die Partikelzahl fielen die Kurven der vier unabhängigen Experimente übereinander. Dies bestätigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Experimente. Das bedeutet weiterhin, dass der Umsatz pro Partikel nicht von der Anzahl der Partikel abhing und demnach unabhängig vom Durchmesser der Schüttung ist. Vorteilhaft dürfte auch sein, dass hier nie mehr als 35 % der Substrate umgesetzt wurden und somit auch keine signifikante Substraterschöpfung auftritt. Mit **Substraterschöpfung** wird in der Enzymkinetik die Phase nach dem steady state bezeichnet, in der kein Substratüberschuss mehr vorliegt, wodurch die Konzentration der Enzym-Substrat-Komplexe und damit die Umsatzgeschwindigkeit abnehmen.^[109] Für den Festbettreaktor würde das bedeuten, dass die Umsätze nicht mehr proportional zur Partikelzahl wären, sondern dass sie bei großen Schüttungen mit langen Verweilzeiten abnehmen.

Auch die Alterung war bei allen vier Kurven identisch und deshalb ebenfalls nicht von der Partikelzahl abhängig. Durch Alterung veränderte sich jedoch das Rauschen. Es trat eher zu Beginn des Experiments auf und war in den ersten beiden Zyklen stärker als in den letzten beiden. Das System schien nach 90 min besser äquilibriert zu sein.

Die Kontur der Stufen nahm insbesondere bei E4 ab. Abbildung 52 zeigt die Fritten F0 und F1 vor und nach dem Experiment. Während der Messung setzte sich der Reaktor zunehmend mit biologischen Kontaminationen zu.^[136] Der verwendete Puffer wurde zwar

vor dem Experiment durch einen 0,4 μm Sterilfilter gereinigt, trotzdem gab es insbesondere bei den später zu diskutierenden niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen häufig Probleme durch Kontaminationen. Der erhöhte Widerstand im Bereich der Fritten und besonders in den schmalen Ritzen der Partikelschüttungen führte zu einer Abrundung der Stufen.

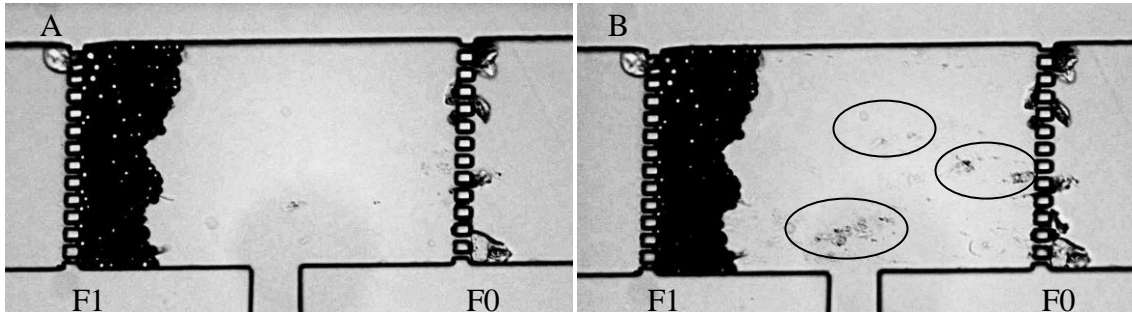


Abbildung 52: Vergleich von Fritte F1 und F0 aus Experiment E4 mit erhöhtem Kontrast. **A:** vor und **B:** nach dem Experiment (3 h). Während des Experiments haben sich Zellen im Reaktor abgesetzt, markiert durch Ellipsen.

Die weitere quantitative Auswertung der Ergebnisse erfolgt in Abschnitt 0. Vorher werden kurz die Ergebnisse der Experimente mit niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen vorgestellt.

2.5.3.3 Mikrofluidikexperimente mit HRP bei 0 – 40 μM H_2O_2

Für eine fundierte Auswertung der Mikrofluidik nach Michaelis Menten wurden die Experimente bei verschiedenen konstanten H_2O_2 -Konzentrationen durchgeführt. Für jedes Experiment wurde dabei das im Abschnitt 2.5.3.1 diskutierte Flussprofil verwendet. Die gemessenen Umsätze, sowie die auf die Partikelzahl normierten Umsätze wurden in Abbildung 53A-H gegen die Zeit aufgetragen. Aus den normierten Umsätzen konnten nun die Mittelwerte der jeweils vier Experimente bei konstanter H_2O_2 -Konzentration berechnet werden. Diese Kurven sind in Abbildung 53I dargestellt.

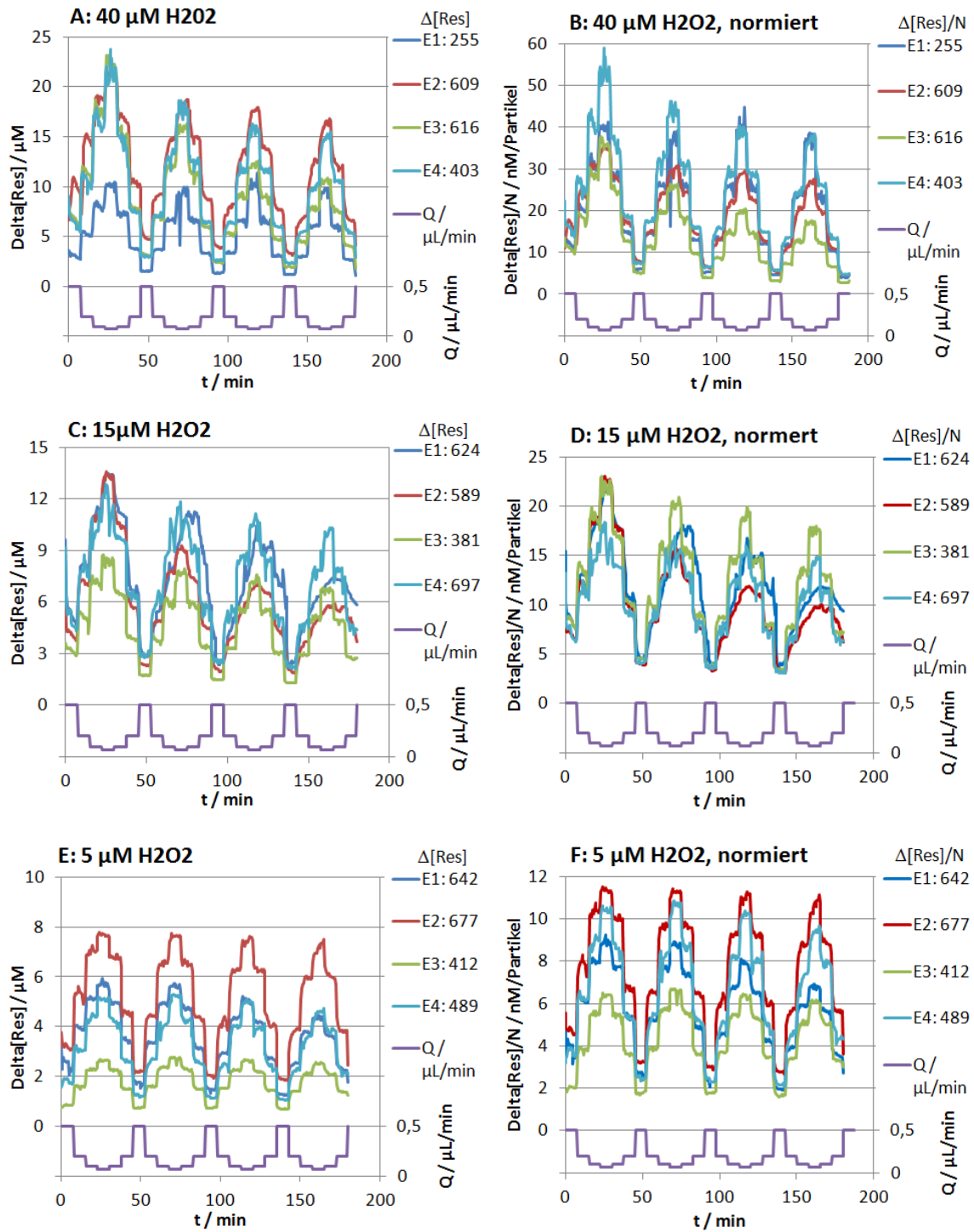


Abbildung 53: Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ und normierter Umsatz $\Delta[\text{Res}]/N$ der Reaktion von HRP-beschichteten Partikeln in der Mikrofluidik bei verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen und 100 μM Amplex Red bei variabler Flussrate Q . (Fortsetzung und Details nächste Seite)

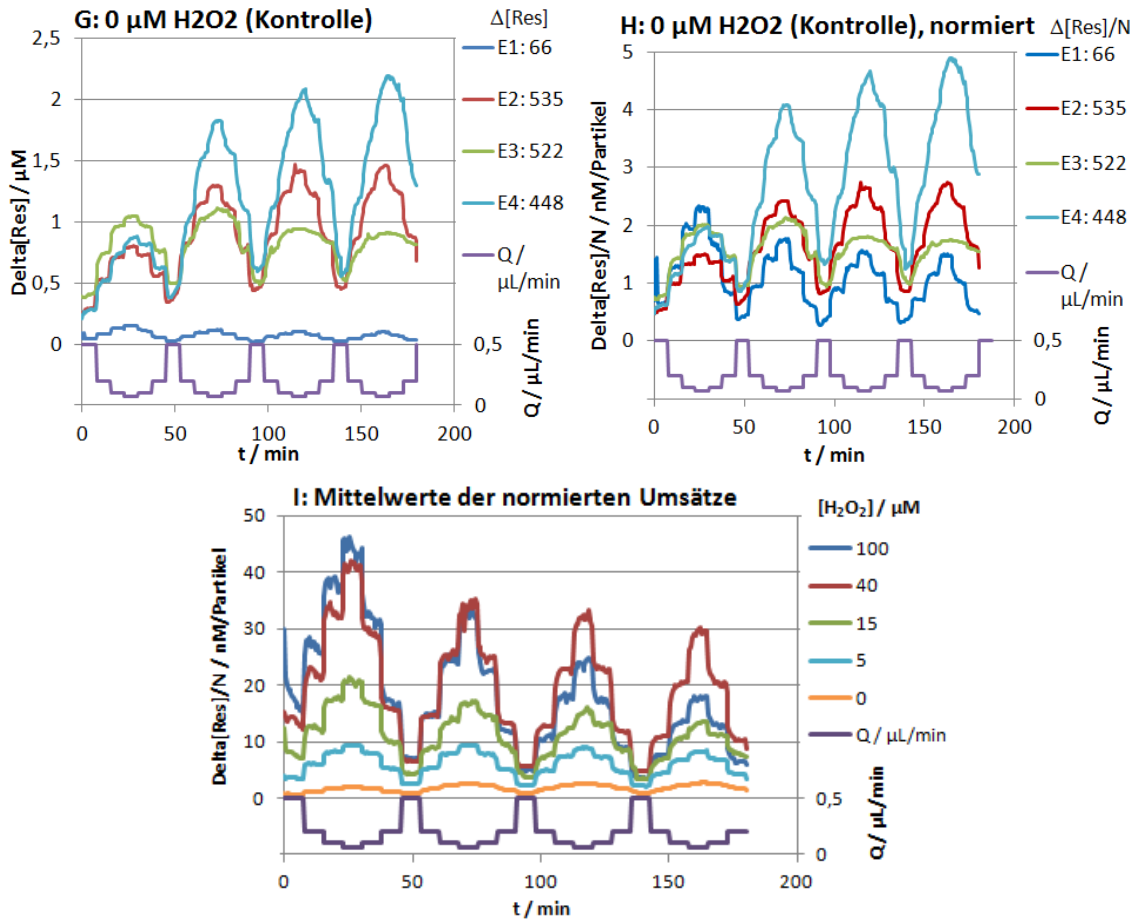


Abbildung 53: (Fortsetzung von voriger Seite) Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ und normierter Umsatz $\Delta[\text{Res}]/N$ der Reaktion von HRP-beschichteten Partikeln in der Mikrofluidik bei **A und B**: 40 μM ; **C und D**: 15 μM ; **E und F**: 5 μM und **G und H**: 0 μM H₂O₂ und 100 μM Amplex Red bei variabler Flussrate Q . Die Daten stammen aus insgesamt 16 unabhängigen Experimenten. In den Legenden sind die Partikelzahlen für jedes Experiment (E1 – E4) angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil der Diagramme die Flussrate Q auf der rechten Achse aufgetragen. **I**: Mittelwerte der auf die Partikelzahl **normierten** Umsätze $\Delta[\text{Res}]/N$ der jeweils vier Experimente bei konstanter H₂O₂-Konzentration.

Die Umsätze zeigen eine Stufenstruktur in Abhängigkeit von der Flussrate, wie auch bei den Experimenten mit 100 μM H₂O₂ in Abschnitt 2.5.3.2 beobachtet wurde. Die Umsätze hingen dabei erwartungsgemäß von der eingesetzten H₂O₂-Konzentration ab, was besonders deutlich beim Vergleich der normierten Umsätze in Teilabbildung E erkennbar ist.

Bei **40 μM H₂O₂** in Abbildung 53A wurde bei den Experimenten 2–4 bei $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ ein Umsatz von bis zu 23 μM erreicht, was einen Substratverbrauch von bis zu 58 % des eingesetzten H₂O₂ bedeutet. In E1 waren nur 255 Partikel im Reaktor, sodass ein entsprechend geringerer Umsatz stattfand. Durch Normieren auf die Partikelzahl (vgl.

Abbildung 53B) lagen die Kurven von E1-E3 während des ersten Zyklus gut übereinander. Bei allen vier Experimenten ist eine deutliche Abnahme der Signale mit der Zeit erkennbar. Während des ersten Zyklus ist, wie auch bei $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, die Abnahme am stärksten. Im weiteren Verlauf des Experiments nahm der Umsatz jedoch weniger stark ab. Wie in Abschnitt 2.5.2 untersucht, ist bei $40 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ die Lebensdauer der Enzyme höher. Die Alterung war jedoch nicht immer gleich, E3 alterte am schnellsten, während E1 fast konstant blieb. Aus diesem Grund drifteten auch die normierten Umsätze in Abbildung 53B im Laufe des Experiments auseinander

Abbildung 53C zeigt die Umsätze der Reaktion mit **$15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$** . Im Vergleich zu den bisher diskutierten Ergebnissen war die Datenqualität hier deutlich schlechter. Besonders E4 zeigte starkes Rauschen, während E1 und E2 stark alterten und die Stufenstruktur verloren. Das ist ein Zeichen für Kontamination des Reaktors, da die Lebensdauer der Enzyme bei geringerer H_2O_2 -Konzentration eigentlich erhöht sein sollte. Die niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen sowie BSA und HS-DNA als Pufferbestandteil begünstigten offenbar das Wachstum von Bakterien. Diese können sich an den Fritten und den Partikelzwischenräumen festsetzen und somit den Reaktor verstopfen.^[136]

Wegen der fluidischen Kapazität (vgl. S. 100) wirkten sich Flussratenwechsel zeitverzögert auf den Fluss im Reaktor aus, da sich der Druck im Reaktor und den Zuleitungen erst äquilibrieren mussten. Die Partikelschüttung fungierte dabei als Drossel, deren Durchlass sich durch Kontamination verringerte und den Druckausgleich verlangsamte. Dadurch erfolgt der Flussratenwechsel ebenfalls verzögert, so dass die Stufen zunehmend runder wurden. Im Extremfall reichte die Zeit nicht mehr, um eine konstante bzw. die gewünschte Flussrate an der Fritte zu erhalten. Bei sinkender Flussrate war die reale Flussrate also noch erhöht und führte zu niedrigeren Umsatz. Bei steigender Flussrate war der Umsatz größer, da die reale Flussrate noch erniedrigt war. Insgesamt führte das zu einer Verschiebung des Maximums, was beim 4. Zyklus gut erkennbar war.

Der Umsatz betrug bei niedrigen Flussraten bis zu $13,5 \mu\text{M}$, was bezogen auf das eingesetzte H_2O_2 einem Verbrauch von 90 % entspricht. Es kam daher zu Substraterschöpfung, das heißt, der Umsatz bei langsamen Flussraten war nicht mehr so effizient. Für den Festbettreaktor bedeutete das, dass das H_2O_2 während des Durchströmens der Schüttung zum Großteil verbraucht wurde, so dass den flussabwärts liegenden Enzymen

nur noch eine geringe Menge H_2O_2 zur Reaktion zur Verfügung stand. Begünstigt wurde dieser Effekt also durch niedrige Flussraten, Schüttungen mit großer Partikelzahl und niedrige Substratkonzentrationen. Auf Effekte durch Substraterschöpfung wird später bei der Diskussion der Reaktionsraten noch detaillierter eingegangen.

Durch Normierung auf die Partikelzahl (vgl. Abbildung 53D) glichen sich die unterschiedlichen Umsätze aus. In Zyklus 1 waren die Kurven von E1 – E3 nahezu deckungsgleich. Durch Substraterschöpfung müsste bei großen Partikelzahlen der normierte Umsatz niedriger sein, was sich aber anhand der Kurven nicht eindeutig belegen ließ.

Bei $5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ in Abbildung 53E zeigten die Kurven das erwartete Stufenmuster, wobei insbesondere bei E2 bis zu $7,8 \mu\text{M}$ Resorufin gebildet wurden. Wie in Abschnitt 2.1.2.1 diskutiert, erfolgte die Umsetzung mit H_2O_2 in 1:1 Stöchiometrie, so dass bei $5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ eigentlich maximal $5 \mu\text{M}$ Resorufin gebildet werden konnten. Da ein großer Überschuss von insgesamt $100 \mu\text{M}$ Amplex Red eingesetzt wurde, erfolgte die Oxidation zu Resorufin teilweise unspezifisch, was unten bei der Kontrolle mit $0 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ diskutiert wird. Der vollständige Verbrauch des H_2O_2 bei niedrigen Flussraten führte wiederum zum Effekt der Substraterschöpfung, der beim Wechsel von $0,1$ auf $0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ deutlich an den verringerten Stufenhöhen erkennbar ist. Trotz längerer Kontaktzeit nahm dort der Umsatz nur noch geringfügig zu.

Eine Alterung war hier kaum erkennbar. Das Stufenmuster blieb gut erhalten und besonders bei Experiment 3 zeigten alle vier Zyklen gleichbleibend hohe Umsätze. Die niedrige H_2O_2 -Konzentration von $5 \mu\text{M}$ verbesserte also die Langzeitstabilität der Enzyme, so dass über 3 h eine nahezu konstante Enzymaktivität beobachtet werden konnte. Die Normierung auf die Partikelzahl (vgl. Abbildung 53F) verdeutlichte jedoch eine starke Streuung der Ergebnisse. Die Kurven sind weder deckungsgleich, noch korrelieren die normierten Umsätze mit der Partikelzahl.

Die **Kontrolle ($0 \mu\text{M}$)** in Abbildung 53G enthielt ausschließlich die HRP-beschichteten Partikel und Amplex Red. Wie schon die bisher diskutierten Experimente vermuten ließen, kam es auch ohne Anwesenheit von H_2O_2 zur Bildung von Resorufin. Die Rohdaten zeigten, dass die aus der Hintergrundfluoreszenz des Puffers berechnete Resorufinkonzentration kleiner als 1% des gemessenen Umsatzes betrug. Daraus folgt, dass der Resorufinumsatz signifikant war, und dass das Resorufin lokalisiert beim Durchströmen der Fritte gebildet

wurde. Außerdem zeigten alle Kurven die bekannte flussratenabhängige Stufenstruktur, so dass die Umsätze von der Kontaktzeit mit den Enzymen abhingen.

E1 zeigte nur geringe Umsätze bis maximal 0,2 μM Resorufin. Dies ist auf die geringe Partikelzahl zurückzuführen, wie an den normierten Umsätzen in Abbildung 53H erkennbar ist. Im ersten Zyklus waren dort die Umsätze aller vier Experimente nahezu deckungsgleich. Wegen der unterschiedlichen Alterung drifteten die Signale aber im Verlauf der Experimente auseinander.

Bei E1 blieb die präzise Stufenstruktur über die gesamten 3 h erhalten. Anders verhielt sich E3. Die Umsätze blieben zwar ebenfalls erhalten, jedoch wurden die Stufen immer runder, was wie oben beschrieben auf verzögerten Druckausgleich durch die sich mit Bakterien zusetzende Schüttung hinweist. Bei E2 und E4 hingegen verdoppelten sich die Umsätze während der 3 h. Auch hier verloren die Stufen ihre Kontur durch Bakterienwachstum. Bei Abwesenheit von antibakteriell wirkendem H_2O_2 und bei einer Temperatur von 25 °C herrschten dafür ideale Bedingungen. Die Verzögerung des Druckausgleichs führte im Extremfall dazu, dass sich das Maximum bei E4 verschob.

Das Bakterienwachstum sollte eigentlich durch Sterilfiltration des Puffers unterbunden werden. Trotzdem wurden in fast allen Experimenten biologische Kontaminationen beobachtet.^[136] Vermutlich gelangten die Zellen bei Herstellung und Aufbau des Mikroreaktors oder beim Verdünnen der Lösung in das System. Es reichten bereits einzelne Zellen, die sich dann während der mehrstündigen Experimente im BSA und HS-DNA-enthaltenden Puffer offenbar gut vermehren konnten. Die Schüttungen wirkten dann wie ein Filter, der auch geringste Zellkonzentrationen anreichert, was zu Verstopfen der Durchlässe führt. Die Fotos von kontaminierten Schüttungen sind also nicht repräsentativ für die Zellkonzentration im gesamten System.

Die Umsätze im Kontrollexperiment können deshalb auf verschiedene Arten erklärt werden. Eine Möglichkeit ist die direkte Oxidation von Amplex Red durch die Zellen. Da allerdings das Hintergrundsignal vor der Fritte (nicht gezeigt) niedrig und konstant blieb, musste die Umsetzung direkt an der Fritte stattgefunden haben. Das spricht für die HRP-katalysierte Umsetzung mit Stoffwechselprodukten der Zellen als oxidierendes Substrat.

Da der Reaktor zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder belichtet wurde, ergaben sich auch mögliche photochemische Mechanismen. Durch Bestrahlung im UV Bereich können

Zellen auch H_2O_2 bilden.^[137] Durch häufige Belichtung und Zellwachstum stieg damit im Lauf des Experiments die H_2O_2 -Konzentration, so dass die erhöhten Umsätze entstanden. Dies war vermutlich der dominierende Mechanismus der ansteigenden Kurven E2 und E4 in Abbildung 53G und H. Der zweite Mechanismus begründet sich in der in Abschnitt 2.5.2 untersuchten Photolabilität von Amplex Red. Durch Belichtung werden Radikale gebildet, die auch bei Abwesenheit von HRP und H_2O_2 zu Resorufin reagieren. Bei Anwesenheit von HRP wird dieser Prozess beschleunigt.^[134] Dieser Mechanismus trat vermutlich bei allen Kurven in Abbildung 53G und H auf, auch den nicht ansteigenden Kurven E1 und E3.

Aus Abbildung 53H ließen sich nun die beiden Effekte quantifizieren. Die Signale des ersten Zyklus sollten ausschließlich durch Photooxidation von Amplex Red entstehen und lagen in der Größenordnung von etwa 2 nM/Partikel. Die Signale der kontaminierten Experimente stiegen bis auf 5 nM/Partikel, so dass der maximale Einfluss der Kontamination der Differenz von 3 nM/Partikel entsprach.

Anhand der gemittelten normierten Umsätze in Abbildung 53I ließen sich die diskutierten Trends gut nachvollziehen. Je mehr H_2O_2 in der Mikrofluidik eingesetzt wurde, desto größer war der Umsatz pro Partikel. 40 und 100 μM H_2O_2 unterschieden sich kaum, da die H_2O_2 -Konzentrationen vermutlich im Sättigungsbereich der Michaelis Menten Kurve lagen und die Enzyme deshalb mit der maximalen Geschwindigkeit reagierten. Gleichzeitig alterten die Enzyme abhängig von der H_2O_2 -Konzentration unterschiedlich schnell. Die Deaktivierung schritt bei 100 μM H_2O_2 so schnell voran, dass die Enzyme bereits nach 1 h langsamer reagierten, als in der Fluidik mit 40 μM H_2O_2 . Bei niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen alterten die Enzyme entsprechend langsamer. In der Kontrolle hingegen kam es durch die Abwesenheit von H_2O_2 zu verstärktem Bakterienwuchs, so dass hier während des Experiments eine leichte Zunahme der unspezifischen Aktivität beobachtet wurde. Durch die Mittelwertbildung relativierte sich der Effekt aber. So nahmen die Maxima der normierten Umsätze vom ersten Zyklus zum vierten Zyklus von 1,9 auf 2,7 nM/Partikel zu, so dass der Beitrag der Bakterien nur noch maximal 0,8 nM/Partikel und damit maximal 30 % des unspezifischen Umsatzes entsprach.

2.5.3.4 Auswertung nach Michaelis Menten

In der Literatur wird Kinetik in Festbettreaktoren häufig nach der Methode von Lilly Hornby ausgewertet.^[138] Sie leiteten eine integrierte Form der Michaelis Menten Gleichung her und substituierten die Reaktionszeit mit der inversen Flussrate. Die Methode ist allerdings nur für Einsubstratreaktionen und feste Schüttungsgrößen hergeleitet. Deshalb wurden die Mikrofluidikexperimente in dieser Arbeit über die Anfangsgeschwindigkeiten nach Michaelis Menten ausgewertet. Nachteilig war, dass der Verbrauch des Substrats beim Passieren der Schüttungen aber nicht berücksichtigt wurde, so dass bei größeren Schüttungen und langsamen Flussraten nicht mehr die Anfangs- sondern eine mittlere Geschwindigkeiten bestimmt wurde.

Bei der Auswertung nach Michaelis Menten mit immobilisierten Enzymen in der Mikrofluidik sind Reaktionsgeschwindigkeiten (Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit) unpraktikabel, da die Enzyme nicht gleichmäßig im Volumen verteilt sind und das Flüssigkeitsvolumen kontinuierlich ausgetauscht wird. Besser geeignet ist die Reaktionsrate r , die nach Gleichung (22) auf die Stoffmenge bezogen ist.

$$r = \frac{dn}{dt} = \frac{\Delta n}{\Delta t} \quad (22)$$

In der gesamten Schüttung wird also Δn Substrat pro Zeiteinheit Δt umgesetzt. Das entsprechende Zeitintervall ergibt sich aus den Definitionen der Konzentration ($c = n/V$) und der Flussrate ($Q = V/t$) so dass die Reaktionsrate mit Gleichung (23) direkt aus den Umsätzen $\Delta[\text{Res}]$ und der Flussrate Q berechnet werden kann.

$$r = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{V \cdot \Delta c}{\Delta t} = \frac{V \cdot \Delta c}{\frac{V}{Q}} = \Delta c \cdot Q = \Delta[\text{Res}] \cdot Q \quad (23)$$

Die Reaktionsrate bezieht sich dabei auch auf die gesamte Schüttung. Da in dieser Arbeit die Größe der Schüttungen aber variabel war, wird die Reaktionsrate ebenfalls auf die Partikelzahl normiert, und man erhält die bereits in Abschnitt 2.3.4 erwähnte normierte Reaktionsrate r/N , die einen Vergleich der verschiedenen Reaktionsbedingungen ermöglicht.

$$\frac{r}{N} = \frac{\Delta[\text{Res}]}{N} \cdot Q \quad (24)$$

Damit können aus den normierten Umsätzen $\Delta[\text{Res}]/N$ aus Abbildung 53 direkt die normierten Reaktionsraten berechnet werden.

Vorher wurden für die Stufen noch sinnvolle Mittelwerte gebildet. Nach einem Flussratenwechsel müssen sich die Druckverhältnisse im Reaktor zunächst einpendeln. Auch die Geschwindigkeit der zweistufigen Peroxidase Reaktion muss sich äquilibrieren, so dass die Signale erst zum Ende der jeweiligen Stufe stabil werden und dann am genauesten bestimmbar sind. Deshalb wurden in Abbildung 53 von den 15 Datenpunkten einer Stufe (entspricht 7,5 min) die jeweils sechs letzten Werte ausgewählt (entspricht den letzten 3 min) und über die jeweils vier unabhängigen Messreihen gleicher H_2O_2 -Konzentration gemittelt. Aus diesen Mittelwerten wurde nun nach Gleichung (24) die normierten Reaktionsraten r/N berechnet. Von den Werten wurden die Kontrolle ohne H_2O_2 (vergleiche Abbildung 92 im Anhang) als Hintergrund abgezogen. Wie bereits diskutiert, wurde die unspezifische Oxidation der Kontrolle nur zu 30 % durch Bakterien und zu etwa 70 % durch Photoaktivierung verursacht. Deshalb wurde die Kontrolle von allen Kurven abgezogen, auch von denen mit hohen H_2O_2 -Konzentrationen, die nur minimales Bakterienwachstum aufwiesen. Zur Verdeutlichung der Stufen wurde die Daten schließlich als Säulendiagramme aufgetragen, die in Abbildung 54 dargestellt sind.

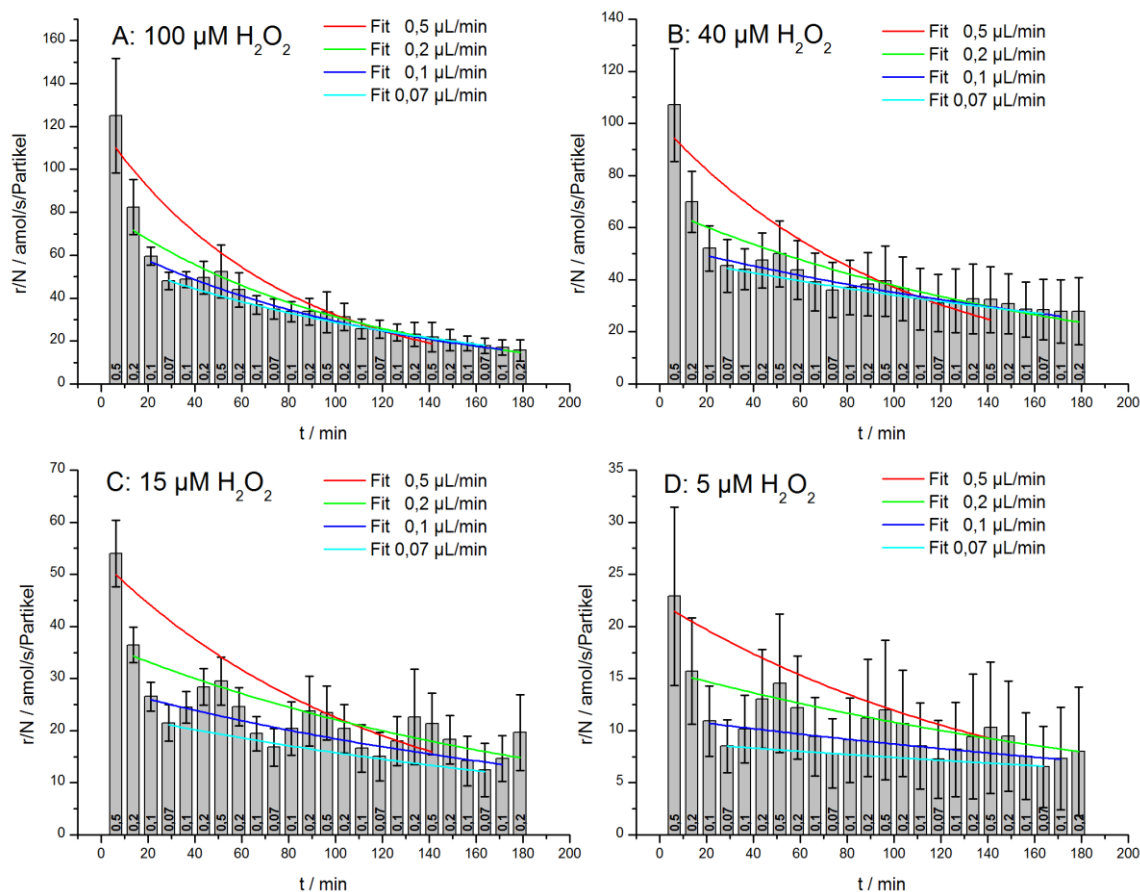


Abbildung 54: Gemittelte normierte Reaktionsraten r/N der Reaktion von HRP-funktionalisierten Partikeln mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen und 100 μM Amplex Red bei variablen Flussraten. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Flussraten Q . **A:** 100 $\mu M H_2O_2$, **B:** 40 $\mu M H_2O_2$, **C:** 15 $\mu M H_2O_2$, **D:** 5 $\mu M H_2O_2$. Die Säulen wurden auf einer skalierten x-Achse aufgetragen und für die jeweilige Flussrate durch nichtlineare Regression nach Gleichung (25) angepasst. Die angepassten Kurven sind ebenfalls im Diagramm dargestellt.

Die normierten Reaktionsraten r/N zeigen, wie auch die bisher diskutierten Umsätze, zwei grundlegende Verhalten: Sie hängen von der H_2O_2 -Konzentration ab und nehmen mit der Zeit durch Alterung ab.

Die Alterungseffekte können korrigiert werden.

Da auch bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen eine signifikante Deaktivierung stattfand, konnten hier nicht einfach alle Daten gemittelt werden. Stattdessen ermöglichten exponentielle Kurvenfits nach Gleichung (25) eine Quantifizierung des Effekts. Gleichzeitig konnte auf diese Weise auf die ursprüngliche Reaktionsrate r_0/N der nicht-gealterten Enzyme zum Zeitpunkt $t = 0$ extrapoliert werden.

$$\frac{r}{N} = \frac{r_0}{N} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} = \frac{r_0}{N} \cdot 2^{-\frac{t}{t_{1/2}}} \quad (25)$$

Dabei ist $t_{1/2}$ die Halbwertszeit. Da die Alterung bei verschiedenen Flussraten unterschiedlich verlief, wurde der Fit für jede der 16 Kombinationen aus Flussrate und H_2O_2 -Konzentration in Abbildung 54 individuell durchgeführt. Die gefitteten Kurven sind in derselben Abbildung aufgetragen. Die Kurven verdeutlichen, dass die Alterung in zwei Phasen erfolgte: In den ersten 20 – 30 min nahm die Reaktionsrate überproportional ab, danach folgt die Alterung dem exponentiellen Abfall. Dieses Verhalten kann durch zwei Mechanismen erklärt werden kann:

- 1) Die Enzyme wurden durch Strömung gewaschen. Besonders in der etwa zwanzigminütigen Anfangsphase kam es zu deutlichen Verlusten unspezifisch gebundener Enzyme.
- 2) Die Enzyme wurden durch unspezifische Reaktion mit H_2O_2 deaktiviert. Dieser Prozess fand während des ganzen Experiments statt.^[132]

In Abbildung 55 wurden die nach Gleichung (25) gefitteten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der normierten Reaktionsraten aus Abbildung 54 gegen die Flussrate Q aufgetragen. Die Halbwertszeit war bei $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 am geringsten und lag zwischen 50 und 100 min. Damit lag sie um den Faktor 12 bis 25 unter den in der Mikrotiterplatte bestimmten Halbwertszeiten. Wegen der schnellen Alterung waren keine dreistündigen Experimente möglich. Der Fit nach Gleichung (25) bot aber die Möglichkeit, durch Extrapolieren auf $t = 0$ die Alterungseffekte zu eliminieren, um die Daten sinnvoll auswerten zu können.

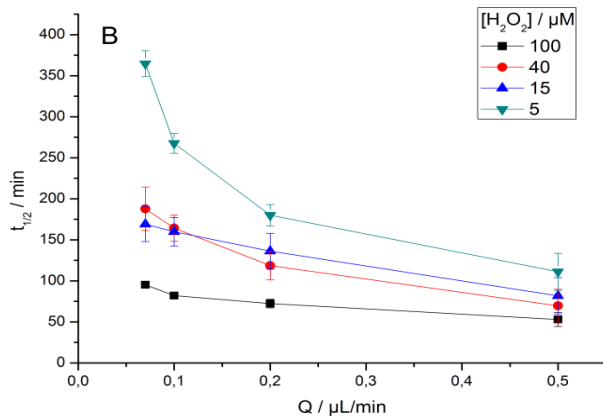


Abbildung 55: Auftragung der aus Abbildung 54 gefitteten Halbwertszeit $t_{1/2}$ der abnehmenden Reaktionsrate gegen die Flussrate Q bei verschiedenen konstanten H_2O_2 -Konzentrationen.

Mit sinkender H_2O_2 -Konzentration stiegen die Halbwertszeiten und die Enzyme wurden langsamer deaktiviert. Bei $5 \mu\text{M}$ H_2O_2 wurden die größten Werte zwischen 2 und 6 h erreicht. Bei den Umsätzen in Abbildung 53E hingegen war nahezu keine Alterung erkennbar. Erst durch Subtraktion der steigenden Umsätze der Kontrolle aus Abbildung 53G entstand die abnehmende Kurve in Abbildung 54D, so dass die niedrigen Halbwertszeiten teilweise auch durch Abzug des zunehmenden Hintergrunds verursacht wurden.

In Abbildung 55 ist außerdem erkennbar, dass die Halbwertszeiten bei hohen Flussraten sanken. Bildlich gesprochen wurden bei höheren Flussraten die Enzyme stärker beansprucht bzw. weggewaschen. Da es sich aber jeweils um kontinuierliche Experimente mit identischen Enzymen aber wechselnder Flussrate handelte, konnten diese identischen Enzyme auch nicht mit verschiedenen Halbwertszeiten altern. Dieses Verhalten hing vermutlich mit der Substraterschöpfung zusammen und wird unten diskutiert.

Bei der Kontrolle in der Mikrotiterplatte mit variablen H_2O_2 -Konzentrationen in Abschnitt 2.5.2 wurde für die höchstkonzentrierte Probe, die $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 enthielt, eine Halbwertszeit von ca. 463 min gemessen. Die Kontrolle, bei der die Schüttung für 4 h mit Puffer gespült wurde, zeigte erst dann extreme Alterung, als H_2O_2 durch den Kanal gepumpt wurde.

Die beschleunigte Alterung in der Mikrofluidik hing also eindeutig von der Kombination aus Strömung und H_2O_2 ab. Vermutlich wurde durch die Reaktion mit H_2O_2 die Bindung Partikel-STV oder STV-bHRP geschwächt, was beides zu Verlusten des immobilisierten Enzyms führte.

Betrachtung der Datenqualität.

Die Qualität der Daten in Abbildung 54 änderte sich ebenfalls mit der H_2O_2 -Konzentration. Bei $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 betrug die Standardabweichung 7 – 30 %, bei 40 und $15 \mu\text{M}$ betrug sie 10 – 45 % und bei $5 \mu\text{M}$ stieg sie sogar auf 30 – 75 %. Trotzdem zeigten sich regelmäßige Stufenmuster, die weiter ausgewertet werden konnten. Für die großen Standardabweichungen sind verschiedene Faktoren verantwortlich.

- 1) In einigen Fällen führte die Normierung auf die Partikelzahl nicht zu deckungsgleichen Kurven, vgl. Abbildung 53. Durch die Bildung des Mittelwerts blieb das Stufenmuster zwar erhalten, aber die Standardabweichungen stiegen.

- 2) Die Kurven in Abbildung 53 zeigten unterschiedliches Alterungsverhalten. Die Messwerte drifteten auseinander und dementsprechend stiegen die Standardabweichungen mit der Zeit.
- 3) Je weniger H_2O_2 im System war, desto stärker war die Anreicherung biologischer Kontaminationen über die betrachteten 3 h, was zu abgerundeten Stufen führte.
- 4) Effekt 2 und 3 sind bei der Kontrolle ohne H_2O_2 am stärksten ausgeprägt. Die über die vier Einzelkurven berechneten Mittelwerte hatten Standardabweichungen von 15 – 55 % (Abbildung 92 im Anhang). Durch Subtraktion dieser Kontrolle pflanzten sich die steigenden Standardabweichungen in allen hintergrundkorrigierten Daten in Abbildung 54 fort.

Diese Ergebnisse zeigen die Schwierigkeiten bei der Wahl der Reaktionsbedingungen. Einerseits wirkte eine hohe H_2O_2 -Konzentration sterilisierend und führte zu besserer Datenqualität. Andererseits sank aber die Enzymstabilität mit steigender H_2O_2 -Konzentration. Eine ähnliche Problematik bestand bereits bei der Auswahl der Puffer in Abschnitt 2.5.2. Die Zugabe von BSA und HS-DNA erhöhte die Lebensdauer der Enzyme und ermöglichte somit längere Mikrofluidikexperimente. Andererseits führten diese Zusätze trotz Sterilfiltrieren des Puffers zu Ablagerungen und erhöhtem Bakterienwachstum.

Die Reaktionsraten stiegen mit der H_2O_2 -Konzentration und der Flussrate.

Im Folgenden werden die nach Gleichung (25) auf den Zeitpunkt $t = 0$ extrapolierten Daten weiter diskutiert, die nun frei vom Alterungseffekten waren. Die ursprünglichen Reaktionsraten r_0/N sind in Abbildung 56A gegen die H_2O_2 -Konzentration aufgetragen. Zum Vergleich sind in Teilabbildung B die zugehörigen normierten Umsätze $\Delta[\text{Res}]_0/N$ aufgetragen, die nach Gleichung (24) berechnet wurden. Die Daten wurden nach Michaelis-Menten Gleichung (3) gefittet.

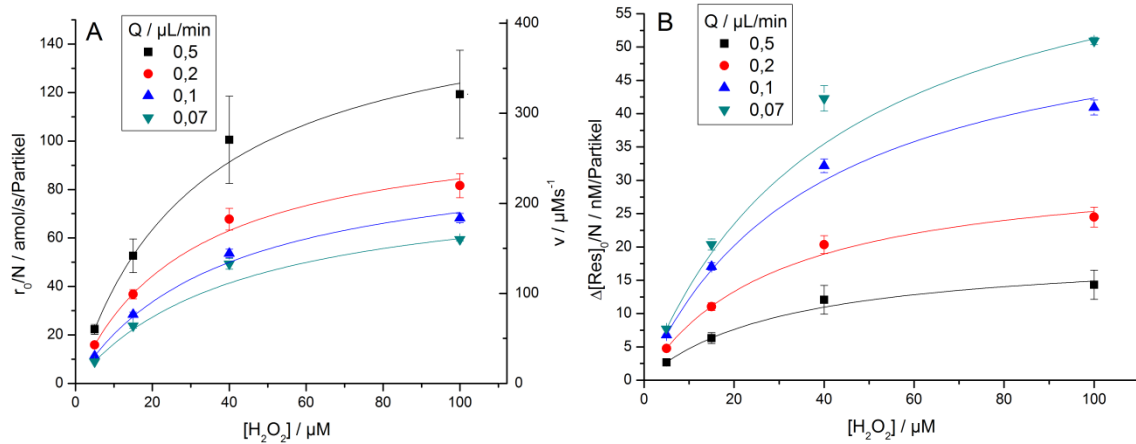


Abbildung 56: **A:** Auftragung der ursprünglichen Reaktionsrate pro Partikel r_0/N gegen die H_2O_2 Konzentration bei verschiedenen Flussraten. Auf der rechten Achse wurden die Reaktionsraten nach Gleichung (30) in die Geschwindigkeit v umgerechnet. **B:** Auftragung der ursprünglichen Umsätze pro Partikel $\Delta[\text{Res}]_0/N$ bei verschiedenen Flussraten. In beiden Abbildungen wurden die Kurven nach Michaelis Menten Gleichung (3) gefittet.

Obwohl die Datenpunkte jeder Kurve aus unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen stammen, die teilweise Monate auseinander lagen, sind die Kurven stetig und folgen dem typischen Michaelis Menten Verlauf. Bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen stiegen die Reaktionsraten nahezu linear an. Bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen ist eine Sättigung erkennbar und die Enzyme reagierten annähernd mit v_{max} . Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der mikrofluidische Reaktor für quantitative Kinetikmessungen eingesetzt werden kann. Mit Hilfe der verwendeten Auswertungsmethode konnte sogar aus alternden und stark streuenden Rohdaten zuverlässige Ergebnisse erzielt werden.

Die Standardabweichungen bei $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ waren größer als bei den anderen Flussraten, was aus der exponentiellen Anpassung der Daten in Abbildung 54 resultiert. Die jeweils ersten Säulen waren dort überproportional groß, so dass der extrapolierte Wert bei $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ eine geringere Genauigkeit hat.

Alle Fits lagen bei $40 \mu\text{M}$ H_2O_2 tiefer und bei $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 höher als die experimentellen Daten, was auf die Deaktivierung der Enzyme durch das H_2O_2 zurückzuführen ist.

Der Unterschied zwischen Reaktionsraten und Umsätzen.

Der Vergleich r_0/N in Abbildung 56A mit $\Delta[\text{Res}]_0/N$ in Abbildung 56B hebt noch einmal den Unterschied der beiden Größen hervor. Die normierte Reaktionsrate r_0/N stieg mit höheren Flussraten, da ständig frisches H_2O_2 nachgeliefert wurde. Die Enzyme konnten mit hohen Reaktionsraten reagieren, setzten aber, wegen der kurzen Kontaktzeit, nur Bruchteile des in der Lösung befindlichen H_2O_2 um. Dadurch sanken die normierten Umsätze $\Delta[\text{Res}]_0/N$ mit steigender Flussrate.

Bei niedrigen Flussraten hingegen stiegen die Kontaktzeiten mit den Enzymen, und beim Durchströmen der Fritte kam es zu höheren Umsätzen. Dadurch nahm die Konzentration des H_2O_2 innerhalb der Schüttung exponentiell ab, und die gemessene Reaktionsrate r_0/N sank. Dieser Effekt der Substraterschöpfung bei langsamen Flussraten wurde durch niedrigere H_2O_2 -Konzentrationen noch verstärkt. Dabei wurde das Substrat fast vollständig umgesetzt, so dass flussabwärts liegende Enzyme nur noch von einem Bruchteil des ursprünglich in Lösung befindlichen H_2O_2 erreicht wurden.

Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass die ermittelten Halbwertszeiten bei niedrigen Flussraten in Abbildung 55 stiegen. Die Substraterschöpfung führte dazu, dass flussabwärts liegende Enzyme nicht ausgelastet waren oder im Extremfall bei vollständigem Umsatz nicht an der Reaktion teilnahmen. Kam es zur Deaktivierung oder Verlust einzelner Enzyme, wurde im Anfangsbereich der Schüttung weniger Substrat umgesetzt, aber die vorher wegen Substratmangel inaktiven Enzyme konnten die fehlenden Enzyme durch höhere Reaktionsraten ausgleichen und immer noch nahezu vollständigen Umsatz erzeugen. Trotz Alterung nahm der über die gesamte Schüttung gemessene Umsatz also nicht so schnell ab. Durch die Substraterschöpfung wurde die Alterung überdeckt, was sich in scheinbar höheren Halbwertszeiten auswirkt.

Je nach Einsatzzweck des Reaktors sind also die Flussraten anzupassen. Für quantitative Umsetzungen z. B. in der organischen Synthese oder zur Entfernung von Zwischenprodukten sollten langsame Flussraten und große Schüttungen eingesetzt werden. Zur Bestimmung von kinetischen Daten sollten die Kontaktzeiten jedoch minimiert werden, damit keine Durchschnittsgeschwindigkeit, sondern eine Anfangsgeschwindigkeit gemessen wird. Das kann durch Verkleinerung der Schüttung oder höhere Flussraten erreicht werden.

Der Vorteil ist, dass sich das System schneller äquilibriert und immer frisches Substrat zur Verfügung steht. Aber auch hier gibt es Grenzen. So sollte die Schüttung aus mindestens einer geschlossenen Partikelschicht bestehen, da die Substratlösung sonst ohne Kontakt mit den Partikeln vorbeiströmen kann. Außerdem führen zu hohe Flussraten zu minimalen Umsätzen, die unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegen könnten.

Die normierte Reaktionsrate ist proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit.

Um die Ergebnisse besser mit Ergebnissen der Mikrotiterplatte vergleichen zu können, wurde die Reaktionsrate r nach Gleichung (26) bzw. (30) in die Reaktionsgeschwindigkeit v umgerechnet, deren Werte an der zweiten y-Achse in Abbildung 56A abgelesen werden können. Da im mikrofluidischen Reaktor immer nur die Konzentrationsänderung nach komplettem Durchfluss bestimmt wurde (Endpunktmessung), handelt es sich nicht um die Anfangsgeschwindigkeit, sondern – besonders bei langsamen Flussraten mit signifikantem Umsatz – um eine Durchschnittsgeschwindigkeit.

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta n}{V_{Zw} \cdot \Delta t} = \frac{r}{V_{Zw}} \quad (26)$$

Dabei ist V_{Zw} das Volumen der Zwischenräume der Schüttung, das in der englischsprachigen Literatur meist als „void volume“ oder bezeichnet wird. Wie in Abschnitt 2.4.4 hergeleitet, besteht das Volumen der Schüttung nach Gleichung (18) zu 58,5 % aus Partikeln, so dass 41,5 % als Zwischenraum zur Verfügung stehen, was durch Gleichung (27) und (28) ausgedrückt wird.

$$V_{Partikel} = \frac{58,5 \% V_{Schüttung}}{N} \quad (27)$$

$$V_{Zw} = 41,5 \% V_{Schüttung} \quad (28)$$

Umformen von Gleichung (27) nach $V_{Schüttung}$ und einsetzen in Gleichung (28) ergibt die Beziehung des Zwischenraumvolumens V_{Zw} und $V_{Partikel}$ nach Gleichung (29).

$$V_{Zw} = 41,5 \% \frac{N \cdot V_{Partikel}}{58,5 \%} \quad (29)$$

Einsetzen von Gleichung (29) in Gleichung (26) ergibt schließlich den gesuchten Zusammenhang, wobei $V_{Partikel}$ nach Gleichung (20) berechnet wird.

$$v = \frac{r}{V_{Zw}} = \frac{58,5 r}{41,5 N} \cdot \frac{1}{V_{Partikel}} = \frac{r}{N} \cdot \frac{1}{3,714 \cdot 10^{-13} \text{L}} = \frac{r}{N} \cdot 2,692 \cdot 10^{12} \text{L}^{-1} \quad (30)$$

Die Geschwindigkeit ist damit proportional zur Reaktionsrate pro Partikel. Der Proportionalitätsfaktor ist der Kehrwert des Zwischenraumvolumens pro Partikel.

Aus der Beladung σ (aus Tabelle 6, Seite 76) und V_{Zw} kann schließlich auch die Pseudokonzentration $[E]_{pseudo}$ innerhalb der Schüttung nach Gleichung (31) berechnet werden. Im Vergleich zur homogenen Katalyse liegen hier die Enzyme nicht gleichmäßig im Volumen gelöst vor, sondern sie sind auf der Oberfläche der Partikel lokalisiert. Interessant ist, dass die Enzymkonzentration unabhängig von der Größe der Schüttung ist, da bei Erhöhung der Partikelzahl auch das betrachtete Zwischenraumvolumen steigt.

$$[E]_{pseudo} = \frac{n}{V} = \frac{N \cdot \sigma}{V_{Zw}} = \frac{58,5 \cdot \sigma}{41,5 \cdot V_{Partikel}} = 12 \pm 3 \mu\text{M} \quad (31)$$

Die berechneten Geschwindigkeiten v in Abbildung 56A sind im zwei- bis dreistelligen μMs^{-1} Bereich, was in der Mikrotiterplatte (vgl. Abschnitt 2.1.2.2) nur schwer erreicht werden kann. Ursache ist die hohe lokale Enzymkonzentration $[E]_{pseudo} = 12 \pm 3 \mu\text{M}$ (in der Mikrotiterplatte üblicherweise 0,1 nM, also Faktor 120.000 niedriger) verbunden mit der sehr schnellen Substratbereitstellung. Das Zwischenraumvolumen beträgt ca. $3,7 \cdot 10^{-5} \mu\text{L}$ ($N = 100$ Partikel) bis $2,6 \cdot 10^{-4} \mu\text{L}$ ($N = 700$ Partikel), so dass die daraus resultierenden Kontaktzeiten je nach Flussrate von ca. 4 bis 220 ms variieren.

Um die Maximalgeschwindigkeit v_{max} und die Michaeliskonstante K_M zu bestimmen, wurden die Reaktionsraten bzw. Reaktionsgeschwindigkeiten in Abbildung 56A nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) nichtlinear angepasst. Die Parameter sind in Tabelle 8 aufgelistet und wurden außerdem in Abbildung 57 gegen die Flussrate aufgetragen. Die Wechselzahl k_{cat} konnte schließlich nach (32) aus v_{max} bzw. r_{max}/N berechnet werden und ist zum Vergleich ebenfalls in Tabelle 8 angegeben.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]_{pseudo}} = \frac{\frac{r_{max}}{V_{Zw}}}{\frac{N \cdot \sigma}{V_{Zw}}} = \frac{r_{max}}{N \cdot \sigma} \quad (32)$$

Tabelle 8: Parameter des nichtlinearen Fits der Daten aus Abbildung 56A und B nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) der Mikrofluidik mit HRP-beschichteten Partikeln. Zum Vergleich sind die Ergebnisse aus der Mikrotiterplatte für partikelgebundene und freie bHRP aus Tabelle 6 angegeben.

$Q / \mu\text{L min}^{-1}$	$r_{max}/N [\text{amol s}^{-1} \text{Partikel}^{-1}]$	$v_{max} / \mu\text{M s}^{-1}$	$K_M / \mu\text{M}$	k_{cat} / s^{-1}
0,5	162 ± 12	438 ± 33	31 ± 3	36 ± 10
0,2	109 ± 6	294 ± 17	29 ± 2	24 ± 7
0,1	97 ± 6	262 ± 17	38 ± 3	22 ± 6
0,07	85 ± 4	229 ± 10	42 ± 3	19 ± 5

in der Mikrotiterplatte nach Tabelle 6:

- in Lösung		nicht	$60,5 \pm 0,7$	389 ± 3
- auf Partikeln	608 ± 35	vergleichbar	93 ± 5	135 ± 39

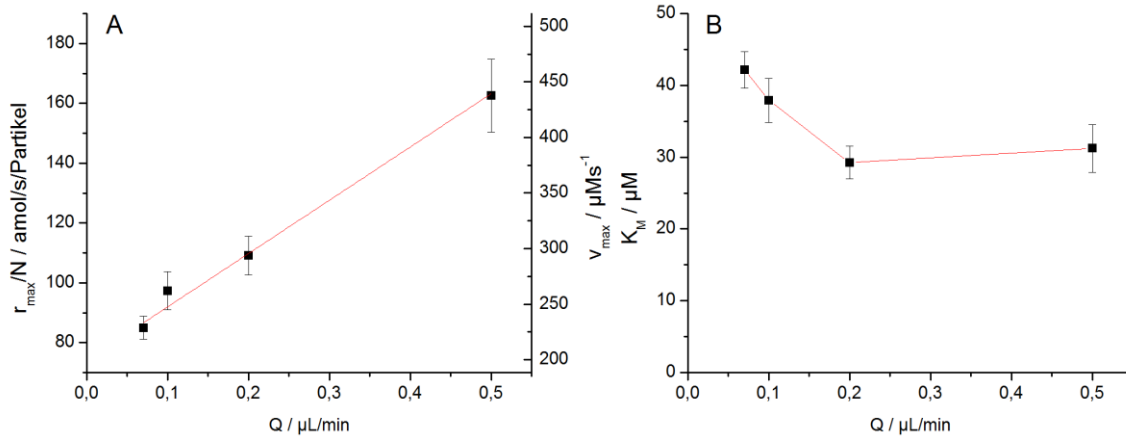


Abbildung 57: **A:** Auftragung der maximalen Reaktionsrate pro Partikel r_{max}/N bzw. der maximalen Geschwindigkeit v_{max} gegen die Flussrate Q , sowie lineare Regression der Daten. **B:** Auftragung der Michaeliskonstante K_M gegen die Flussrate Q , hier wurde ein asymptotisches Verhalten beobachtet.

Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} bzw. r_{max}/N steigt mit höheren Flussraten.

Die Parameter zeigen erwartungsgemäß eine Abhängigkeit von der Flussrate. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} bzw. r_{max}/N nahm bei höheren Flussraten zu, was vergleichbar ist mit der Flussratenabhängigkeit von v , die in Abbildung 56A erkennbar ist. Dieses Verhalten wurde dort bereits ausführlich diskutiert und durch Zufuhr von frischem Substrat erklärt. Im mikrofluidischen Reaktor kann also durch Erhöhung der Flussrate die maximale Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden. Die über die Beladung berechneten k_{cat} -Werte sind proportional dazu und liegen 11 bis 19mal niedriger, als der für das freie Enzym bestimmte Wert $k_{cat} = 389 \pm 3 \text{ s}^{-1}$. Dies liegt an den in Abschnitt 2.3.1 und 2.3.4 diskutierten

Gründen der schlechteren Substratzugänglichkeit, ungünstigen Anordnungen der aktiven Zentren und Oberflächeneffekten, die generell die Geschwindigkeit immobilisierte Enzyme herabsetzen.

Um einen vergleichbaren Wert zu finden, der nicht von den genannten Effekten beeinflusst wird und unabhängig von der tatsächlichen Beladung ist, wurde in Abschnitt 2.3.4 die auf die Partikelzahl normierte Reaktionsrate $r_{max}/N = 608 \pm 35$ amol/s/Partikel in der Mikrotiterplatte für partikelgebundene bHRP bestimmt. Der Vergleich mit den in der Mikrofluidik gemessenen Werten (162 – 85 amol/s/Partikel) zeigt jedoch, dass sie abhängig von der Flussrate immer noch um einen Faktor 4 bis 7 niedriger ausfallen. Da die Enzyme bei den Vergleichsmessungen ebenfalls auf Partikeln immobilisiert vorlagen, können die Unterschiede nur folgendermaßen erklärt werden:

- 1) In der Mikrofluidik kam es bei niedrigen Flussraten zu nahezu vollständigem Umsatz. Auch bei den höheren Flussraten wurde bis zu 30 % der Substrate umgesetzt, wie im Anhang in Abbildung 93 erkennbar ist. Es waren also alle Messungen von Substraterschöpfung betroffen, was zu erniedrigten Werten für r_{max}/N führt. Anstelle einer Anfangsgeschwindigkeit wie in der Mikrotiterplatte, wurde hier demnach eine Durchschnittsgeschwindigkeit gemessen. Eine weitere Erhöhung der Flussrate würde zu weniger Substraterschöpfung führen, was den Trend in Abbildung 57A weiter fortsetzen und zu höheren maximalen Reaktionsraten führen würde.
- 2) Die lokale Enzymkonzentration im Mikroreaktor war mit $[E]_{pseudo} = 12 \pm 3 \mu\text{M}$ extrem hoch, was ebenfalls die Effizienz der Reaktion erniedrigte. Die Vergleichsmessung in der Mikrotiterplatte wurde mit 1450 Partikeln pro Vertiefung (100 μL) durchgeführt, was bei einer Beladung von $\sigma = 4,5$ amol/Partikel einer Pseudokonzentration von 65 pM entspricht. Bei den verwendeten Mikrotiterplatten entsprachen 100 μL einer Füllhöhe von 3 mm. Selbst unter Annahme, dass sich die Partikel nur in der untersten Schicht (50 μm) der Vertiefungen befänden, wäre die lokale Pseudokonzentration mit 3,9 nM immer noch um den Faktor 3000 niedriger. Darüber hinaus wurden die Partikel vor jeder Messung aufgewirbelt, so dass

vermutlich keine Diffusionslimitierung in Form von Substratverarmung auftrat, vergleiche S. 35.

- 3) Die Partikel lagen in der Mikrofluidik als kompakte Schüttung vor, wobei besonders die im Inneren liegenden Partikel von bis zu 12 Nachbarn umgeben waren. Die Enzyme an den entsprechenden Berührungspunkten wurden verdeckt und konnten nicht an der Reaktion teilnehmen. In der Mikrotiterplatte dagegen lagen die Partikel frei verteilt auf dem Boden der Vertiefungen. Aus der Grundfläche $A = 33 \text{ mm}^2$ kann der mittlere Abstand der Partikel zu ca. $150 \mu\text{m}$ abgeschätzt werden. Auch die Berührungspunkte mit der Oberfläche kamen durch regelmäßiges Schütteln der Mikrotiterplatte im Lesegerät in Kontakt mit frischem Substrat.
- 4) Die Partikel im Vergleichsexperiment in der Mikrotiterplatte wurden ausgiebig gewaschen, um Verfälschungen der Ergebnisse durch freie Enzyme zu verhindern. In der Mikrofluidik wurden die Partikel erst an den Fritten gewaschen. Es zeigte sich aber, dass die Enzymaktivität besonders durch hohe H_2O_2 -Konzentrationen verbunden mit hohen Flussraten nachließ, da vermutlich die Bindungsfähigkeit des STV dadurch abnahm und es zu Verlusten von Enzymen kam. In der Mikrotiterplatte verblieben abgelöste Enzyme in den Vertiefungen und erhöhten durch die vermehrten Freiheitsgrade sogar die beobachteten Reaktionsraten. In der Mikrofluidik wurden diese Effekte bei der Auswertung durch exponentielle Anpassungen ausgeglichen, allerdings ist in Abbildung 54 und Abbildung 55A erkennbar, dass besonders bei 100 und $40 \mu\text{M}$ H_2O_2 in den ersten 20 bis 30 min die Umsätze überproportional abnahmen. Diese starken Verluste, die vermutlich auch schon vor Beginn der Datenaufnahme in der Wasch- und Äquilibrierphase auftraten, wurden durch die exponentielle Anpassung zu wenig berücksichtigt und führten bei der Auswertung schließlich zu niedrigeren Werten für r_{max}/N bzw. v_{max} .

Die Literatur zeigt ebenfalls einen Anstieg der Wechselzahl k_{cat} .

In der Literatur wurden ähnliche Trends beschrieben. Kerby et al. diskutierten die veröffentlichten Ergebnisse von Mikroreaktoren mit immobilisierten Enzymen verschiedener Arbeitsgruppen und kamen zu dem Schluss, dass die Wechselzahlen häufig niedriger waren (Faktor 5-28) als in Lösung, was mit der in dieser Arbeit beobachteten Abnahme um den

Faktor von 11 – 19 übereinstimmt. Als Ursachen wurden erniedrigte Enzymaktivität durch Konformationsänderungen bei der Immobilisierung, sterische Hinderung des aktiven Zentrums, oder eine Kombination aus beidem diskutiert. Außerdem könnte eine Diffusionsschicht um die Immobilisate zu begrenztem Massentransfer führen und die Reaktion verlangsamen.^[139]

Seong et al. funktionalisierten ebenfalls 15 μm STV-beschichtete Mikropartikel mit bHRP und bestimmten die Kinetik im Festbettreaktor mit H_2O_2 und Amplex Red.^[112] Die Auswertung erfolgte nach dem Modell von Lilly und Hornby für die Michaelis Menten Kinetik in Festbettreaktoren.^[138] Sie beobachteten ebenfalls eine Beschleunigung der Reaktion bei steigender Flussrate, allerdings wurde k_{cat} nicht explizit berechnet, und das Ergebnis konnte deshalb nicht mit dem freien Enzym verglichen werden.^[112]

Logan et al. immobilisierten HRP auf porösen polymeren Monolithen in Form von definierten Flächen. Die Kinetik der H_2O_2 /Amplex Red Reaktion wurde orts aufgelöst über die Bildung von Resorufin verfolgt. Auch ohne Variation der Konzentrationen konnten so über den Umsatz nach einem angepassten Michaelis Menten Modell v_{max} und K_M bestimmt werden. Bei Erhöhung der Flussrate von 0,083 auf 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurde eine Steigerung von v_{max} um den Faktor 4 beobachtet, allerdings fehlt der Vergleich mit dem freien Enzym.^[63]

Diese Beispiele zeigen ebenfalls, dass v_{max} bzw. k_{cat} mit steigender Flussrate ansteigen. Der Vergleich mit freiem Enzym führt entweder zu einer starken Erniedrigung oder die Daten wurden nicht erhoben.

Die K_M -Werte nehmen bei höheren Flussraten ab.

Bei K_M war das Verhalten umgekehrt, der Wert nimmt in Abbildung 57B mit steigender Flussrate ab und scheint sich asymptotisch einem Sättigungswert bei ca. 30 μM anzunähern. Im Vergleich zum immobilisierten Enzym in der Mikrotiterplatte war dieser Wert um den Faktor 3 erniedrigt. Da K_M im Bezug zur Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes steht,^[109] stieg also die Affinität bzw. die Bindungsfähigkeit in der Mikrofluidik und nahm bei höheren Flussraten weiter zu.

In der Literatur wurde in der in der klassischen Veröffentlichung von Lilly et al. ein ähnliches asymptotisches Verhalten beobachtet.^[138] Im Festbettreaktor untersuchten die Autoren die Hydrolyse eines Esters durch auf Cellulose immobilisiertes Ficin und

entwickelten ein Modell basierend auf der integrierten Michaelis Menten Gleichung. Die Abnahme von K_M wurde durch eine Diffusionsschicht um die Partikel erklärt, die bei langsamen Flussraten größer war und den Stoffaustausch mit der Lösung hemmte. Bei langsamen Flussraten bestand also ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Enzymoberfläche und Lösung, der sich ungünstig auf die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes auswirkte. Bei höheren Flussraten relativierte sich der Effekt und die Affinität nahm zu, was zu den erniedrigten K_M -Werten führte.

Der Literaturvergleich von Kerby et al. zeigt bei den K_M -Werten ein weniger einheitliches Bild. Verglichen mit dem freien Enzym wurden sowohl erhöhte als auch erniedrigte Michaeliskonstanten veröffentlicht.^[139] Ähnlich verhält es sich auch mit den veröffentlichten Daten für HRP-Fluidik. Logan & Clarke fanden keine eindeutige Abhängigkeit von der Flussrate und gaben nur einen Mittelwert ($K_M^{app} = 1,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$) an, der aber unter anderen Bedingungen gemessen wurde und deshalb nicht mit den hier bestimmten Werten von 29 – 42 μM vergleichbar ist. Der Vergleich mit dem freien Enzym fehlt ebenfalls.^[63]

Bei Seong et al. stiegen die K_M -Werte nahezu linear mit der Flussrate um den Faktor 6. Für den Vergleich mit dem freien Enzym argumentierten die Autoren, dass kein Fluss vorliegen dürfe, um nicht die „intrinsische Enzymkinetik zu maskieren“. Der auf $Q = 0$ extrapolierte K_M -Wert entsprach dem in homogener Lösung gemessenen Wert.^[112] Die Argumentation und Ergebnisse widersprechen aber laut Kerby dem Modell von Lilly und Hornby.^[139]

Die mit dieser Arbeit vergleichbaren Werte für $Q = 0,2$ und $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ sind $K_M = 2,32$ und $6,25 \mu\text{M}$.^[112] Da die Autoren nur $10 \mu\text{M}$ Amplex Red eingesetzt haben, mussten die Werte wegen des Mehrsubstratmechanismus nach Abschnitt 2.1.2.1 verzehnfacht werden, um mit den Ergebnissen dieser Arbeit mit $100 \mu\text{M}$ Amplex Red ($K_M = 29 - 42 \mu\text{M}$) vergleichbar zu sein. Die Werte lägen dann in der gleichen Größenordnung, jedoch ist der Trend umgekehrt.

Die berechneten Werte r_{max}/N und K_M werden in Abschnitt 2.7 für die zweistufige Reaktion mit GOX- und HRP-beschichteten Partikeln benötigt. Aus den Resorufinumsätzen kann so die zugrunde liegende H_2O_2 -Konzentration bestimmt werden, aus der dann die Kinetik von GOX berechnet werden kann.

2.6 Mikrofluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln

Nachdem im letzten Abschnitt die Kinetik von HRP ausgiebig untersucht wurde, wurde nun GOX auf Partikeln immobilisiert und in der Mikrofluidik charakterisiert. Wie schon in der Mikrotiterplatte stellte sich das Problem, dass weder Edukte, noch Produkte fluoreszenzspektrometrisch gemessen werden konnten. Deshalb wurde hier (wie in der Mikrotiterplatte) HRP als Reporterenzym verwendet. Aus der Resorufinkonzentration konnte somit auf die vorliegende H_2O_2 -Konzentration zurückgerechnet werden und damit die Kinetik von GOX bestimmt werden.

Die Zugabe des Reporterenzym konnte auf zwei Arten erfolgen. Entweder wurde es der Substratlösung beigemischt, oder HRP-funktionalisierte Partikel wurden auf die flussabwärts liegende Fritte eingebracht. Experimentell war die erste Methode einfacher, da nur mit einer Art von Partikeln gearbeitet wurde und entsprechend nur eine Fritte befüllt werden musste. Nachteilig war aber, dass die Farbreaktion erst hinter der Fritte in der fließenden Lösung stattfand, was die Auswertung der Fluoreszenz erschwerte.

In Abschnitt 2.6.1 wurde zunächst wie schon bei HRP mit konstanter Substratkonzentration gemessen und die Flussrate stufenweise variiert. Wegen der höheren Stabilität der Enzyme wurde außerdem versucht, in einem Experiment sowohl die Flussrate, als auch die Konzentration der Glukose zu variieren. Die Ergebnisse wurden später in Abschnitt 2.6.2 diskutiert. In Abschnitt 2.7 wurde schließlich auch das Reporterenzym auf Partikeln immobilisiert und auf der flussabwärts liegenden Fritte positioniert.

2.6.1 Variation der Flussrate

Die Experimente mit konstanter Glukosekonzentration wurden analog zu den bisher besprochenen HRP Experimenten durchgeführt. Das Anschlussschema ist in Abbildung 58 dargestellt. Die Unterschiede war, dass nun bGOX an der Fritte lokalisiert war und die Substratlösung statt H_2O_2 , Glukose und das Reporterenzym HRP enthielt. Die Flussrate wurde stufenförmig nach dem in Abschnitt 2.5.3.1 vorgestellten optimierten Flussprofil variiert, bei dem zur Stabilisierung der Strömung kontinuierlich durch den Seitenkanal S1 mit $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ abgesaugt wurde. Der abgezweigte Anteil des Flusses wurde durch eine um $+0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ erhöhte Flussrate der Substratlösung ausgeglichen.

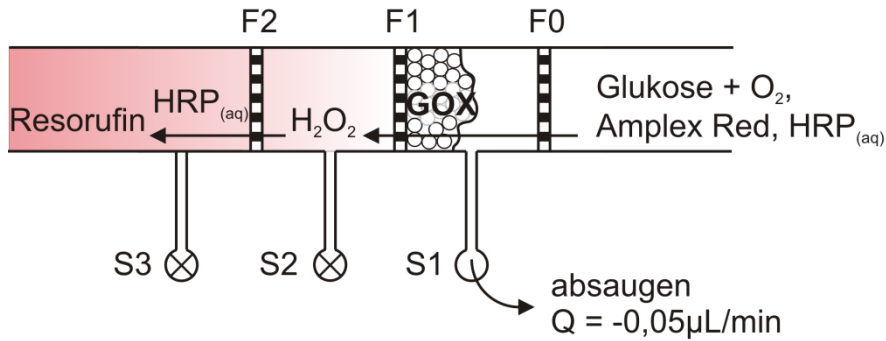


Abbildung 58: Fließschema für die GOX-Messungen mit kontinuierlichem Absaugen durch den Seitenkanal. An der GOX-beladenen Fritte wird H_2O_2 produziert, das flussabwärts mit gelöstem nHRP Amplex Red zu Resorufin oxidiert. Die Fluoreszenz entwickelt sich erst in der Lösung hinter der Schüttung.

Bei den GOX Experimenten fand an der GOX enthaltenden Fritte die Reaktion mit Glukose statt, bei der H_2O_2 gebildet wurde. Das H_2O_2 wurde mit der jeweiligen Flussrate weitertransportiert und oxidiert, katalysiert durch das in der Substratlösung gelöste HRP, Amplex Red zu Resorufin. Die Fluoreszenz entwickelte sich also erst in der sich kontinuierlich bewegenden Lösung hinter der Fritte. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte deshalb auch erst flussabwärts hinter der GOX-Fritte. Ein exemplarisches Fluoreszenzbild ist in Abbildung 59A dargestellt.

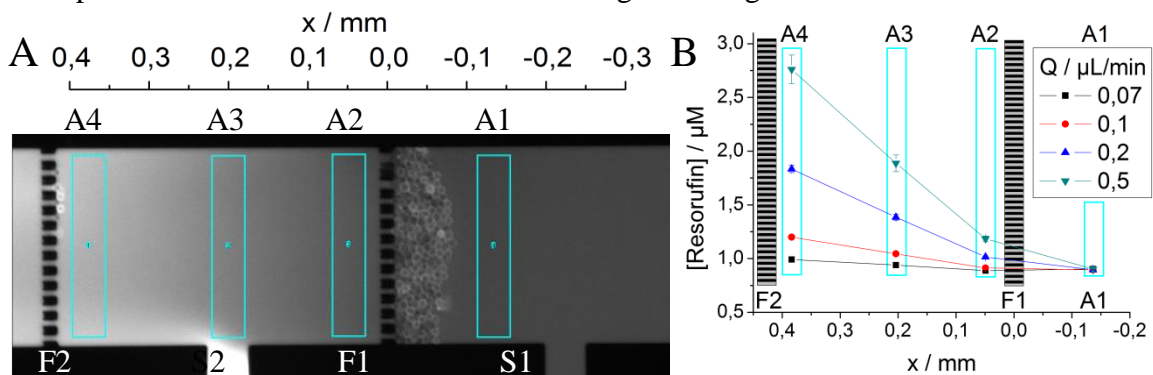


Abbildung 59: **A:** Das Fluoreszenzbild des Hauptkanals zeigt die Fluoreszenzentwicklung in der Lösung hinter der GOX-beladenen Fritte während der Reaktion mit 25 mM Glukose, 100 μM Amplex Red und 1 nM $\text{HRP}_{(\text{aq})}$. In den markierten Auswertungsbereichen A1 – A4 wurde mit ImageJ die Helligkeit ermittelt und für die Auswertung verwendet. Das Bild wurde aufgenommen nach $t = 28$ min bei $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$. **B:** Auftragung der gemessenen Resorufinkonzentrationen der Bereiche A1 – A4 des in A gezeigten Reaktors bei verschiedenen Flussraten.

Die Aufnahmen zeigten im Bereich der Fritte keine Fluoreszenzentwicklung, da das H_2O_2 hier erst produziert wurde. Die Fluoreszenzzunahme erfolgte erst in Flussrichtung hinter der F1 und wurde verursacht durch die in Lösung stattfindende Peroxidase-reaktion.

Der flussabwärts liegende Seitenkanal S2 enthielt HRP-haltige Substratlösung, die nicht abtransportiert wurde. Durch die lange Reaktionszeit kam es hier zu vollständigem Umsatz, der die Lösung hell leuchten ließ. Durch die Strömung im Hauptkanal wurde aus S2 fluoreszentes Resorufin herausgewaschen, das sich als schwache Fahne entlang der unteren Kanalwand bemerkbar machte. Das bereits erwähnte kontinuierliche Absaugen mit $Q = 0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ fand am rechten Seitenkanal S1 statt, wo deshalb auch keine Fluoreszenz erkennbar war.

Die Substratlösung vor der Fritte F1 war bereits schwach fluoreszierend. Ursache dürfte hier die bereits erläuterte unspezifische Oxidation von Amplex Red sein.

Die Helligkeit der markierten Bereiche A1 – A4 in den Fluoreszenzbildern in Abbildung 59A wurde für die gesamte Trajektorie mit ImageJ bestimmt. Daraus wurden für ausgewählte Flussraten die Mittelwerte bestimmt und in Abbildung 59B gegen die x-Koordinate, die der Distanz im Hauptkanal entspricht, aufgetragen. Die quantitative Auswertung zeigte, dass die Fluoreszenz größtenteils erst in A2 – A4 und damit hinter der Fritte F2 entstand. Beim Durchlaufen der Schüttung wurde zwar bereits H_2O_2 gebildet und konnte mit dem in der Substratlösung vorliegenden HRP Amplex Red oxidieren. Da hier die H_2O_2 -Konzentration aber noch anstieg, und die Verweilzeit in der Schüttung (58,5 % Raumausfüllung, vgl. Abschnitt 2.4.4) sehr kurz war, konnte der Bereich zwischen A1 und A2 nicht quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzzunahme in A2 – A4 war dann steiler und erfolgte annähernd linear.

Je geringer die Flussrate war, desto mehr H_2O_2 wurde von den GOX-Partikeln produziert und desto mehr Resorufin wurde flussabwärts von HRP gebildet. Die Flussratenabhängigkeit war stärker als bei HRP in Abschnitt 2.5.3, da bei Verringerung der Flussrate nicht nur die Kontaktzeit mit der GOX-Fritte stieg, was zu höherer H_2O_2 -Konzentration führte ($[\text{H}_2\text{O}_2] \sim Q^{-1}$), sondern sich auch die Transportzeit zwischen den Auswertungsbereichen verlängerte. Damit war auch die Reaktionszeit des Reporterenzym HRP verlängert ($\Delta t \sim Q^{-1}$). Bei der niedrigsten Flussrate $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ war sie um den Faktor 7 größer, als bei der höchsten Flussrate von $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$. Daraus ergab sich insgesamt eine Proportionalität für den Umsatz $\Delta[\text{Res}] \sim \Delta t \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \sim Q^{-2}$ und ein Faktor von ca. 50, von der niedrigsten zur höchsten Flussrate.

In Abbildung 60 ist der Verlauf des Experiments dargestellt. Teilabbildung A zeigt vergrößert den ersten Zyklus, Teilabbildung B zeigt dasselbe Experiment über den gesamten gemessenen Zeitraum.

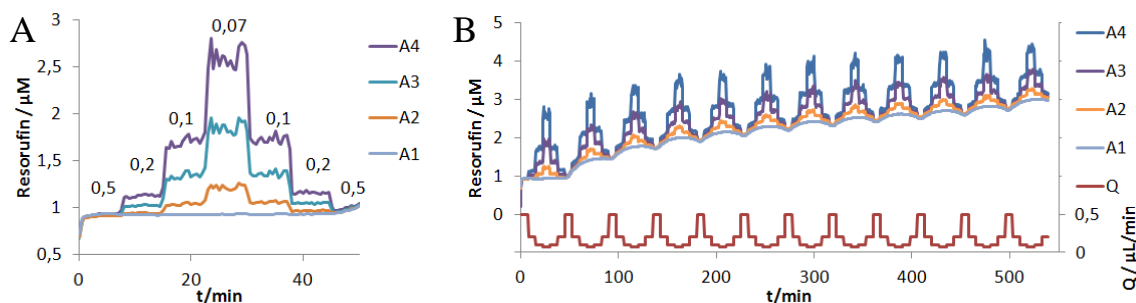


Abbildung 60: Resorufinkonzentration an verschiedenen Auswertungsbereichen A1 – A4 im Reaktor vor und nach der GOX-beladenen Fritte beim Experiment mit 25 mM Glukose, 100 µM Amplex Red und 1 nM HRP_(aq). **A:** Darstellung des ersten Zyklus mit $Q = 0,5; 0,2; 0,1; 0,07$ µL/min. Resorufin wird erst in der Lösung hinter der GOX-beladenen Fritte gebildet. **B:** Der gesamte Reaktionsverlauf über 9 h. Der Hintergrund nimmt zu, aber die enzymkatalysierte Reaktion bleibt konstant mit der Zeit.

Jede Kurve in Abbildung 60A entspricht dem Verlauf der gemessenen Resorufinkonzentration an den in Abbildung 59 dargestellten Bereichen A1 – A4. Die jeweiligen Stufen entstanden durch die Veränderung der Flussrate. Wie oben diskutiert, führten höhere Flussraten zu geringerer H₂O₂-Produktion verbunden mit geringerer Resorufinproduktion und umgekehrt. Die höchsten Signale entsprachen ca. 3 µM Resorufin, so dass in diesem Experiment von den eingesetzten 100 µM Amplex Red nur maximal 3 % umgesetzt wurden. Der lineare Kurvenverlauf in Abbildung 59B beweist aber, dass genügend H₂O₂ gebildet wurde. Beide Substrate waren also noch nicht verbraucht und die Reaktion noch nicht abgeschlossen. Die reagierende Lösung wurde aber je nach Flussrate nach ca. 0,6 – 4 s aus dem beobachteten Bereich heraus transportiert. Die scharfen Konturen der Stufen zeigten, dass sich das System schnell an die veränderten Flussraten anpasste. Das Rauschen des Signals lag durchschnittlich bei 3 %, was ebenfalls die exzellente Datenqualität bestätigt.

Das Experiment wurde insgesamt 9 h laufen gelassen. In Abbildung 60B ist der gesamte Verlauf dargestellt. Die Signale und deren Stufenstruktur blieben, anders als bei bHRP in Abschnitt 2.5.3, über die lange Zeit erhalten. Der Hintergrund (A1) nahm stufenweise zu, was durch langsame unspezifische Oxidation des Amplex Red durch das in Lösung befindliche nHRP verursacht wurde. Dadurch bedingt stiegen auch sämtliche Signale im Verlauf des Experiments an.

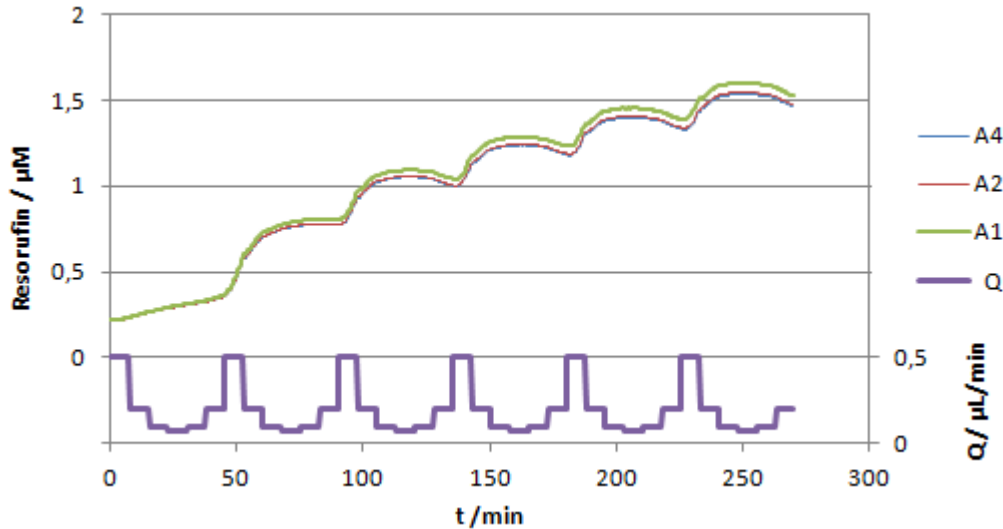


Abbildung 61: Kontrollelexperiment ohne Glukose: Resorufinkonzentrationen an verschiedenen Positionen im Reaktor vor und nach der GOX-beladenen Fritte. Kurven A4 und A2 unterscheiden sich um etwa 0,5% und sind deshalb nahezu deckungsgleich. Konzentrationen: 100 μM Amplex Red, keine Glukose und 1 nM $\text{HRP}_{(\text{aq})}$.

Das gleiche Experiment wurde als Negativkontrolle ohne Glukose durchgeführt. In Abbildung 61 ist der Reaktionsverlauf dargestellt. Auch hier zeigte sich eine stufenweise ansteigende Resorufinkonzentration im Zulauf mit der Zeit. Der Anstieg von 1,4 μM in 270 min war in der gleichen Größenordnung wie der Hintergrund (A1) in Abbildung 60. Das Resorufin wurde, wie bereits diskutiert, durch in der Substratlösung vorhandenes 1 nM HRP und durch Photoaktivierung gebildet. Darüber hinaus könnten biologische Kontaminationen^[136] ähnlich wie bei der Kontrolle in der HRP-Fluidik ohne H_2O_2 zu unspezifischer Oxidation von Amplex Red oder zur unspezifischen Bildung von H_2O_2 geführt haben (Abbildung 53G, Seite 107). Das geschah jedoch unspezifisch im Vorlauf des Reaktors, in den Schläuchen und in den Spritzen.

Beim Vergleich der Kurven untereinander fällt auf, dass die Resorufinkonzentration beim Durchströmen der Fritte leicht sank ($A1 > A2$) und danach annähernd konstant blieb ($A2 \approx A4$, Kurven sind deckungsgleich). In der kurzen Zeit des Durchströmens des Beobachtungsbereichs fand also keine signifikante unspezifische Oxidation statt.

Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 60 genügte es, die Resorufinkonzentrationen in A2 und A4 zu ermitteln und die Differenz zu bilden, wobei die Auswertungsbereiche bei Verschmutzung um einige μm verschoben wurden. In Abbildung 62 sind die entsprechenden Differenzen $\Delta[\text{Res}]$ aus drei unabhängigen

Experimenten E1 – E3 sowie der Kontrolle ohne Glukose aufgetragen. Die weiteren Experimente wurden nur noch über 6 Zyklen (270 min) gemessen.

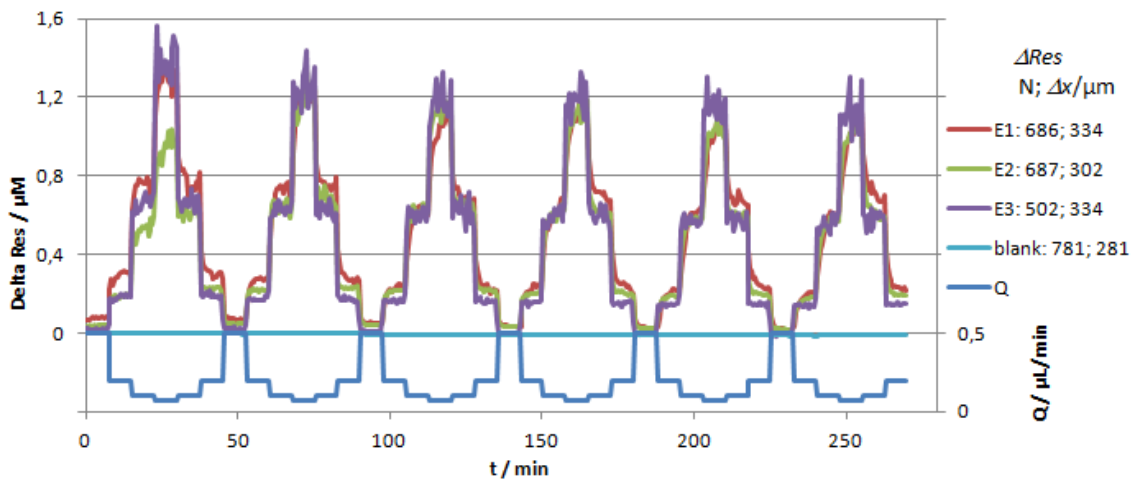


Abbildung 62: Profile von 3 Replikaten der Reaktion von partikelgebundenem GOX mit 25 mM Glukose, 100 μM Amplex Red und 1 nM $\text{HRP}_{(\text{aq})}$. Die Kontrolle (blank) wurde ohne Glukose gemessen. In der Legende sind zu jedem Experiment die Partikelzahl und die Abstände der Auswertungsfenster A2 und A4 angegeben.

Die Kurven der drei Experimente E1 – E3 waren nahezu identisch. E3 entsprach dem Beispiel aus Abbildung 60. Die Kurven zeigten klare Stufen in Abhängigkeit von der Flussrate, die zur bereits diskutierten Proportionalität von $\Delta[\text{Res}] \sim Q^2$ passten. Allerdings war die Signalstabilität bei niedrigen Flussraten schlechter, was, wie in Abschnitt 2.5.3.1 diskutiert, an den stärkeren Druckschwankungen und Turbulenzen an den Kreuzungen lag.

Im Gegensatz zu den HRP-Experimenten in Abschnitt 2.5.3 nahmen die Signale im Verlauf des Experiments nur wenig ab. Als Ursachen wurden dort die H_2O_2 -Konzentration und die Strömung diskutiert. Da die Flussratenprofile identisch waren, hatte die Strömung nur minimalen Einfluss auf die Alterung. Die dort beobachtete Alterung musste also durch die H_2O_2 -Konzentration verursacht worden sein. Bei der GOX-Fluidik wurde das H_2O_2 *in situ* erzeugt und hatte damit keinen deaktivierenden Effekt auf die beteiligten Enzyme. Deshalb konnte hier auf die Alterungskorrektur verzichtet werden.

Bei E2 war der erste Zyklus etwas niedriger, was wahrscheinlich am noch nicht vollständigen Austausch der Lösungen im Bereich der Fritten oder an ungenügender Temperierung lag. Die Kontrolle ohne Glukose blieb hier – anders als es in Abbildung 60 und Abbildung 61 beobachtet wurde – konstant, da durch Differenzbildung nur die Reaktion in der Lösung hinter der Fritte ausgewertet wurde, wo kein erkennbarer Umsatz stattfand.

Aus dem Umsatz konnte die H₂O₂-Konzentration berechnet werden.

Um aus den Umsätzen $\Delta[\text{Res}]$ die H₂O₂-Konzentration zu berechnen, musste zunächst die Kinetik des Reporterenzym bestimmt werden. Da HRP hier in homogener Lösung vorlag, erfolgte die Auswertung über die Anfangsgeschwindigkeit v_0 . Sie ist definiert als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit und entspricht, wegen des linearen Verlaufs in Abbildung 59B, der Durchschnittsgeschwindigkeit $v = \Delta[\text{Res}]/\Delta t$. Wie in Gleichung (25) konnte das Zeitintervall aus Flussrate Q und Volumen des Auswertungsbereichs berechnet werden. Das Volumen ergab sich wiederum aus dem Kanalquerschnitts $b \cdot h$ sowie dem jeweiligen Abstand der Auswertungsbereiche Δx . Mit diesen Daten konnte die Anfangsgeschwindigkeit schließlich nach Gleichung (33) berechnet werden.

$$v_0 = \frac{\Delta[\text{Res}]}{\Delta t} = \frac{\Delta[\text{Res}] \cdot Q}{\Delta V} = \frac{\Delta[\text{Res}] \cdot Q}{\Delta x \cdot b \cdot h} \quad (33)$$

Um die Datenmenge weiter zu reduzieren, wurden über alle Zyklen die letzten 7 Messpunkte jeder Stufe gemittelt, die Kontrolle subtrahiert und die so erhaltenen gemittelten Anfangsgeschwindigkeiten in Abbildung 63A gegen die Flussrate aufgetragen. Die drei Experimente konnten hier noch nicht wie bei HRP in Abschnitt 2.5.3 auf die Partikelzahl normiert und gemittelt werden. Die vom GOX produzierte H₂O₂-Menge war zwar annähernd proportional zur Partikelzahl, sie ist aber über die Michaelis-Menten-Gleichung mit der Geschwindigkeit des Reporterenzym verknüpft und damit nicht mehr linear abhängig.

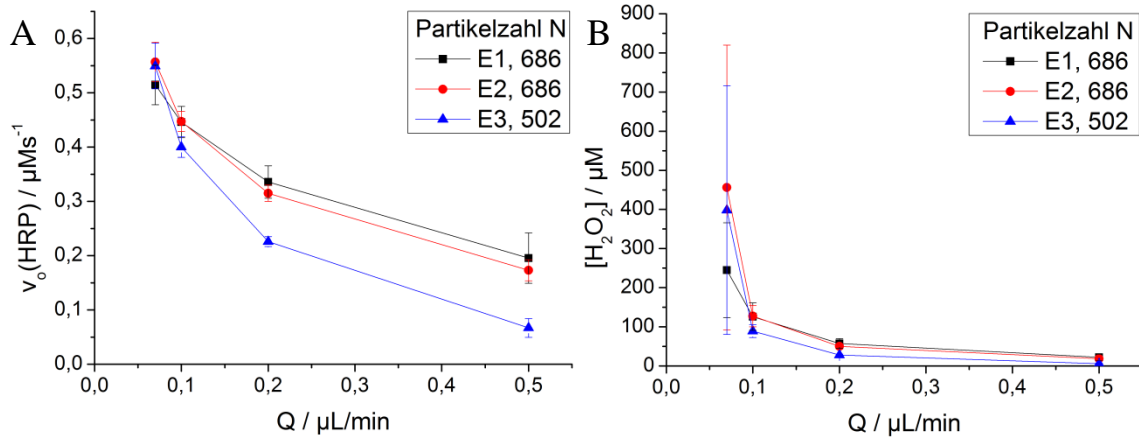


Abbildung 63: **A:** Auftragung der hintergrundkorrigierten gemittelten Anfangsgeschwindigkeiten v_0 des gelösten Reporterenzym HRP in der Fluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln gegen die Flussrate Q . Alle Experimente mit 25 mM Glukose, 100 μM Amplex Red und 1 nM HRP. **B:** Auftragung der Konzentration des durch die GOX-funktionalisierten Partikel gebildeten H_2O_2 gegen die Flussrate Q . Die Konzentrationen wurden nach Gleichung (34) aus den HRP-Anfangsgeschwindigkeiten aus Teilabbildung A berechnet.

Die Anfangsgeschwindigkeiten des Reporterenzym zeigen die typische Abhängigkeit von der Flussrate mit hohen Werten bei niedrigen Flussraten und umgekehrt. Die Unterschiede waren jedoch geringer als in Abbildung 62, da die Werte nicht mehr von der Reaktionszeit im Beobachtungsbereich abhängen. Der Verlauf war hier ausschließlich auf die zyklisch variierende H_2O_2 -Konzentration zurückzuführen, die von der Kontaktzeit der Glukoselösung mit der GOX-beladenen Fritte abhängig war ($v(\text{HRP}) \sim [\text{H}_2\text{O}_2] \sim Q^{-1}$). E3 unterschied sich bei hohen Flussraten von den beiden anderen, vermutlich weil durch die geringere Zahl GOX-beladener Partikel weniger H_2O_2 gebildet wurde.

Die berechneten Anfangsgeschwindigkeiten sind nach Michaelis Menten abhängig von den kinetischen Parametern von nHRP und der Substratkonzentration. Für die weitere Auswertung wurde nun die H_2O_2 -Konzentration benötigt, weshalb die Michaelis Menten (Gleichung (3)) in Gleichung (34) nach $[\text{H}_2\text{O}_2]$ umgestellt wurde.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{v_0 \cdot K_M}{[\text{nHRP}]_0 \cdot k_{cat} - v_0} \quad (34)$$

Die Parameter $K_M = 47,8 \pm 2,0 \mu\text{M}$ und $k_{cat} = 615 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ wurden aktuell für das verwendeten Aliquot nHRP mit 100 μM Amplex Red in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die nach Gleichung (34) berechneten H_2O_2 -Konzentrationen wurden in Abbildung 63B gegen die Flussrate aufgetragen. Das gebildete H_2O_2 folgte einem hyperbolischen Verlauf. Je

langsamer die Flussrate, desto höher war die H_2O_2 -Produktion an der GOX-Fritte, verursacht durch die längere Kontaktzeit.

Bei der Berechnung für $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ stieß Gleichung (34) allerdings an ihre Grenze. In Abbildung 63A lagen die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 von HRP bei der niedrigsten Flussrate $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ in der Größenordnung von v_{max} ($v_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0 = 0,615 \pm 0,015 \mu\text{Ms}^{-1}$ für diese Bedingungen). Im Sättigungsbereich der Michalis Menten Kurve konnte aber aus einer Reaktionsgeschwindigkeit nur noch sehr ungenau auf die zugrunde liegende H_2O_2 -Konzentration zurückgerechnet werden, was auch anhand der großen Fehlerbalken bei $Q = 0,7 \mu\text{L}/\text{min}$, die durch Fehlerfortpflanzung der Gleichung (34) bestimmt wurden, erkennbar ist.

Die extrem hohen H_2O_2 -Konzentrationen überstiegen auch die theoretisch möglichen Werte. Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser beträgt bei 25°C $8,11 \text{ mg}/\text{L}$ was einer Konzentration von $253 \mu\text{M}$ entspricht.^[140] Bei einer 1:1 Umsetzung von O_2 in H_2O_2 durch GOX konnte somit maximal $253 \mu\text{M}$ H_2O_2 erzeugt werden. Der zusätzlich benötigte Sauerstoff könnte zwar durch Diffusion durch das sauerstoffpermeablen PDMS in den Reaktor gelangen. Allerdings finden die Diffusionsvorgänge durch die $4 - 8 \text{ mm}$ PDMS-Schicht auf einer Zeitskala von mehreren Minuten bis Stunden statt^[141] und verändern damit die O_2 -Konzentration während der kurzen Reaktionszeit ($0,6 - 4 \text{ s}$) mit der GOX-Fritte nicht. Die hohe H_2O_2 -Konzentration war damit fehlerhaft und wurde bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Aus der H_2O_2 -Konzentration konnte die Kinetik von GOX berechnet werden.

Bisher wurde ausschließlich die Kinetik des Reporterenzym HRP berechnet und diskutiert. Die erhaltenen Ergebnisse dienten dann zur Bestimmung der Kinetik der GOX-funktionalisierten Partikel. GOX katalysiert die Reaktion von Glukose mit Sauerstoff zu Glukonolacton und H_2O_2 . Aus der H_2O_2 -Konzentration konnte nun analog zur Auswertung der HRP-Fluidik in Abschnitt 2.5.3 durch Multiplikation mit der Flussrate und Normierung auf die Partikelzahl nach Gleichung (25) die normierte Reaktionsrate r/N der GOX-Reaktion berechnet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit v konnte entsprechend über das Zwischenraumvolumen V_{Zw} bzw. der Partikelzahl nach Gleichung (30) bestimmt werden. Da hier auf die Partikelzahl normiert wurde, konnte nun der Mittelwert aus den drei

Experimenten gebildet werden. Die Werte für 0,07 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden nicht weiter berücksichtigt, da sie, wie oben diskutiert, fehlerhaft waren. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 64 gegen die Flussrate aufgetragen.

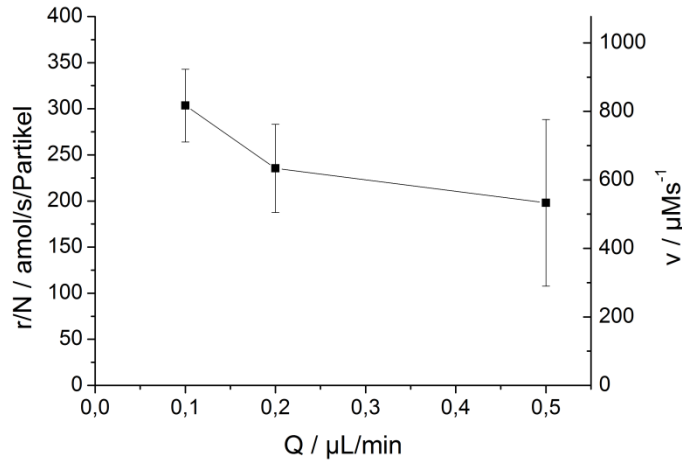


Abbildung 64: Auftragung der Reaktionsrate r/N und Reaktionsgeschwindigkeit v von GOX-beschichteten Partikeln in der Mikrofluidik mit 100 μM Amplex Red, 25 mM Glukose und 1 nM nHRP in Abhängigkeit von der Flussrate Q .

Die berechneten Reaktionsraten r/N lagen zwischen 200 und 300 $\text{amol}/\text{s}/\text{Partikel}$ und stiegen bei niedrigen Flussraten. Als Vergleichswert konnte das Ergebnis aus Tabelle 6 (Seite 76) $\frac{r_{\max}}{N} = 251 \text{ amol}/\text{s}/\text{Partikel}$ herangezogen werden, das in der Mikrotiterplatte ebenfalls auf Partikeloberflächen gemessen wurden. Nach Michaelis Menten (Gleichung (35)) konnte die Reaktionsrate auf die hier eingesetzten 25 mM Glukose berechnet werden.

$$\frac{r}{N} = \frac{\frac{r_{\max}}{N} \cdot [\text{Glukose}]}{K_M + [\text{Glukose}]} = \frac{251 \frac{\text{amol}}{\text{s Partikel}} \cdot 25\text{mM}}{13\text{mM} + 25\text{mM}} = 165 \frac{\text{amol}}{\text{s Partikel}} \quad (35)$$

Die gemessenen Reaktionsraten in der Mikrofluidik waren damit um 20 bis 80 % höher als in der Mikrotiterplatte. Anders als bei der Diskussion der Ergebnisse der bHRP-beladenen Fritte in Abschnitt 0 wurde die Reaktion der GOX-funktionalisierten Partikel in der Mikrofluidik beschleunigt.

Die Reaktionsraten stiegen scheinbar mit niedrigeren Flussraten.

Die Abhängigkeit von der Flussrate ist ungewöhnlich. Theoretisch führen hohe Flussraten genügend frisches Substrat zu, so dass keine Substraterschöpfung auftritt und die Enzyme schneller reagieren. Außerdem wird, wie für HRP in Abschnitt 0 diskutiert, der Transport der Substrate in der Hydrathülle der Partikel bzw. Enzyme beschleunigt, was

ebenfalls zu höheren Reaktionsraten führen sollte. Dieser Effekt ist für Festbettreaktoren auch in der Literatur beschrieben worden.^[112, 115, 139]

Der umgekehrte Kurvenverlauf und die generelle Beschleunigung sind vermutlich auf Effekte der zweistufigen Reaktionskaskade zurückzuführen. Die Auswertung basierte auf den kinetischen Daten des in Lösung vorliegenden Reporterenzym nHRP. Schon bei der Berechnung der H_2O_2 -Konzentrationen in Abbildung 63B resultierten höhere Konzentrationen, als theoretisch bei der vorliegenden Sauerstoffkonzentration möglich waren. Möglicherweise reagiert das gelöste HRP in der Mikrofluidik schneller als bei der Referenzmessung, so dass bei der Auswertung überhöhte H_2O_2 -Konzentrationen erhalten wurden. Für diese Hypothese gibt es zwei Argumente:

- 1) HRP könnte nach der sogenannten Burst-Kinetik^[109] reagieren, bei der es im ersten Reaktionszyklus nach Vermischung von Substrat und Enzym zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit kommt. Die Erklärung ist, dass in der Substratlösung vor Kontakt mit der GOX-beladenen Fritte sämtliche gelösten HRP-Enzyme frei und im Grundzustand vorliegen, da kein H_2O_2 , sondern ausschließlich das zweite Substrat Amplex Red vorhanden ist (vergleiche dazu den im Abschnitt 2.1.2.1 vorgestellten Reaktionsmechanismus der HRP Reaktion: Grundzustand, compound I, compound II). Passieren die HRP-Enzyme die GOX-Schüttung, kommen sie in Kontakt mit dort generiertem H_2O_2 und die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Reaktion kommt, ist sehr hoch. Nach einigen Zyklen pendelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf den makroskopisch messbaren Durchschnittswert ein und die Reaktion ist im steady state. Dieser Effekt ist nur in der Mikrofluidik und besonders bei Mehrsubstratreaktionen messbar, da in der Mikrofluidik auch schnelle Reaktionsverläufe (< 1 s) auf die Ortskoordinate abgebildet und damit beobachtet werden können. Im Batch-Experiment – besonders bei Mehrsubstratreaktionen – sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass das Substrat auf ein freies und im richtigen Oxidationszustand vorliegendes Enzym trifft.^[109]
- 2) Bei der Bestimmung der Kinetik in der Mikrotiterplatte wurde ein großes Zeitintervall von 20 – 30 s pro Datenpunkt verwendet. Bei sehr hohen Reaktionsgeschwindigkeiten kam es schon früh zu signifikantem Verbrauch der Substrate, so dass die Geschwindigkeit sank. Der ermittelte Wert für v_0 war damit

eher eine mittlere Geschwindigkeit, die kleiner ist als die Anfangsgeschwindigkeit. Dieser Fehler pflanzte sich bei der Auswertung nach Michaelis Menten fort und führte zu einem verringerten Wert für k_{cat} .

Aus beiden Argumenten folgt, dass die H_2O_2 -Konzentrationen in der Realität niedriger waren als hier berechnet, da das Reporterenzym aus oben genannten Gründen schneller reagierte als in der Mikrotiterplatte. Da die Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis Menten nichtlinear von der H_2O_2 -Konzentration abhängt, verstärkte sich der Effekt überproportional bei hohen Geschwindigkeiten, die, wie in Abbildung 63 erkennbar, bei niedrigen Flussraten gemessen wurden.

Beispiele aus der Literatur belegen die Hypothese, dass „freie“ Enzyme in der Mikrofluidik schneller reagieren. Tanaka et al. bestimmten die Kinetik von gelöster HRP in einer Küvette und einem Mikrofluidikchip und beobachteten nahezu eine Verdoppelung von v_{max} .^[142] Auch Untersuchungen zur trypsin-katalysierten Hydrolyse führten zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M in der Mikrofluidik, die bei hohen Flussraten zu einer Verdoppelung führte. Die Autoren begründeten dies durch effizientere Komplexbildung, da sich nur K_M änderte.^[143]

Diese Überlegungen zeigen, dass bei zweistufigen Reaktionen in der Mikrofluidik die Größenordnung der Ergebnisse, und auch deren Abhängigkeit von der Flussrate, entscheidend von der Methode beeinflusst werden, mit der die kinetischen Parameter des gelösten Reporterenzym bestimmt wurden. Dessen Kinetik müsste deshalb ebenfalls in der Mikrofluidik bestimmt werden. Dazu müsste eine schnelle Durchmischung von Enzym- und Substratlösung im Reaktor erfolgen, was mit dem hier vorgestellten Mikroreaktor aber nicht möglich war. Selbst wenn die Kreuzungen von Seiten- und Hauptkanal zum Zusammenführen der Lösungen verwendet würden, könnten sich die beiden Lösungen wegen der laminaren Strömung ausschließlich durch langsame Diffusion mischen.^[42] Dieser Effekt ist auch in Abbildung 47B (Seite 99) erkennbar, die fluoreszente Lösung aus dem Seitenkanal mischte sich innerhalb der Reaktorstrukturen nicht mit dem Puffer im Hauptkanal. Die Mischung von Enzym- und Substratlösung im Reaktor ließe sich auf diese Weise also nicht realisieren.

Alternativ kann das Reporterenzym ebenfalls auf Partikeln immobilisiert werden und an der flussabwärts liegenden Fritte platziert werden. Beide Enzymreaktionen finden dann in

getrennten Schüttungen statt. Die kinetischen Daten des immobilisierten Reporterenzym HRP in der Mikrofluidik wurden bereits in Abschnitt 2.5.3 bestimmt. Dieses Konzept wird in Abschnitt 2.7 untersucht.

Aber auch mit den vorhandenen Kinetikdaten von gelöster HRP könnte die Genauigkeit verbessert werden, indem nicht im Sättigungsbereich, sondern mit $[\text{H}_2\text{O}_2] \leq K_M$ gemessen würde. Für diese Bedingungen vereinfacht sich die Michaelis Menten Gleichung zu Reaktionsgleichung erster Ordnung $v = \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]$. Dazu müssten die GOX-beschichteten Partikel weniger H_2O_2 produzieren, was durch eine geringere Partikelzahl der Schüttung, durch eine niedrigere Ausgangskonzentration von Glukose oder durch schnellere Flussraten realisiert werden könnte.

Abschließend betrachtet ist die quantitative Messung der zweistufigen Reaktion im Festbettreaktor möglich. Die Enzyme sind für die Dauer der Experimente stabil, weil das H_2O_2 *in situ* erzeugt wird. Unsicherheiten ergeben sich jedoch durch die erhöhte Aktivität des Reporterenzym, die zu erhöhten Ergebnissen besonders bei niedrigen Flussraten führen.

Für die Bestimmung der Kinetik nach Michaelis Menten sollten die Experimente nun mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen durchgeführt werden. Da diese Einzelerperimente sehr aufwändig sind und jeweils verschiedene Partikelzahlen enthalten, wurde stattdessen in Abschnitt 2.6.2 in mehrphasigen Experimenten sowohl die Flussrate, als auch die Substratkonzentration variiert, was wegen der längeren Lebensdauer im Vergleich zur HRP-Fluidik ermöglicht wurde.

2.6.2 Variation der Flussrate und der Konzentration

Wegen der längeren Haltbarkeit der Enzyme in der Mikrofluidik konnte nun in Langzeitexperimenten über 12-18 h systematisch sowohl die Glukosekonzentration als auch die Flussrate variiert werden. Zum Einstellen der Konzentration wurden zwei Spritzen mit Substratlösung mit bzw. ohne Glukose über ein Y-Stück verbunden, und die entsprechend gemischte Lösung in den Reaktor geleitet.

Das Totvolumen zwischen Y-Stück und Reaktor betrug ca. 12 μL , und zum vollständigen Wechsel der Konzentration wurden ca. 30 μL benötigt. Ein häufiger Wechsel der Konzentration war nicht zweckmäßig, da er Zeit kostet und eine zusätzliche

Mit dem so erstellten Flussratenprofil wurden 6 Konzentrationen (0; 5; 10; 20; 50 und 100 mM Glukose) eingestellt und in den Reaktor gepumpt. Die relativ hohen Konzentrationen wurden gewählt, um einen breiten Konzentrationsbereich zur Bestimmung von K_M abzudecken. Zur Bestimmung der Alterungsstabilität und der Reproduzierbarkeit, wurde das insgesamt sechsstündige Profil dreimal hintereinander durchlaufen. Das gesamte Experiment wurde außerdem dreimal unabhängig reproduziert. Die Hintergrundfluoreszenz vor der GOX-beladenen Fritte war wie in Abbildung 60 (Seite 131) nicht flussratenabhängig, stieg aber durch unspezifische Oxidation über die Gesamtdauer des Experiments kontinuierlich an. Die Fluoreszenzentwicklung hinter der GOX-Fritte wurde wie in Abschnitt 2.6.1 in zwei Auswertungsbereichen A2 und A4 bestimmt. Die daraus berechnete Konzentrationszunahme des Resorufins $\Delta[\text{Res}]$ wurde als Profil in Abbildung 66A gegen die Zeit aufgetragen.

Die Signale der drei Experimente ließen sich gut reproduzieren. Die Umsätze $\Delta[\text{Res}]$ erreichten maximal 1,6 μM , was 1,6 % des eingesetzten Amplex Reds entsprach. Wegen der unterschiedlichen Partikelzahlen und Abstände der Auswertungsfenster A2 und A4 waren die Profile allerdings noch nicht direkt vergleichbar. Die runden Peaks waren sehr regelmäßig, hatten ein sehr gutes Signal zu Hintergrund Verhältnis und zeigen nahezu kein Rauschen. Der kontinuierliche Gradient verbesserte also die Datenqualität. Auf den Plateaus mit konstanter Flussrate von $Q = 0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ ($t = 30 - 40 \text{ min}$ etc.) war jedoch ein Rauschen erkennbar. Dieses entstand, – wie bei der Kontrolle des Flussrateprofils in Abbildung 95 (Anhang) – weil bei den niedrigen Flussraten die Pumpen nur noch schrittweise arbeiteten und leichteste Druckschwankungen und Turbulenzen an den Seitenkanälen einen größeren Einfluss hatten.

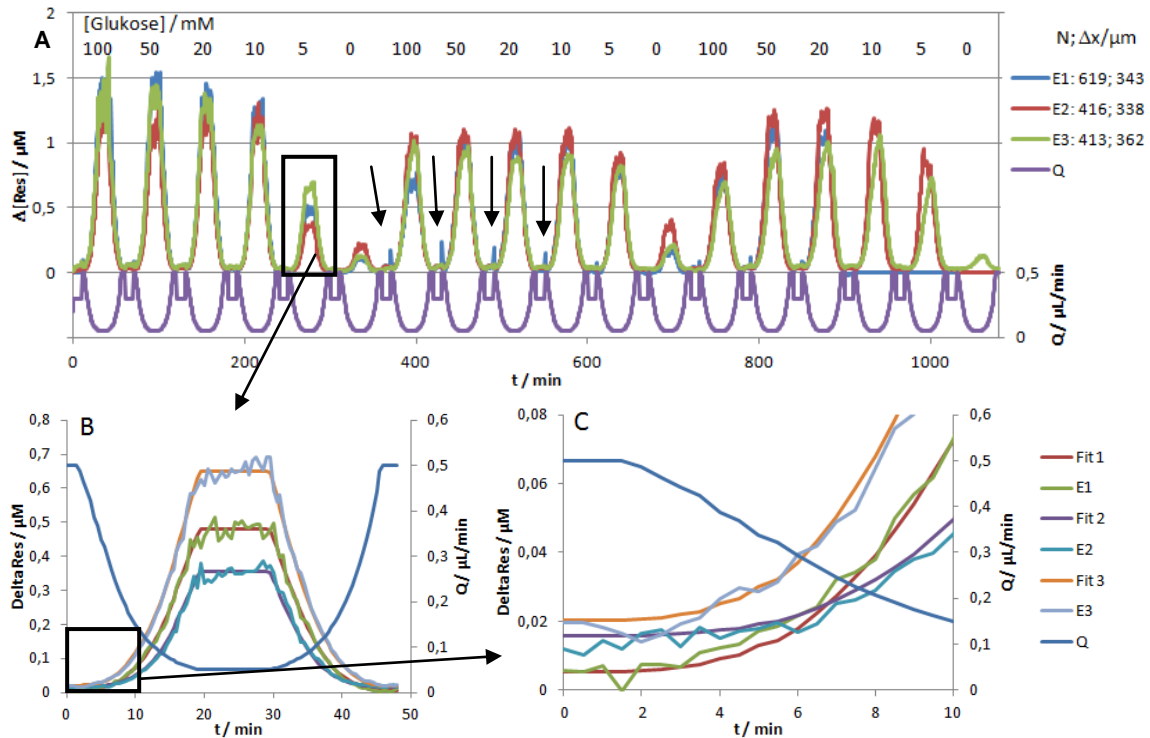


Abbildung 66: Drei Profile der Reaktion von GOX-funktionalisierten Partikeln in der Mikrofluidik mit 0-100 mM Glukose, 1 nM nHRP und 100 μM Amplex Red. Durch Kombination zweier Substratspritzen wurde die Glukosekonzentration variiert. Die Peaks entsprechen 100; 50; 20; 10; 5 und 0 mM Glukose, wobei alle Konzentrationen dreimal hintereinander durchlaufen wurden. In der Legende sind für jedes Experiment (E1-E3) die Partikelzahl N sowie der Abstand Δx zwischen den Auswertungsbereichen A2 und A4 angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil der Flussrate Q , der durch die Schüttung strömt, auf der rechten Achse aufgetragen. **B:** Erfolgreicher Fit nach Gleichung (36) am Beispiel des 5. Zyklus (5 mM, ca. 270 min). **C:** Die Vergrößerung des Anfangsbereichs zeigt, dass die Experimente auch bei niedrigen Resorufinumsätzen gut durch die Fits repräsentiert werden.

Während der 18 h des Experiments kam es nur zu einer geringen Alterung, vermutlich da das H_2O_2 *in situ* erzeugt wurde. Eine genaue Quantifizierung der Alterung war jedoch nicht möglich, da sich vergleichbare Bedingungen erst alle 6 h wiederholten und kein eindeutiger Trend erkennbar war.

Der erste vollständige Durchlauf (0-360 min) zeigte bei allen drei Kurven wie erwartet eine Abnahme der Resorufinproduktion mit sinkender Glukosekonzentration. Der Peak ohne Glukose bei ca. 330 min war jedoch höher, als z. B. in Abbildung 62 (Seite 133) beobachtet. Beim zweiten und besonders beim dritten Durchlauf waren die Signale bei 100 mM erniedrigt. Hier schien der Konzentrationswechsel von 0 auf 100 mM Glukose noch nicht vollständig abgeschlossen zu sein, sodass vermutlich eine geringere Glukosekonzentration vorlag. Auch die Peaks mit 5 mM Glukose waren beim zweiten und dritten Durchlauf erhöht.

Im Kontrollexperiment des Flussratenprofils in Abbildung 95 (Anhang) konnten die erwarteten Konzentrationen zwar bestätigt werden. Allerdings gab es im Zeitraum der hier diskutierten Experimente Probleme mit der Dichtigkeit der Luer Adapter, was bei den niedrigen Flussraten mit dem Auge kaum wahrnehmbar war. Fotos der undichten Verbindung sind im Anhang in Abbildung 96 gezeigt. Ein Druckabfall am Adapter führte zu niedrigeren Flussraten und damit letztlich auch zu Abweichungen bei der Einstellung der Konzentrationen.

Die Daten der Kontrolle mit 0 mM Glukose waren besonders bei E2 unerwartet hoch. Die separaten Kontrollexperimente in Abbildung 62 (Abschnitt 2.6.1, S.133) zeigten jedoch, dass ohne Glukose keine signifikante Umsetzung im Auswertungsbereich stattfand. Die gemessenen Geschwindigkeiten konnten also nur durch im Reaktor verbliebene Glukose verursacht werden. Dies konnte durch unvollständigen Lösungsaustausch, durch Ausbluten am Y-Stück oder durch fehlerhafte Flussraten wegen des undichten Luer-Adapters verursacht werden. Deshalb wurden die Daten bei der weiteren Auswertung nicht hintergrundkorrigiert.

Aus dem Umsatz konnte die H₂O₂-Konzentration berechnet werden.

Zur weiteren Auswertung musste nun aus den Umsätzen über die Kinetik des gelösten Reporterenzymys die H₂O₂-Konzentration berechnet werden. Eine Datenprozessierung des gesamten Datensatzes erwies sich als nicht praktikabel, da kleinste Schwankungen der Daten später quadratisch in die Berechnung der kinetischen Daten von GOX eingingen. Das Glätten der Daten erwies sich als schwierig und verringerte nicht die Datenmenge. Versuche, die Datensätze $\Delta[\text{Res}]$ als Funktion von Q zu fitten, führten bei der 5-Parameter-Exponentialfunktion in Gleichung (36) zu optimalen Ergebnissen. Dabei war die physikalische Bedeutung der einzelnen Parameter für die weitere Auswertung unerheblich, das Ziel war eine möglichst exakte Nachbildung der Peaks.

$$\Delta[\text{Res}] = Y_0 + A_1 e^{\left(-\frac{b_1}{Q}\right)} + A_2 e^{\left(-\frac{b_2}{Q}\right)} \quad (36)$$

Die nach Gleichung (36) angepassten Kurven sind in Abbildung 66B und C als Auftragung gegen die Zeit dargestellt und bilden den Verlauf der Kurven sehr gut nach. Aus den Kurven konnten für die weitere Auswertung die Umsätze $\Delta[\text{Res}]$ bei konkreten

Flussraten abgelesen werden. Die Daten sind exemplarisch für den ersten Durchlauf von E1 in Abbildung 67 aufgetragen.

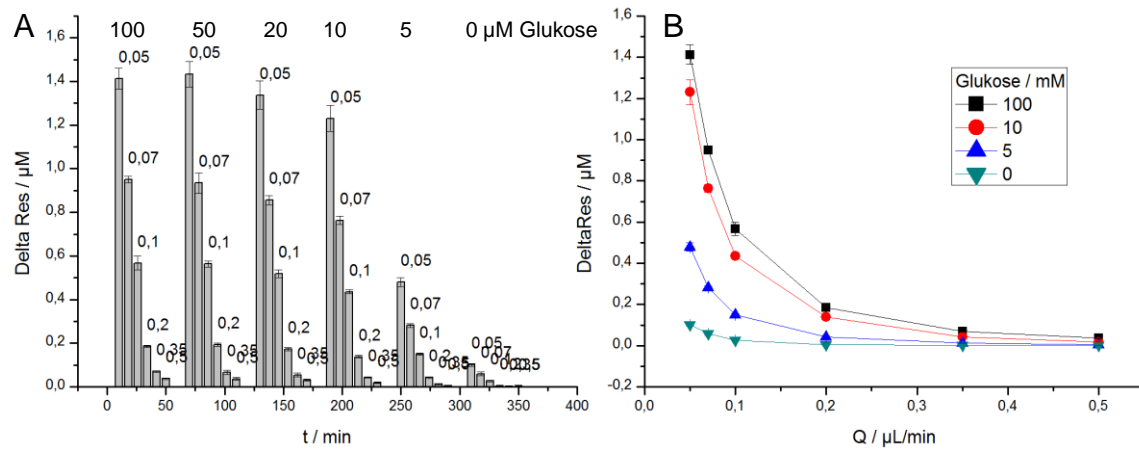


Abbildung 67: Darstellung der nach Gleichung (36) gefitteten Resorufinumsätze $\Delta[\text{Res}]$ des ersten Durchlaufs von E1 (619 Partikel) für konkrete Flussraten $Q = 0,05; 0,07; 0,1; 0,2; 0,35$ und $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$. **A:** Darstellung als Säulendiagramm gegen die Zeit, **B:** Darstellung als x-y-Diagramm gegen die Flussrate. Hier sind zur besseren Lesbarkeit die Kurven mit 50 mM und 20 mM Glukose ausgelassen worden, da sie fast deckungsgleich mit 100 mM sind.

Die Umsätze zeigten eine starke Abhängigkeit von der Flussrate. Von der niedrigsten zur höchsten Flussrate nahmen die Umsätze um den Faktor 40 – 100 ab, was an der bereits erwähnten Proportionalität $\Delta[\text{Res}] \sim Q^{-2}$ lag. Wegen der größeren Bandbreite der Flussraten ($Q = 0,05 - 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$), war deshalb eine Abnahme von bis zu einem Faktor 100 möglich. Wie schon zu Abbildung 66 diskutiert wurde, waren die Umsätze außerdem von der Glukosekonzentration abhängig.

Aus den so bestimmten Daten wurden nun nach Gleichung (33) über den Abstand der Auswertungsfenster Δx (aus dem Mikroskopbild) und die Kanalgeometrie $b \cdot h$ die Geschwindigkeiten der HRP Reaktion in Lösung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 68 gegen die Flussrate und gegen die Glukosekonzentration aufgetragen.

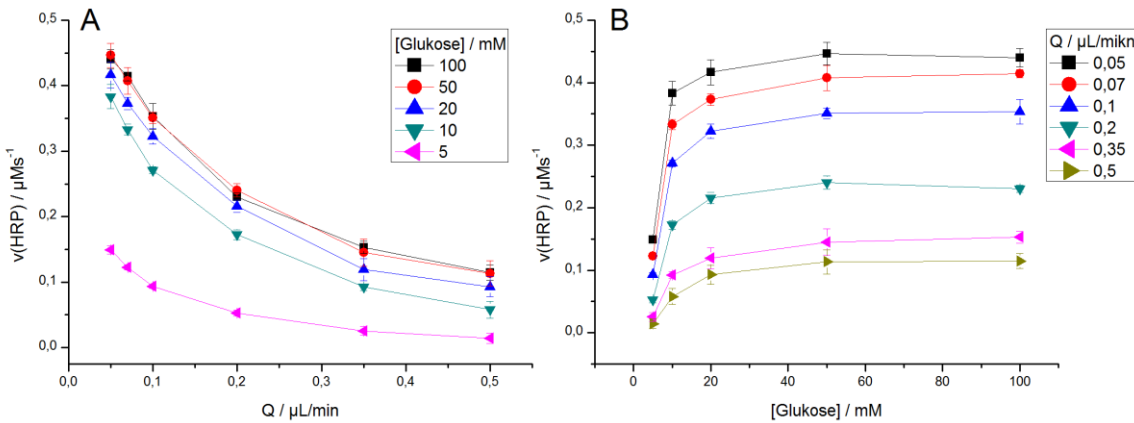


Abbildung 68: Auftragung der berechneten Geschwindigkeiten von HRP in Lösung in der GOX-Mikrofluidik. **A:** gegen die Flussrate **B:** gegen die Glukosekonzentration. Hier ist nur der erste Durchlauf von E1 aufgetragen.

Die Geschwindigkeiten des Reporterenzym hingen von der zugrunde liegenden H_2O_2 Konzentration ab, die wiederum von der Kinetik der GOX-beladenen Fritte abhing. Die maximalen Geschwindigkeiten lagen bei $0,45 \mu\text{Ms}^{-1}$ und nahmen mit zunehmender Flussrate um den Faktor 4 – 10 ab. Auch die niedrigeren Glukosekonzentrationen führten zu einer Abnahme der Geschwindigkeit, wobei hier besonders die Werte bei 5 und 0 mM Glukose abfielen. Beide Trends zeigen, dass die H_2O_2 -Produktion an der GOX-beladenen Fritte von der Kontaktzeit und nach Michaelis Menten von der eingesetzten Glukosekonzentration abhängen.

Diese Daten ließen sich mit den Ergebnissen aus Abschnitt 2.6.1 vergleichen, die bei konstanten 25 mM Glukose gemessen wurden. Die Kurven in Abbildung 63A zeigten gleiche Trends wie die Kurve mit 20 mM Glukose in Abbildung 68A, lagen aber ca. 35 % höher. Die Erhöhung resultierte aus der höheren Partikelzahl und 20 % mehr Glukose (20 bzw. 25 mM) in der Substratlösung.

Nach Gleichung (34) konnten aus den Michaelis Menten Parametern für gelöstes HRP aus den Geschwindigkeiten die vorliegenden H_2O_2 -Konzentrationen berechnet werden. In Abbildung 69A sind die Ergebnisse beispielhaft für E1 gegen die Flussrate und in Teilabbildung B gegen die Glukosekonzentration aufgetragen. Anders als in Abschnitt 2.6.1 waren die Geschwindigkeiten des Reporterenzym hier nicht in der Größenordnung von $v_{max} = 0,615 \mu\text{Ms}^{-1}$, so dass die H_2O_2 -Konzentrationen hier insgesamt niedriger ausfielen und nicht die zur Verfügung stehende Sauerstoffkonzentration übertrafen.

Aus der H₂O₂-Konzentration konnte die Kinetik von GOX berechnet werden.

Aus der H₂O₂-Konzentration konnte nun wie in Abschnitt 2.6.1 durch Multiplikation mit der Flussrate und Normierung auf die Partikelzahl nach Gleichung (25) die normierte Reaktionsrate r/N der GOX-Reaktion berechnet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit konnte entsprechend über das Zwischenraumvolumen V_{Zw} bzw. der Partikelzahl nach Gleichung (30) bestimmt werden. Da hier auf die Partikelzahl normiert wurde, konnte nun der Mittelwert aus den drei Experimenten gebildet werden. Die Daten sind in Abbildung 69C gegen die Flussrate und in Teilabbildung D gegen die Glukosekonzentration aufgetragen.

Die normierten Reaktionsraten waren innerhalb der Genauigkeit nicht von der Flussrate abhängig bzw. es waren keine eindeutigen Trends erkennbar. Nur bei 5 mM Glukose kam es zu einer Steigerung bei hohen Flussraten. Vermutlich kam es hier bei den niedrigen Flussraten zu Substraterschöpfung. Generell war dieser Effekt hier aber kleiner, da anders als bei der Fluidik mit HRP hier die Substrate in sehr unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Glukose wurde von 5 bis 100 mM variiert, während die Sauerstoffkonzentration im Rahmen der Löslichkeit mit maximal 253 μM vorlag^[140] und damit das limitierende Substrat war. Eine Substraterschöpfung wäre aber besonders bei hohen Glukosekonzentrationen zu erwarten, da dann, wie in Abbildung 69B erkennbar ist, die größten Mengen Sauerstoff und Glukose zu H₂O₂ und Glukonolacton umgesetzt werden.

Die Reaktionsraten von 20 mM Glukose konnten mit den Ergebnissen für konstante 25 mM Glukose aus Abschnitt 2.6.1 (Abbildung 64, S.137) verglichen werden. Bei $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ wurde dort $r/N = 200 \text{ amol}/\text{s}/\text{Partikel}$ erhalten, was in der Größenordnung des hier ermittelten Werts von etwa $r/N = 165 \text{ amol}/\text{s}/\text{Partikel}$ lag. Bei niedrigeren Flussraten nahm die Reaktionsrate dort aber zu, was anhand der Unterschiede in der Kinetik des Reporterenzym in der Mikrofluidik und in der Mikrotiterplatte diskutiert wurde. Diese Unterschiede traten besonders bei hohen H₂O₂-Konzentrationen auf, die bei langsamen Flussraten gebildet wurden.

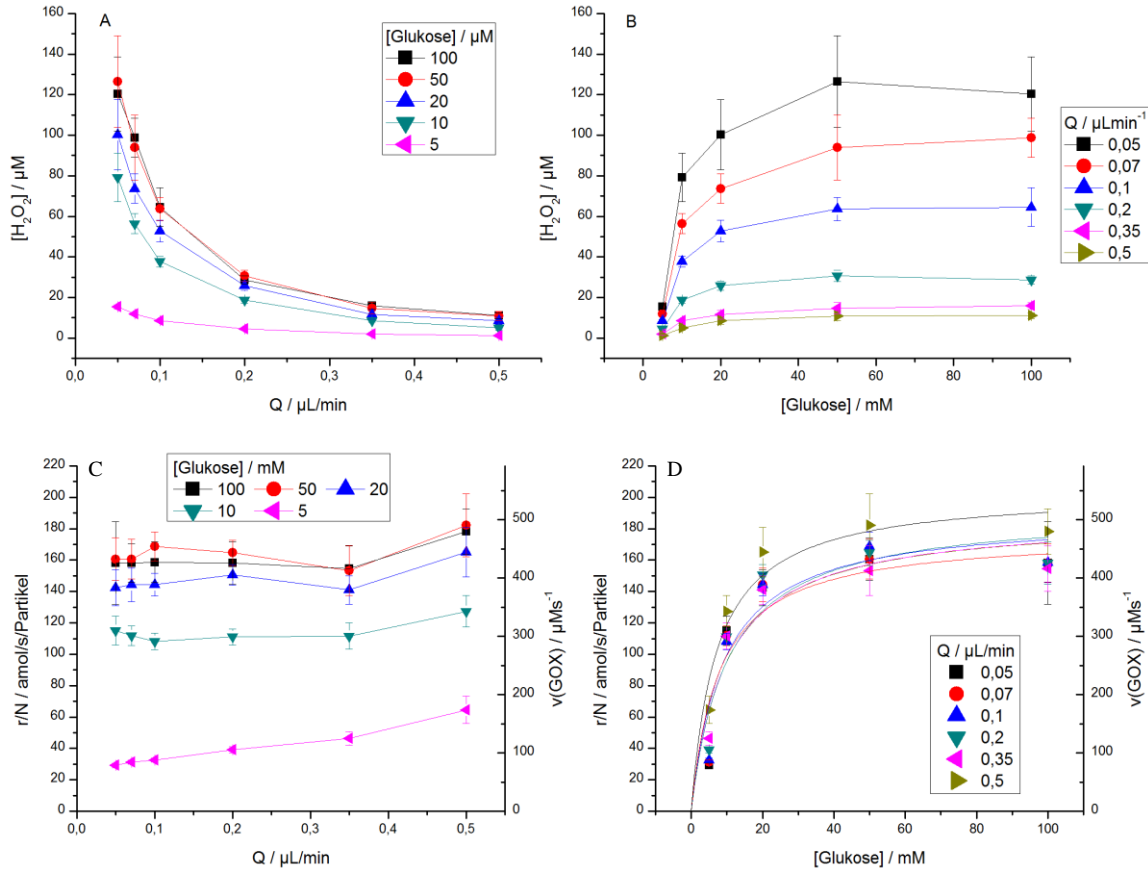


Abbildung 69: Auswertung der Mikrofluidik mit GOX-beschichteten Partikeln und nHRP in Lösung unter Variation von Flussrate und Glukosekonzentration. **A:** Auftragung der Konzentration des durch die GOX-beladenen Fritte *in situ* erzeugten H_2O_2 am Beispiel des ersten Durchlaufs von E1 gegen die Flussrate. **B:** Dieselben Daten aufgetragen gegen die Glukosekonzentration. **C:** Daraus berechnete normierten Reaktionsraten r/N und Geschwindigkeiten v der GOX-beladenen Fritte aufgetragen gegen die Flussrate. **D:** Dieselben Daten wurden gegen die Glukosekonzentration aufgetragen und nichtlinear nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) gefittet. Bei C und D handelt es sich um die Mittelwerte aus den drei unabhängigen Experimenten.

In den vorliegenden Experimenten wurde neben der Flussrate auch die Glukosekonzentration verändert, um eine Auswertung nach Michaelis Menten zu ermöglichen. Die Ergebnisse in Abbildung 69D folgen dem typischen Kurvenverlauf und wurden entsprechend nach Michaelis Menten gefittet. Die so erhaltenen Parameter K_M und r_{max} bzw. v_{max} wurden in Abbildung 70 gegen die Flussrate aufgetragen. Nach Gleichung (32) konnte schließlich mit Hilfe der Beladung $\sigma = 2,2 \pm 1,6$ amol/s/Partikel k_{cat} berechnet werden, das später den Vergleich mit Literaturwerten ermöglicht. Alle Parameter sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Die Parameter des nichtlinearen Fits der Daten aus Abbildung 69D nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) der Mikrofluidik mit GOX-beschichteten Partikeln und nHRP in Lösung. Zum Vergleich sind die Ergebnisse aus der Mikrotiterplatte für partikelgebundene und freie bGOX aus Tabelle 6 angegeben.

$Q / \mu\text{L min}^{-1}$	$r_{\max}/N [\text{amol s}^{-1} \text{Partikel}^{-1}]$	$v_{\max} / \mu\text{M s}^{-1}$	K_M / mM	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$
0,5	204 ± 17	549 ± 45	7 ± 2	93 ± 69
0,35	177 ± 18	476 ± 49	8 ± 3	81 ± 60
0,2	188 ± 25	507 ± 67	9 ± 4	86 ± 64
0,1	192 ± 27	518 ± 74	10 ± 5	87 ± 65
0,07	188 ± 28	505 ± 74	10 ± 5	85 ± 64
0,05	187 ± 29	504 ± 78	10 ± 5	85 ± 63
Mittelwert	189 ± 9	510 ± 24	9 ± 1	86 ± 64

in der Mikrotiterplatte nach Tabelle 6:

- in Lösung		nicht	$15,0 \pm 0,2$	353 ± 3
-auf Partikeln	251 ± 21	vergleichbar	13 ± 1	112 ± 84

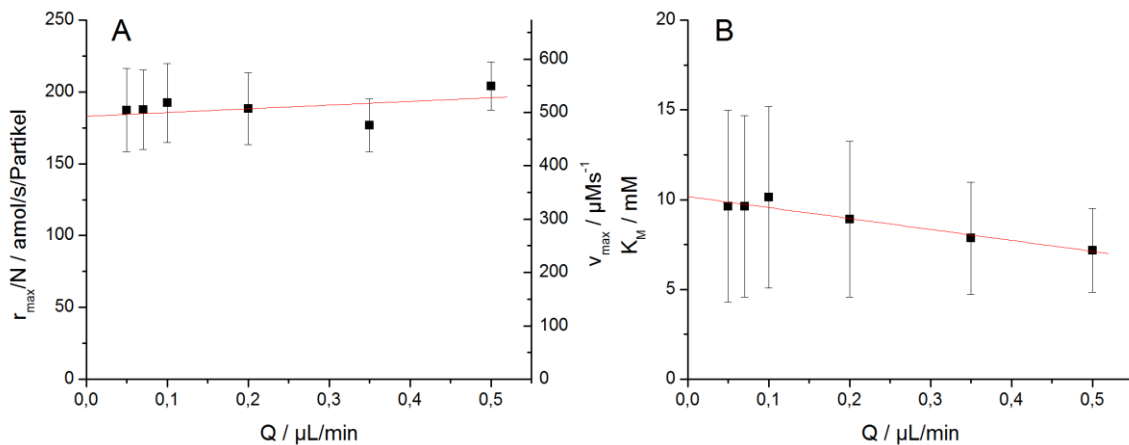


Abbildung 70: Auftragung der Michaelis Menten Parameter gegen die Flussrate bei der Mikrofluidik mit GOX-beschichteten Partikeln und nHRP in Lösung.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von GOX-funktionalisierten Partikeln in der Mikrotiterplatte waren die maximalen Reaktionsraten hier um 20–25 % erniedrigt. Dies wurde auch schon bei der Mikrofluidik mit HRP beobachtet und konnte durch die schlechtere Zugänglichkeit und die extrem hohe lokale Enzymkonzentration begründet werden (vgl. Seite 123ff). Der Unterschied war hier jedoch nicht so ausgeprägt, da der dort diskutierte Effekt des H_2O_2 und der damit überproportionalen Alterung im Falle der GOX entfiel.

Darüber hinaus wurde in Abschnitt 2.6.1 diskutiert, dass die Auswertung mit den kinetischen Daten des gelösten Reporterenzym generell zu erhöhten Ergebnissen führen kann.

Eine Abhängigkeit von der Flussrate war hier nicht eindeutig erkennbar. Lineare Regression der Reaktionsraten lieferte eine leicht ansteigende Gerade. Dies entspricht der Theorie, da bei höheren Flussraten die Substrate effizienter nachgeliefert werden und es nicht zu Substraterschöpfung kommt.^[139]

Wie auch bei der Mikrofluidik mit HRP beobachtet wurde, waren die K_M -Werte im Vergleich zur Mikrotiterplatte leicht erniedrigt und nahmen bei höheren Flussraten ab. Da K_M mit der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes vergleichbar ist, bedeutet dies eine Steigerung der Affinität in der Mikrofluidik. Bei Erhöhung der Flussrate erfolgt ein schnellerer Austausch zwischen Substratlösung und Enzym, da die Dicke der Diffusionsschicht abnimmt, was die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes begünstigt und K_M erniedrigt.^[138]

Der Vergleich mit Literaturwerten der kinetischen Parameter von immobilisierter GOX in der Mikrofluidik erfolgt in Abschnitt 2.7.3.2.

Abschließend betrachtet erwies sich der stufenlose Gradient als erfolgreiche Strategie zur Glättung von Druckschwankungen, machte aber die Auswertung anspruchsvoller. Über das Mischungsverhältnis von zwei substratenthaltenden Spritzen konnten in nur einem Experiment sechs verschiedene Glukosekonzentrationen eingestellt werden. Problematisch war nur das große Totvolumen, das aber beim Konzentrationswechsel durch den Seitenkanal S1 abgezweigt werden konnte. Verglichen mit den Einzelexperimenten bei der HRP-Fluidik reduzierte sich dadurch die Zahl der benötigten Experimente um den Faktor 6.

Mit der hier vorgestellten Methode war es prinzipiell möglich, über die Kinetik des gelösten Reporterenzym die kinetischen Daten von GOX nach Michaelis Menten zu bestimmen. Für weitere Experimente sollten die zugrunde liegenden Parameter des gelösten Reporterenzym ebenfalls in der Mikrofluidik bestimmt werden, da sich die Systeme sonst zu sehr unterscheiden.

Alternativ kann das Reporterenzym ebenfalls auf Partikeln immobilisiert werden und auf der flussabwärts liegenden Fritte platziert werden. Die kinetischen Daten für HRP-funktionalisierte Partikel in der Mikrofluidik wurden bereits in Abschnitt 0 bestimmt und diskutiert. Mit diesen Daten kann schließlich in der zweistufigen Mikrofluidik mit GOX und

HRP auf Partikeln im folgenden Abschnitt 2.7 auf die kinetischen Parameter von GOX geschlossen werden.

2.7 Mikrofluidik mit GOX- und HRP-funktionalisierten Partikeln

Der mikrofluidische Reaktor wurde speziell für die Anwendung mehrstufiger Reaktionen entwickelt. Bisher war aber nur das erste Enzym der Kaskade (GOX) auf Partikeln immobilisiert und die Bestimmung des Reaktionsprodukts H_2O_2 erfolgte über das in der Substratlösung vorliegende HRP. In diesem Abschnitt wird nun das Reporterenzym ebenfalls auf STV-Partikel immobilisiert und an der flussabwärts liegenden Fritte lokalisiert. Im folgenden Abschnitt 2.7.1 werden ausgehend von den bisherigen Ergebnissen zunächst die zu erwartenden Ergebnisse einer zweistufigen Reaktionskaskade in der Mikrofluidik berechnet. In Abschnitt 2.7.2 werden Experimente unter Variation der Flussrate aber bei konstanter Glukosekonzentration von 25 mM diskutiert, während bei den Experimenten in Abschnitt 2.7.3 auch die Glukosekonzentration variiert wird, um die Ergebnisse nach Michaelis Menten auswerten zu können.

2.7.1 Berechnungen der zweistufigen Enzymkaskade

Die Berechnungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, geeignete Partikelzahlen und das optimale Verhältnis von GOX zu HRP zu finden. Die Ergebnisse sollten außerdem bei der Auswertung der zweistufigen Enzymkaskade helfen, da lokale Konzentrationen der drei Edukte (Glukose, Sauerstoff und Amplex Red) und des Intermediats H_2O_2 innerhalb der Schüttungen berechnet werden. Damit können die Effekte durch Substraterschöpfung konkret den vier Spezies zugeordnet werden und anhand typischer Kurvenverläufe identifiziert werden.

Für die Auswertung sind zwei Grenzfälle interessant, mit denen die intermediäre H_2O_2 -Konzentration bestimmt werden kann. Einerseits kann **wenig HRP** eingesetzt werden, damit keine Substraterschöpfung des H_2O_2 auftritt. Aus der **Reaktionsrate** kann dann über die kinetischen Parameter die H_2O_2 -Konzentration berechnet werden. Andererseits kann **HRP im Überschuss** eingesetzt werden, um dann über den möglichst vollständigen **Umsatz** die H_2O_2 -Konzentration zu ermitteln. Da nur die Grenzfälle zu validen Ergebnissen führen, wurden für die Berechnungen extreme Partikelverhältnisse ausgewählt.

Eine einfache Möglichkeit zur Berechnung der Kinetik in der Fluidik ist, die Geschwindigkeitsgleichungen als rekursive Folge über die gesamte Partikelschüttung zu entwickeln. Dies ist zweckmäßig, da bisher alle Ergebnisse als Reaktionsrate pro Partikel diskutiert wurden. Um die Zahl der Iterationen zu verringern, wurde mit der Schrittweite $\Delta N = 5$ Partikel gerechnet. Bildlich betrachtet wurde die Schüttung in eine endliche Zahl Teilschüttungen von 5 Partikeln zerlegt und die Konzentrationen der Reaktanden für jede Teilschüttung berechnet. Als Grundlage für die Kinetiken dienten die Ergebnisse der HRP-Fluidik (Tabelle 8, S. 122) und die Ergebnisse der GOX-Fluidik (Tabelle 9, S. 149).

Für die GOX-Teilreaktion, wurde ausgehend von den lokalen Konzentrationen $[O_2]_i$ und $[G]_i$ die Reaktionsraten $(r/N)_i$ bestimmt, aus denen über die Flussrate die Konzentrationszunahme des H_2O_2 berechnet und aufaddiert wurde. Aus der lokalen H_2O_2 -Konzentration wurden wiederum die neuen Werte für $[O_2]_i$ und $[G]_i$ berechnet. In Formeln ausgedrückt wurden im ersten Schritt die Substratkonzentrationen nach Gleichung (37) und (38) aktualisiert.

$$[G]_i = [G]_0 - [H_2O_2]_{i-1} \quad \text{mit } [G]_0 = (2,5; 10; 25 \text{ mM}), [H_2O_2]_0 = 0 \quad (37)$$

$$[O_2]_i = [O_2]_0 - [H_2O_2]_{i-1} \quad \text{mit } [O_2]_0 = 250 \text{ } \mu\text{M}, [H_2O_2]_0 = 0 \quad (38)$$

Die Reaktionsraten wurden nach Gleichung (9) berechnet, wobei $v/[E]_0$ durch r/N und k_{cat} durch r_{max}/N substituiert wurden. Für $(r/N)_i$ ergibt sich dann Gleichung (39).

$$\left(\frac{r}{N}\right)_i = \frac{\left(\frac{r_{max}}{N}\right)_i \cdot [G]_i}{K_{M,i} + [G]_i} \quad (39)$$

Die Michaelis-Menten-Parameter mussten wegen des O_2 -Verbrauchs ebenfalls an die aktuelle Sauerstoffkonzentration angepasst werden. Die Parameter aus Gleichung (9) wurden für $[O_2] < K_{O_2}$ ^[144] linear nach Gleichung (40) und (41) angenähert.

$$K_{M,0} = \frac{K_G [O_2]_0}{K_{O_2} + [O_2]_0} \approx \frac{K_G [O_2]_0}{K_{O_2}} \Rightarrow K_{M,i} = K_{M,0} \frac{[O_2]_i}{[O_2]_0} \quad \text{mit } K_{M,0} \text{ aus Tabelle 9.} \quad (40)$$

$$k_{cat} = \frac{V_1 [O_2]_0}{K_{O_2} + [O_2]_0} \approx \frac{V_1 [O_2]_0}{K_{O_2}} \Rightarrow \left(\frac{r_{max}}{N}\right)_i = \left(\frac{r_{max}}{N}\right)_0 \cdot \frac{[O_2]_i}{[O_2]_0} \quad (41)$$

mit $\left(\frac{r_{max}}{N}\right)_0$ aus Tabelle 9.

Durch Einsetzen der Ergebnisse aus Gleichung (40) und (41) und der lokalen Glukosekonzentration aus Gleichung (37) in Gleichung (39) konnten nun die lokalen H_2O_2 -Konzentration rekursiv nach (42) berechnet werden.

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_i = [\text{H}_2\text{O}_2]_{i-1} + \left(\frac{r}{N}\right)_i \cdot \frac{\Delta N}{Q} \quad (42)$$

Dabei wurde mit einer Schrittweite von $\Delta N = 5$ Partikel gerechnet. Bildlich gesprochen, wurden nach Kontakt der Lösung mit 5 Partikeln sämtliche Parameter neu berechnet. Nach diesem Modell wurden die von GOX produzierten H_2O_2 -Konzentrationen für die üblichen Flussraten und Konzentrationen berechnet. Die Ergebnisse für $N = 300$ und $N = 3000$ sind in Abbildung 71A und F dargestellt und werden später diskutiert.

Die resultierenden H_2O_2 -Konzentrationen dienen nun als Startwerte $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ für die Berechnung der Kinetik der HRP-beladenen Fritte, die analog erfolgte. Die Abnahme der Amplex Red- und der H_2O_2 -Konzentrationen wurden nach Gleichung (43) und (44) schrittweise berechnet.

$$[\text{Ax}]_i = [\text{Ax}]_0 - [\text{Res}]_{i-1} \quad \text{mit } [\text{Ax}]_0 = 100 \mu\text{M}, [\text{Res}]_0 = 0 \quad (43)$$

$$\begin{aligned} [\text{H}_2\text{O}_2]_i &= [\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{Res}]_{i-1} \quad \text{mit } [\text{Res}]_0 = 0 \quad \text{und} \\ [\text{H}_2\text{O}_2]_0 &\text{ als berechnetes Ergebnis der GOX-Fluidik} \end{aligned} \quad (44)$$

Mit diesen Werten konnte nun nach Gleichung (5) die Reaktionsrate berechnet werden. Auch hier wurden $v/[\text{E}]_0$ durch r/N und k_{cat} durch r_{max}/N substituiert. $(r/N)_i$ konnte dann nach Gleichung (45) berechnet werden.

$$\left(\frac{r}{N}\right)_i = \frac{\left(\frac{r_{max}}{N}\right)_i \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_i}{K_{M,i} + [\text{H}_2\text{O}_2]_i} \quad (45)$$

Wegen der linearen Abhängigkeit der Michaelis Menten Parameter von der Amplex Red Konzentration, vgl. Gleichung (5), konnten die Parameter nach Gleichung (46) und (47) der lokalen Konzentration $[\text{Ax}]_i$ angepasst werden.

$$K_{M,0} = \frac{k_3}{k_1} [\text{Ax}]_0 \Rightarrow K_{M,i} = K_{M,0} \frac{[\text{Ax}]_i}{[\text{Ax}]_0} \quad \text{mit } K_{M,0} \text{ aus Tabelle 8} \quad (46)$$

$$k_{cat} = k_3 \cdot [\text{Ax}]_0 \Rightarrow \left(\frac{r_{max}}{N}\right)_i = \left(\frac{r_{max}}{N}\right)_0 \cdot \frac{[\text{Ax}]_i}{[\text{Ax}]_0} \quad \text{mit } \left(\frac{r_{max}}{N}\right)_0 \text{ aus Tabelle 8} \quad (47)$$

Nach Berechnung aller Parameter konnte nun die lokale Resorufinkonzentration rekursiv nach Gleichung (48) berechnet werden.

$$[\text{Res}]_i = [\text{Res}]_{i-1} + \left(\frac{r}{N}\right)_i \cdot \frac{\Delta N}{Q} \quad (48)$$

Die makroskopische Reaktionsrate wurde schließlich aus der Resorufinproduktion der gesamten Schüttung nach Gleichung (49) berechnet.

$$\left(\frac{r}{N}\right)_i = [\text{Res}]_i \cdot \frac{Q}{i \cdot \Delta N} \quad (49)$$

Nach diesem Modell wurden nun ausgehend von der durch GOX produzierten H_2O_2 -Konzentration, die Reaktionsrate von HRP (über die gesamte Schüttung) und die daraus resultierende Resorufinkonzentration berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 71 dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 71A-C wurden für niedrige Partikelzahlen und gleich große Schüttungen mit $N(\text{GOX}) = N(\text{HRP}) = 300$ berechnet. In Teilabbildung A ist die Konzentration des H_2O_2 in Abhängigkeit von der Flussrate und der eingesetzten Glukosekonzentration dargestellt. Der maximale Umsatz beträgt etwa $33 \mu\text{M}$ und liegt damit bei 13 % des vorhandenen Sauerstoffs. Bezogen auf die eingesetzte Glukosekonzentration beträgt der Umsatz gerade einmal 0,12 %. Unter diesen Bedingungen sollte also keine Substraterschöpfung auftreten. Als Kontrolle ohne Glukose wurde eine von der Flussrate und der GOX-Kinetik unabhängige H_2O_2 -Konzentration von $1 \mu\text{M}$ angenommen, was in der Größenordnung der im realen Experiment vorliegenden H_2O_2 -Konzentrationen liegt, vgl. z. B. Abbildung 53 (S. 107) oder Abbildung 97 (S. 239).

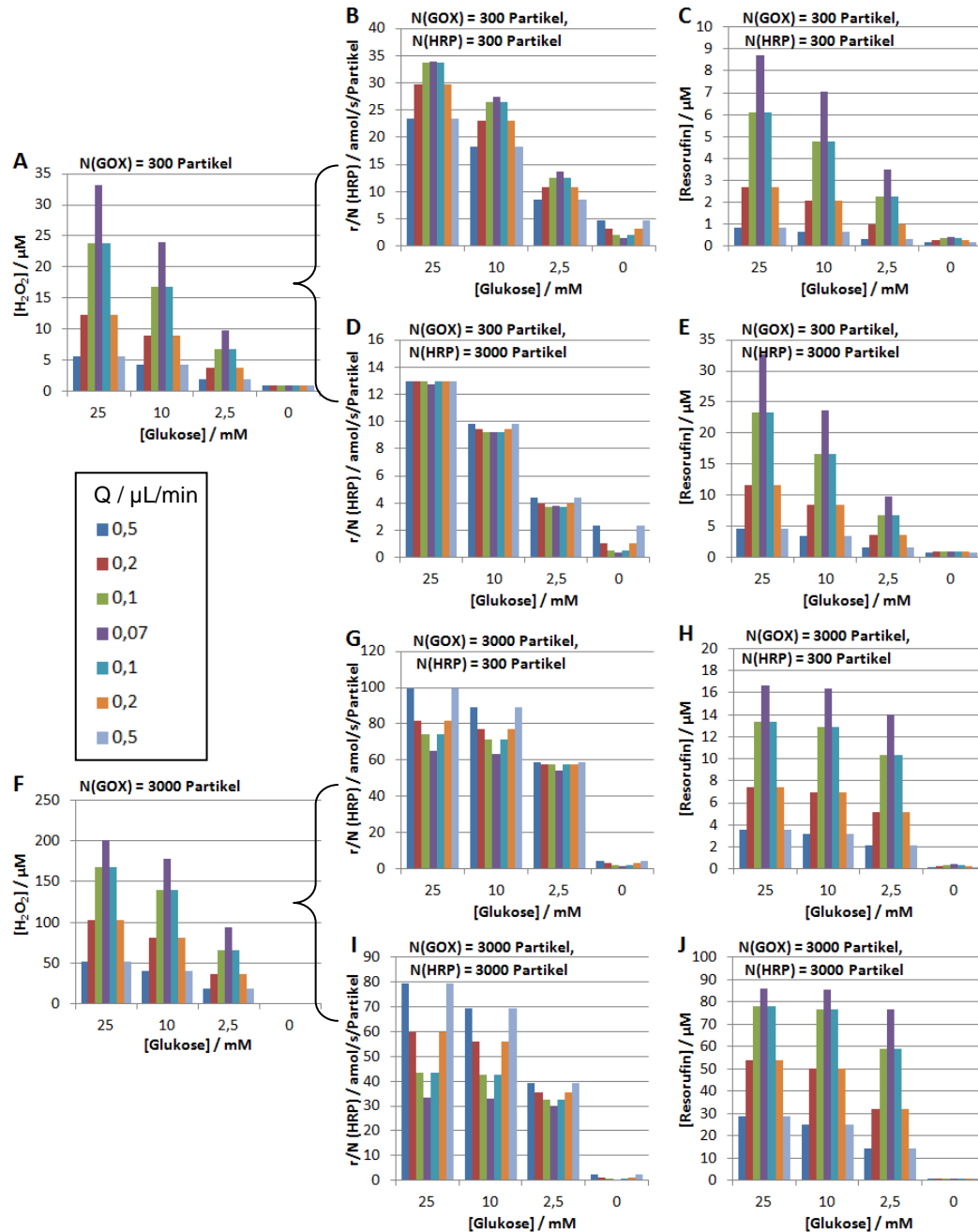


Abbildung 71: Berechnung der beiden Teilreaktionen als rekursive Reihenentwicklung. In **A** wurde die von 300 GOX-beschichteten Partikeln produzierte H_2O_2 -Konzentration für verschiedene Glukosekonzentration und Flussraten berechnet. In **B** wurden die Reaktionsraten r/N der nachgeschalteten Reaktion mit 300 HRP-beschichteten Partikeln für die in **A** berechneten H_2O_2 -Konzentrationen bestimmt. **C** zeigt die daraus resultierende Resorufinkonzentration, die im Mikroskopiebild detektiert werden kann. In **D** – **E** wurden die Ergebnisse für die in **A** berechneten H_2O_2 -Konzentrationen mit einem zehnfachen Überschuss HRP-beladener Partikel berechnet. **F** zeigt (ähnlich wie **A**) die von der zehnfachen GOX-Partikelzahl ($N = 3000$) gebildeten H_2O_2 -Konzentration. In **G** – **H** wurde ein zehnfacher Unterschuss der HRP-Partikel berechnet. In **I** und **J** liegen von beiden Enzymen 3000 Partikel vor. Bei den Kontrollen ohne Glukose wurde eine Hintergrundkonzentration von konstanten $1 \mu\text{M}$ H_2O_2 angenommen. Alle Berechnungen mit $[\text{Ax}]_0 = 100 \mu\text{M}$ und $[\text{O}_2]_0 = 250 \mu\text{M}$.

Aus den H_2O_2 -Konzentrationen wurden die normierten Reaktionsraten r/N von HRP für jede Flussrate berechnet und in Abbildung 71B aufgetragen. Die Reaktionsraten steigen bei niedrigen Flussraten, da hier überproportional mehr H_2O_2 aus der GOX-Reaktion zur Verfügung steht. Bei der Kontrolle hingegen wurde eine konstante H_2O_2 -Konzentration angenommen, die unabhängig von der Flussrate ist. Niedrige Flussraten führen in diesem Fall zu niedrigeren Reaktionsraten, da das H_2O_2 schnell verbraucht wird. Deshalb ist hier das typische Muster für Substraterschöpfung erkennbar.

Über die Reaktionsraten konnte schließlich die Konzentration des Resorufins berechnet werden. Diese Daten sind in Abbildung 71C dargestellt. Bezogen auf die eingesetzten $100\ \mu\text{M}$ Amplex Red ist der Umsatz kleiner als 10 %, aber bezogen auf die zuvor berechneten H_2O_2 -Konzentrationen (vgl. Teilabbildung A) werden Umsätze von etwa 15 – 35 % erreicht, mit Maxima bei niedrigen Flussraten.

Wie bereits erwähnt, wurden extreme Beispiele von GOX/HRP-Verhältnissen (300:3000; 3000:300 und 3000:3000 Partikeln) berechnet, die Kriterien zur Auswahl der Methode liefern, aber auch Aufschluss über die verschiedenen Fälle von Substraterschöpfung geben. Abbildung 71D-E zeigt die Ergebnisse mit in zehnfachem Überschuss eingesetzter HRP. Beim Vergleich von Teilabbildung E mit A ist ein nahezu vollständiger Umsatz erkennbar. Etwa 80 – 99 % des gebildeten H_2O_2 (A) wurden zu Resorufin (E) umgesetzt. Dadurch sind auch die Reaktionsraten in Teilabbildung D niedriger. Bei gleichen Ausgangsbedingungen wie in Teilabbildung B sinken sie um etwa 40 – 70 %, wobei die Abnahme bei den niedrigen Flussraten wegen des fast vollständigen Substratumsatzes am stärksten ist. Der Vorteil der höheren H_2O_2 -Konzentrationen bei niedrigen Flussraten (A), der eigentlich zu höheren Reaktionsraten führt (B), wird durch den Effekt der Substraterschöpfung bei großen Schüttungen genau ausgeglichen, so dass die Reaktionsraten bei 25 mM ein einheitliches Niveau erreichen. Bei den niedrigeren Glukosekonzentrationen (10 und 2,5 mM) ist dieser Ausgleich noch stärker, so dass bei niedrigen Flussraten die Substraterschöpfung dominiert.

In Abbildung 71F-J sind die Ergebnisse mit 3000 GOX-beschichteten Partikeln dargestellt. Teilabbildung F zeigt Anzeichen von Substraterschöpfung, da der vorhandene Sauerstoff, der mit einer Anfangskonzentration von $250\ \mu\text{M}$ festgesetzt wurde, zu weiten Teilen verbraucht wird. Dies ist erkennbar an den Werten für $Q = 0,07$, die relativ zu den

anderen Werten niedriger ausfallen. Außerdem ist die Konzentrationsabhängigkeit weniger ausgeprägt, als in Teilabbildung A. Auf dieser H_2O_2 -Konzentrationen basierend wurde nun die Kinetik von HRP für 1/10 der Partikel ($N = 300$) und für die gleiche Partikelzahl ($N = 3000$) berechnet.

Bei diesen hohen H_2O_2 -Konzentrationen gewinnt ein weiterer Aspekt an Bedeutung. Die Konzentrationen liegen bis zu fünfmal über dem K_M -Wert ($29 - 42 \mu\text{M}$, vgl. Tabelle 8) von auf Partikeln immobilisierter HRP. Die Reaktionsraten hängen nun nicht mehr so stark von der H_2O_2 -Konzentration ab, sondern werden hauptsächlich von den maximalen Reaktionsraten r_{max}/N bestimmt. Diese Werte sind aber nach Tabelle 8 stark flussratenabhängig, was die niedrigen Reaktionsraten bei niedrigen Flussraten erklärt.

In Abbildung 71I wird dieser Effekt durch eine größere Zahl HRP-beladener Partikel noch verstärkt. In einigen Fällen übersteigt die vorliegende H_2O_2 -Konzentration in F die eingesetzte Amplex Red Konzentration von $100 \mu\text{M}$, so dass hier bei den niedrigen Flussraten Substraterschöpfung des Amplex Reds auftritt. Die zugehörigen Reaktionsraten sind in I im Vergleich zu G stärker erniedrigt, und die Maxima in J sind abgeflacht.

Für die Bestimmung der Kinetik von GOX können nun, wie bereits angedeutet, zwei Strategien angewendet werden:

1. Wie in Abschnitt 2.6 können aus den Resorufinumsätzen die Reaktionsraten für HRP, daraus die H_2O_2 -Konzentrationen und daraus schließlich die Kinetik von GOX berechnet werden. Da HRP auch gebunden auf Partikeln vorliegt, können die Ergebnisse aus Abschnitt 0 zur Berechnung verwendet werden. Diese Methode ist anfällig gegen Substraterschöpfung, so dass möglichst geringe Partikelzahlen beider Enzyme eingesetzt werden sollten. Dieser Fall ist in Abbildung 71A-C berechnet und diskutiert worden.
2. Wie bei den Kinetikmessungen von GOX in der Mikrotiterplatte in Abschnitt 2.3.4 wird das Reporterenzym im Überschuss zugegeben, so dass es zu vollständigem Umsatz kommt. Die gebildete Resorufinkonzentration entspricht dann 1:1 der durch GOX gebildeten H_2O_2 -Konzentration, so dass die Auswertung zwei Rechenschritte weniger benötigt werden. Dieser Fall wurde in Abbildung 71A sowie D-E berechnet und diskutiert. Hier reichten aber selbst die 3000 Partikel nicht aus, um unter allen Bedingungen vollständigen Umsatz

zu erreichen. Darüber hinaus kann es bei niedrigen Flussraten wegen der langen Kontaktzeit zur Folgereaktion kommen, bei der Resorufin zu nichtfluoreszente Resazurin umgesetzt wird (vgl. Abschnitt 2.1.2.1).

Da in der Praxis Füllungen mit mehr als 1500 Partikel schwer zu realisieren waren, und zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus Abschnitt 2.6, wurde in dieser Arbeit die erste Methode angewendet.

2.7.2 Variation der Flussrate

Die Kinetik der Reaktionskaskade mit GOX- und HRP-funktionalisierten Partikeln wurde im nach Abbildung 72A konfigurierten mikrofluidischen Reaktor gemessen. Zunächst wurden Experimente unter konstanter Glukosekonzentration von 25 mM sowie 0 mM (Negativkontrolle) durchgeführt. Dabei wurde mit dem optimierten Flussratenprofil aus Abschnitt 2.5.3 die Flussrate stufenweise von 0,55 bis 0,12 $\mu\text{L}/\text{min}$ und zurück variiert. Um die dabei entstehenden Druckschwankungen abzumildern, wurde kontinuierlich mit $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ durch den Seitenkanal S2 abgesaugt, so dass an F2 die üblicherweise verwendeten Flussraten $Q = 0,5 - 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ vorherrschten. Als Konsequenz des Absaugens nach der Passage durch F1, wurden die Fritten jedoch mit unterschiedlichen Flussraten durchströmt. Dies musste bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Abbildung 72B zeigt ein Bild der beiden Schüttungen. In Teilabbildung C ist ein Fluoreszenzbild während der Reaktion dargestellt. Die GOX-beladenen Partikel an Fritte F1 generierten H_2O_2 , das als Substrat für das partikelgebundene HRP an F2 diente. Dort wurde Amplex Red zu fluoreszente Resorufin umgesetzt. Die Fluoreszenzentwicklung ist ausschließlich an der HRP-beladenen Fritte F2 erkennbar, es kam also nicht zu Kontaminationen beim Füllvorgang.

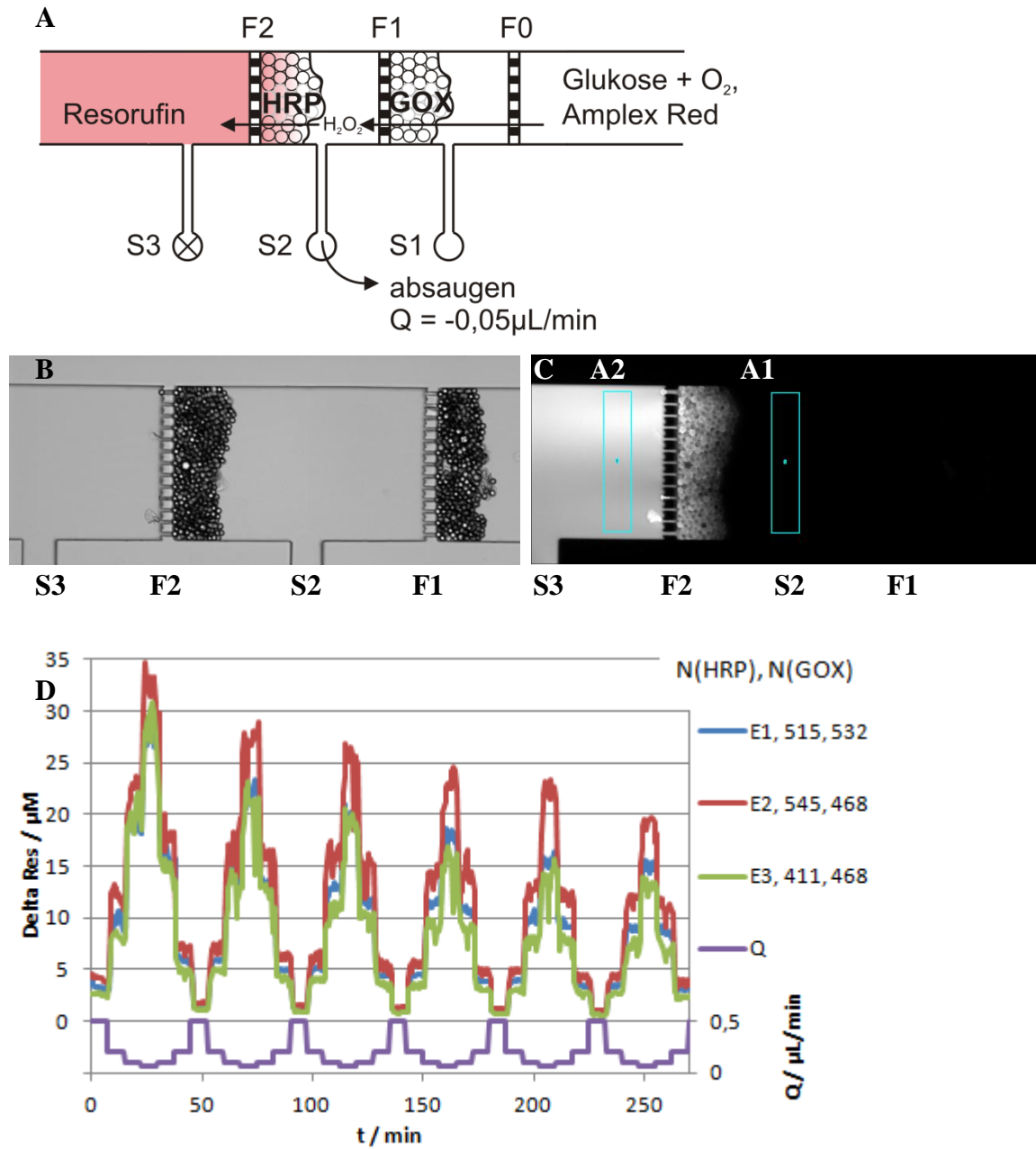


Abbildung 72: **A:** Fließschema für die Mikrofluidik mit GOX- und HRP-beladenen Partikeln mit konstanter Substratkonzentration. **B:** Durchlichtbild des Reaktors mit zwei beladenen Fritten. **C:** Fluoreszenzbild des Reaktors aus B mit $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$. Belichtungszeit 10 ms. Es ist erkennbar, dass die Fluoreszenz erst beim Durchlaufen von Fritte 2 entsteht. **D:** Aus den markierten Bereichen A1 und A2 in C wurde der Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ der gekoppelten Kinetik berechnet. Reaktion bei konstanten 25 mM Glukose und 100 μM Amplex Red und variablen Flussraten Q . Es sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten E1 – E3 dargestellt. E2 entspricht den Bildern in B und C. In der Legende zu jedem Experiment die jeweilige Anzahl N der HRP- und GOX-beschichteter Partikel angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil die Flussrate Q auf der rechten Achse aufgetragen.

In Abbildung 72D sind die Umsätze $\Delta[\text{Res}]$ der Kaskadenreaktion in der Mikrofluidik mit 25 mM Glukose gegen die Zeit aufgetragen. Die Umsätze betragen maximal 30 μM und lagen damit im linearen Bereich der Kalibrierkurve (vgl. Abbildung 86, S.233). Bezogen auf die eingesetzten 100 μM Ampex Red entsprach das einen Verbrauch von 30 %, so dass vermutlich keine Substraterschöpfung aufgetreten sein dürfte.

Alle drei Experimente zeigten das typische Muster: Je niedriger die Flussrate, desto höher die Resorufinproduktion. Die Stufen zu den jeweiligen Flussraten waren gut erkennbar. E2 zeigte insgesamt höhere Umsätze, was durch die höhere Zahl HRP-beladener Partikel erklärbar ist.

Im Lauf des Experiments nahm die Signalstärke ab, wobei der stärkste Rückgang, wie schon in Abschnitt 2.5.3 beobachtet, innerhalb des ersten Zyklus auftrat. Dies lag vermutlich an der Alterung der HRP, die dort bereits ausführlich diskutiert wurde. Die weitere Auswertung erfolgte deshalb, wie in Abschnitt 2.5.3 erläutert, über einen exponentiellen Fit, um die Alterung zu quantifizieren und die ursprünglichen kinetischen Eigenschaften der Enzyme zu bestimmen.

Da die HRP-beladene Fritte, wie in Abschnitt 2.5.3.3 diskutiert, auch ohne H_2O_2 Resorufin produzierte, musste dieser unspezifische Beitrag auch in der zweistufigen Reaktion quantifiziert werden und von den Umsätzen subtrahiert zu werden. Dazu wurden die Umsätze des mit beiden Enzymen beladenen Reaktors in Abwesenheit von Glukose gemessen. Die Ergebnisse dieser Negativkontrolle entsprachen von der Größenordnung und dem Alterungsverhalten weitestgehend der Kontrolle in Abschnitt 2.5.3.3 und sind im Anhang in Abbildung 97 dargestellt.

Durch Multiplikation der Umsätze mit der Flussrate Q und Normierung auf die HRP-Partikelzahl nach Gleichung (24) wurden die normierten Reaktionsraten r/N für jedes Experiment berechnet. Die weitere Datenprozessierung erfolgte durch Mittelwertbildung der Stufen und Subtraktion der analog prozessierten Negativkontrolle. Die Einzelexperimente wurden hier noch nicht gemittelt, da unterschiedliche Anzahlen von GOX-Partikeln vorlagen und dementsprechend unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen als Edukt für die HRP Reaktion zur Verfügung standen. In Abbildung 73A sind die so berechneten normierten Reaktionsraten r/N von E1 exemplarisch als Säulendiagramm dargestellt.

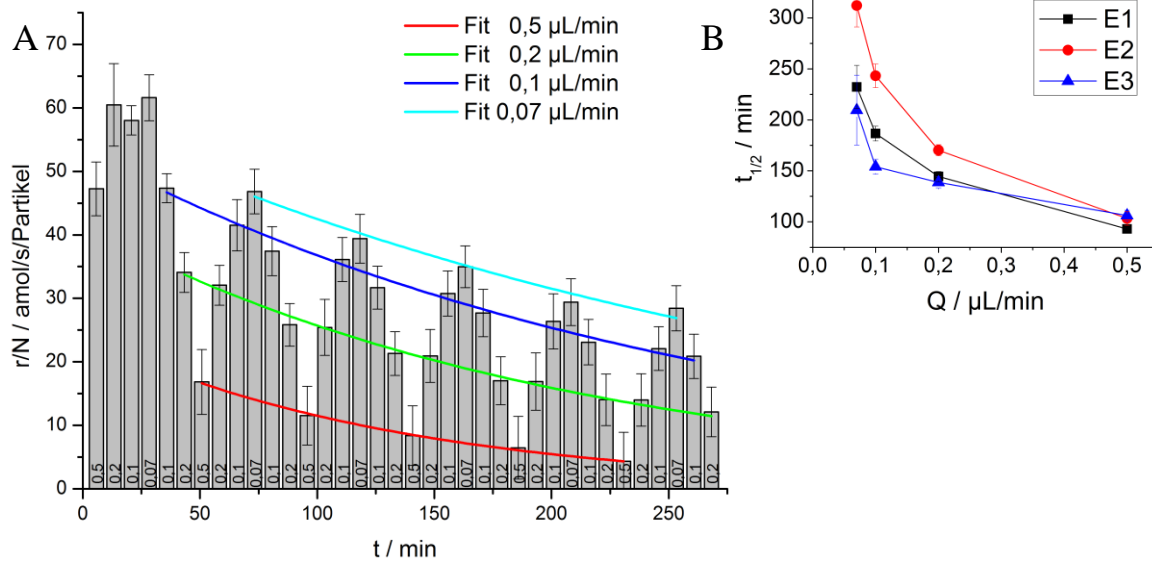


Abbildung 73: **A:** Auf die HRP-Partikelzahl normierte und hintergrundkorrigierte Reaktionsrate r/N am Beispiel von Experiment E1 der Mikrofluidik mit GOX- und HRP-beladenen Fröitten mit konstanten 25 mM Glukose und 100 μM Amplex Red. Die zugehörigen Flussraten Q sind in den Säulen angegeben. Die Kurven gleicher Flussrate Q wurden nichtlinear nach Gleichung (25) angepasst. Die ersten vier Werte wurden als Ausreißer nicht berücksichtigt. **B:** Auftragung der gefitteten Halbwertszeiten gegen die Flussrate.

Die normierten Reaktionsraten zeigten die erwartete starke Flussratenabhängigkeit, die dem in Abschnitt 2.7.1, Abbildung 71B berechneten Muster für niedrige Partikelzahlen entspricht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HRP-Mikrofluidik mit nur einem Enzym (Abbildung 54), wurde hier ein gegensätzliches Verhalten beobachtet. Dort führten langsame Flussraten zu längeren Kontaktzeiten, die besonders bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen zu fast vollständigem Verbrauch des Substrats führten. Durch diese Substraterschöpfung verringerten sich schließlich die Reaktionsraten. Bei der hier betrachteten Enzymkaskade fand die HRP-Reaktion aber nicht unter konstanter H_2O_2 -Konzentration statt, sondern das H_2O_2 wurde, wie in Abschnitt 2.7.1 für niedrige Partikelzahlen berechnet, an der vorgelagerten GOX-beladenen Fritte produziert. Je langsamer die Flussrate war, desto mehr H_2O_2 wurde dort gebildet und stand für die nachgelagerte HRP-Reaktion zur Verfügung (Abbildung 71A). Dies führte folglich nicht zu Substraterschöpfung, sondern im Gegenteil zu einer Beschleunigung der Reaktion.

Wegen der starken Alterung wurde für alle Datensätze analog zu Abschnitt 2.5.3 die Abnahme exponentiell nach Gleichung (25) angepasst, um auf die ursprünglichen normierten Reaktionsraten r_0/N zu Beginn des Experiments zu extrapolieren. Die gleichzeitig

bestimmten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ sind in Abbildung 73B gegen die Flussrate aufgetragen. Sie lagen zwischen 80 und 300 min und damit in der gleichen Größenordnung, wie sie bei der Fluidik mit HRP-funktionalisierten Partikeln in Abbildung 55 beobachtet wurde (50 – 350 min). Die starke Abnahme der Enzymaktivität lag vermutlich, wie bereits diskutiert, an der Deaktivierung von HRP durch das im Reaktor gebildete H_2O_2 . Das H_2O_2 könnte außerdem mit dem STV reagieren und so die Immobilisierung aufheben. Auch die Strömung übte Kräfte auf die immobilisierten Enzyme aus, so dass HRP und GOX ausgewaschen werden könnten.

Die auf den Anfang des Experimentes extrapolierten normierten Reaktionsraten r_0/N wurden in Abbildung 74A gegen die Flussrate aufgetragen. Da die exponentielle Anpassung nach Gleichung (25) die Alterung gut abbildete, betrug die Standardfehler der Daten maximal 10 %. Die Reaktionsraten ließen sich in den drei Experimenten gut reproduzieren. Bei niedrigen Flussraten zeigte E3 die höchsten Werte, da bei nur 411 HRP-beladenen Partikeln der Substratverbrauch am geringsten war und damit die Umsetzung mit HRP am effizientesten war.

Zusätzlich wurden Reaktionsraten für $N(\text{GOX}) = N(\text{HRP}) = 500$ nach dem in Abschnitt 2.7.1 vorgestellten Verfahren berechnet und ebenfalls in Abbildung 74A aufgetragen. Die theoretischen Daten lagen in der gleichen Größenordnung wie die experimentellen, wobei die Flussratenabhängigkeit weniger ausgeprägt ist. Besonders bei den niedrigen Flussraten $Q = 0,07$ und $0,1 \mu\text{L}/\text{min}$ waren die theoretisch berechneten Werte geringer, da sie auf den experimentellen Ergebnissen der Mikrofluidik mit den einzelnen Enzymen beruhen, die bei niedrigen Flussraten durch Substraterschöpfung ungenau waren.

Die extrapolierten normierten Reaktionsraten r_0/N lagen im Wertebereich der in Abbildung 56A (Seite 119) aufgetragenen Ergebnisse der HRP-Fluidik (10 – 120 amol/s/Partikel), die als Kalibrierkurve dient. Mit Hilfe der in Abschnitt 0 bestimmten kinetischen Konstanten für die HRP-beladene Fritte konnten nun die zugrunde liegenden H_2O_2 -Konzentrationen berechnet werden.

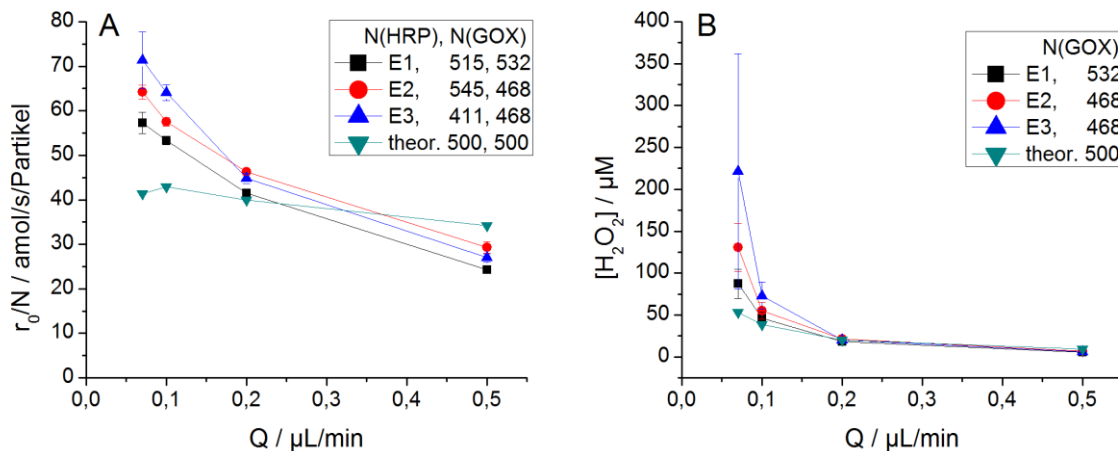


Abbildung 74: Ergebnisse der HRP-Teilreaktion: **A:** Auftragung der extrapolierten normierten Reaktionsraten r_0/N gegen die Flussrate Q . Zusätzlich wurden nach Abschnitt 2.7.1 Reaktionsraten für $N(GOX) = N(HRP) = 500$ berechnete und ebenfalls aufgetragen (theor.). **B:** Auftragung der daraus nach Gleichung (50) und den Parametern aus Tabelle 8 (Seite 122) berechneten H_2O_2 -Konzentrationen gegen die Flussrate Q . Die Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

Die berechneten H_2O_2 -Konzentrationen stiegen überproportional bei niedrigen Flussraten.

Die Berechnung erfolgte nach der nach $[H_2O_2]$ umgeformten Michaelis Menten Gleichung (50), wobei hier statt der Geschwindigkeiten v_0 wie in Gleichung (34) die Reaktionsraten r_0/N für immobilisierte HRP eingesetzt wurden. Um auch die Flussratenabhängigkeit zu berücksichtigen, wurde für jede Flussrate Q das entsprechende Wertepaar von K_M und r_{max}/N aus Tabelle 8 für die Berechnung verwendet. Die nach Gleichung (50) bestimmten H_2O_2 -Konzentrationen wurden in Abbildung 74B gegen die Flussrate aufgetragen. Zusätzlich wurde auch die nach Abschnitt 2.7.1 berechnete H_2O_2 -Konzentration basierend auf 500 GOX-funktionalisierten Partikeln ergänzt.

$$[H_2O_2] = \frac{\frac{r_0}{N} \cdot K_M}{\frac{r_{max}}{N} - \frac{r_0}{N}} \quad (50)$$

Die so bestimmten H_2O_2 -Konzentrationen konnten nun als Produkt der Kinetik der GOX-beladenen Fritte weiterdiskutiert werden. Bezogen auf die eingesetzte 25 mM Glukose kam es zu Umsätzen von 0,02 – 0,9 %. Der Substratverbrauch war also zu vernachlässigen. Auf den gelösten Sauerstoff bezogen (253 µM) wurden bis zu 87 % umgesetzt, so dass hier eine Verringerung der Reaktionsrate durch Substraterschöpfung besonders bei niedrigen Flussraten auftreten konnte.

Die H_2O_2 -Konzentrationen nahmen bei höheren Flussraten ab, da die Kontaktzeit mit den GOX-beladenen Partikeln kürzer war. Bei niedrigen Flussraten stiegen die Umsätze und es wurden bis zu $220 \mu\text{M}$ H_2O_2 gebildet. Die H_2O_2 -Konzentrationen waren bis auf eine Ausnahme in der gleichen Größenordnung, wie sie in der HRP-Fluidik ($5 - 100 \mu\text{M}$) eingesetzt wurden. Deshalb wurde hier auch ein ähnliches Alterungsverhalten der HRP-beladenen Fritte beobachtet, was an den Halbwertszeiten Abbildung 73B erkennbar ist.

Wie bereits in Abschnitt 2.6.1 diskutiert, führten hohe Reaktionsraten in der Größenordnung von r_{max}/N wegen der Nichtlinearität der Michaelis Menten Beziehung zu ungenauen Ergebnissen bei der Berechnung der H_2O_2 -Konzentration. Im Sättigungsbereich der Michaelis-Menten Kinetik konnten die Reaktionsraten aber nur weiter steigen, wenn überproportional mehr Edukt H_2O_2 zur Verfügung stand. Gleichzeitig nahm die Genauigkeit der H_2O_2 -Bestimmung im Sättigungsbereich der Michaelis Menten Kinetik ab, was an den erhöhten Fehlern bei niedrigen Flussraten erkennbar ist. Aus diesem Grund wurde bei E3 der Wert bei $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ nicht weiter berücksichtigt.

Die Reaktionsrate von GOX konnte aus der H_2O_2 -Konzentration berechnet werden.

Aus der H_2O_2 -Konzentration konnte nun analog zur Auswertung der HRP-Fluidik in Abschnitt 2.5.3 bzw. der GOX-Fluidiken in Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2 durch Multiplikation mit der Flussrate und Normieren auf die Partikelzahl nach Gleichung (24) die normierte Reaktionsrate r/N der GOX-Reaktion berechnet werden. Dabei ist zu beachten, dass während des Experiments kontinuierlich mit $-0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ durch den Seitenkanal S2 abgesaugt wurde, um Flackern und Verwirbelungen durch Drucksprünge zu vermeiden. Die Flussraten an der GOX-beladenen Fritte waren deshalb im Pumpenprotokoll um $0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ erhöht. Über das Zwischenraumraumvolumen V_{Zw} und die Partikelzahl konnte schließlich nach Gleichung (30) die Reaktionsgeschwindigkeit v für GOX bestimmt werden. Da hier auf die Partikelzahl normiert wurde, konnte nun der Mittelwert aus den drei Experimenten gebildet werden. Die Ergebnisse und die Mittelwerte sind in Abbildung 75A und B gegen die Flussrate aufgetragen. Zusätzlich wurden die Basisdaten der Berechnungen nach Abschnitt 2.7.1 ergänzt, die auf den Ergebnissen aus Abschnitt 2.6.2 (Tabelle 9, S. 149) beruhen und für 25 mM Glukose umgerechnet wurden.

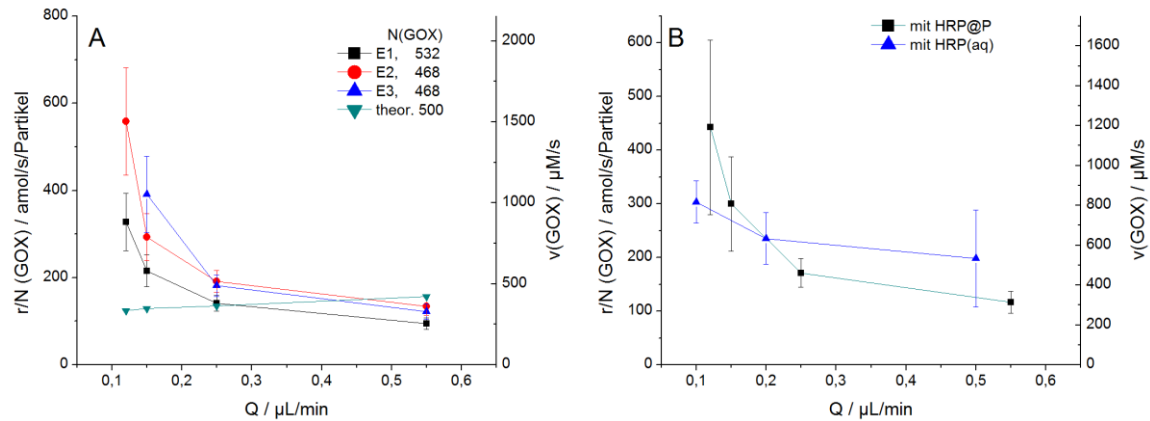


Abbildung 75: Auftragung der Reaktionsrate r/N und der Reaktionsgeschwindigkeit v der GOX-beladenen Fritte gegen die Flussrate. **A:** Einzelergebnisse der drei Experimente (E1-E3) und Grundlage der theoretischen Berechnungen (theor.). In der Legende sind die zugehörigen GOX-Partikelzahlen angegeben. **B:** Mittelwerte der drei Experimente, wobei der Wert von E3 bei $Q = 0,07$ als Ausreißer nicht berücksichtigt wurde. Zum Vergleich sind die Ergebnisse mit dem gelösten Reporterenzym nHRP_(aq) aus Abbildung 64 aufgetragen.

Die normierten Reaktionsraten in Abbildung 75A zeigen ähnliches Verhalten wie die daraus resultierenden H_2O_2 -Konzentrationen in Abbildung 74B. Durch die Normierung sind die Kurven jetzt direkt vergleichbar. In E1 reagierte GOX mit niedrigeren Reaktionsraten, was auf die Normierung auf die höhere Partikelzahl zurückzuführen ist. Die Streuung der Ergebnisse illustriert die generell zu erwartende Abweichung in der Mikrofluidik mit zwei beladenen Fritten.

Dies ist auch an den Standardabweichungen der Mittelwerte in Abbildung 75B erkennbar. Sie betragen bei niedrigen Flussraten etwa 40 % des Mittelwerts. Da bei niedrigen Flussraten die Kontaktzeiten und der Substratverbrauch höher waren, war dies vermutlich die Ursache für die Streuung der Daten. Durch die zweistufige Enzymkaskade pflanzten sich kleine Schwankungen im Experiment und bei der späteren Datenprozessierung fort und verstärkten sich.

Die Abbildung 75A ebenfalls aufgetragenen „theoretischen“ Werte wurden aus den experimentell ermittelten Michaelis Menten Parametern der Mikrofluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln mit HRP in Lösung (Tabelle 9, S. 149) für die hier eingesetzten 25 mM Glukose berechnet. Auf diesen Daten beruhen die theoretisch berechneten Kurven in Abbildung 73 und Abbildung 74. Die Flussratenabhängigkeiten unterschieden sich, wobei theoretisch eine Steigerung bei höheren Flussraten zu erwarten wäre.^[138] Die Ergebnisse der zweistufigen Kinetik mit immobilisierter HRP waren demnach bei niedrigen Flussraten zu

hoch. Die Substraterschöpfung von Amplex Red oder Sauerstoffs im Experiment kann aber nicht der Grund sein, da sie im Gegenteil eine Abnahme der Reaktionsraten bei niedrigen Flussraten bewirken würde. Vermutlich handelt es sich um ein Artefakt der mehrstufigen Auswertung und der zugrunde liegenden Parameter der HRP-Kinetik, bei deren Bestimmung in Abschnitt 0 bei niedrigen Flussraten Substraterschöpfung auftrat.

In Abbildung 75B sind neben den Mittelwerten zum Vergleich auch die Ergebnisse aus Abschnitt 2.6.1 mit GOX-beschichteten Partikeln mit dem gelösten Reporterenzym HRP(aq) aufgetragen. Die Reaktionsraten betragen etwa 200 – 300 amol/s/Partikel, so dass hier mit dem immobilisierten Reporterenzym im Rahmen der Messgenauigkeit ähnliche Werte erhalten wurden, die aber eine stärkere Flussratenabhängigkeit aufwiesen. Der Unterschied hängt vermutlich ebenfalls mit den verwendeten Parametern der HRP-Kinetik zusammen, die im Fall des gelösten Reporterenzym unabhängig von der Flussrate angenommen wurden und im Fall des immobilisierten Reporterenzym nach Tabelle 8 für jede Flussrate individuell eingesetzt wurden und teilweise von Substraterschöpfung betroffen waren.

Die Reaktionsraten bei hohen Flussraten ($Q = 0,25$ und $0,55 \mu\text{L}/\text{min}$) besaßen niedrigere Standardabweichungen und waren vermutlich nicht von Substraterschöpfung betroffen. Sie stimmen mit 120 – 170 amol/s/Partikel gut mit dem nach Gleichung (35) in der Mikrotiterplatte berechneten Wert $r/N = 165$ amol/s/Partikel für partikelbeladene GOX bei 25 mM Glukose überein.

Abschließend betrachtet konnten die zwei Enzyme der Enzymkaskade an zwei verschiedenen Fritten des Festbettreaktors erfolgreich in Form von Schüttungen platziert werden. Beide Enzyme waren funktional und ermöglichten die zweistufige Reaktionskaskade. Die Fluoreszenzentwicklung fand lokalisiert an der zweiten Fritte statt. Dies beweist, dass kein bHRP die flussaufwärts liegende Schüttung kontaminiert hatte. Die Auswertung über die separat bestimmten kinetischen Daten des immobilisierten Reporterenzym war möglich, allerdings pflanzten sich Schwankungen im zweistufigen Experiment und später in der zweistufigen Auswertung fort, was zu großen Streuungen im Ergebnis führt. Die Ergebnisse der Modellrechnung lagen in der gleichen Größenordnung, waren aber ebenfalls fehlerbehaftet, da sie auf den in Abschnitt 0 und 2.6.2 experimentell bestimmten Parameter basieren.

Flussraten das Totvolumen zwischen Y-Stück und Reaktor, das wie eine Probenschleife wirkte, durch Lösung der gewünschten konstanten Konzentration ausgetauscht. Dabei wurde gleichzeitig 90 % der Lösung durch S1 abgepumpt, um die Enzyme flussabwärts zu schonen. Beim Messzyklus wurde die Lösung gewünschter Konzentration mit verschiedenen Flussraten durch den Reaktor gepumpt, wobei zur Unterdrückung von Druckschwankungen bei Flussratenwechseln kontinuierlich durch S2 mit $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ abgesaugt wurde. Die unterschiedlichen Flussraten an F1 und F2 mussten bei der Auswertung berücksichtigt werden. Wegen der zu erwartenden Alterung wurden hier nur vier Zyklen verschiedener Konzentrationen programmiert, bevor das Flussratenprofil von vorn begann. Weitere Details sowie das Flussratenprotokoll sind im Abschnitt 4.3.8.5 beschrieben.

Das Flussratenprotokoll wurde mit Resorufin getestet, um die Genauigkeit und Stabilität der eingestellten Konzentration zu verifizieren. Der Zeitverlauf von drei Durchläufen ist in Abbildung 77 dargestellt. Die gemessenen Resorufinkonzentrationen entsprachen den Erwartungswerten und konnten reproduzierbar wiederholt werden. Die Kurven waren glatt und es kam nicht zu Rauschen oder Flackern.

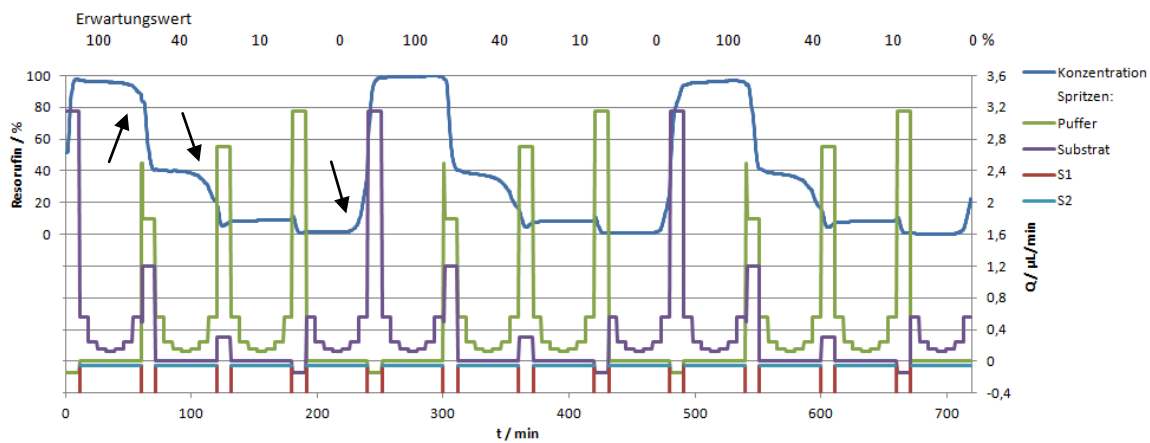


Abbildung 77: Kontrolle des optimierten Flussratenprofils mit Resorufin. Die Flussraten Q sind auf der rechten Achse aufgetragen. Das Flussratenprofil ist außerdem in Tabelle 19 (S. 218) aufgelistet. Während des Konzentrationswechsels wurde jeweils durch S1 mit $Q = -2,7 \mu\text{L}/\text{min}$ Lösung abgepumpt, die Werte wurden in der Darstellung zur besseren Übersicht unten abgeschnitten. Oben sind die erwarteten Konzentrationen für die Zyklen angegeben. Die Pfeile zeigen Abweichungen der Konzentration am Ende der Zyklen.

Abbildung 77 zeigt jedoch, dass die Konzentrationen nicht für die Dauer eines Zyklus konstant blieben, sondern kurz vor Einstellung der nächsten Konzentration abdrifteten, was mit Pfeilen markiert wurde. Bei 100 % wich die Konzentration bei der letzten Flussrate ($t = 53 - 60 \text{ min}$, $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$) nach unten ab. Bei den Wiederholungen ($t = 240 - 300$ und

480 – 540 min) blieb sie aber bis zum Ende des Zyklus konstant. Bei 40 und 0 % wich die Konzentration schon bei den letzten beiden Flussratenstufen ($t = 106 - 120, 226 - 240$ min usw.) ab. Die 10 % Stufen blieben dagegen konstant.

Wie oben diskutiert, wurde die Glukosekonzentration im Totvolumen mit zwei Spritzen verschiedener Konzentration eingestellt. Der Flussratenzyklus wurde aber nur mit einer Spritzenpumpe gesteuert, da sonst die Geschwindigkeiten der Schrittmotoren zu niedrig waren, was zu Abbrüchen führte. Beim verwendeten Protokoll war dieser Bereich zu großzügig bemessen (vgl. Tabelle 19, S. 218) und überstieg das tatsächliche Totvolumen, so dass am Ende des Zyklus das Mischungsverhältnis nicht mehr korrekt war.

Aus Zeitgründen wurde das Flussratenprofil nicht weiter optimiert. Die in Abbildung 77 gemessenen Abweichungen konnten aber bei der Auswertung der Enzymkaskade genutzt werden, um mögliche Ausreißer zu identifizieren.

2.7.3.2 Mikrofluidikexperimente und Auswertung nach Michaelis Menten

Die Messungen der gekoppelten Kinetik erfolgten nach dem in Abschnitt 2.7.3.1 entwickelten Flussratenprofil mit 25; 10; 2,5 und 0 mM Glukose. Es wurden vier unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Schüttungen (E1 – E4 in Abbildung 78) durchgeführt. Um gleichzeitig die Reproduzierbarkeit bzw. das Alterungsverhalten zu untersuchen, wurde das Flussprofil jeweils drei- bis viermal durchlaufen. In den vier Experimenten nahm die Datenqualität mit der Zeit ab. In Abbildung 78 sind daher nur die ersten 5 h, also ein kompletter Durchlauf des Pumpenprofils plus die Wiederholung der ersten Konzentration aufgetragen.

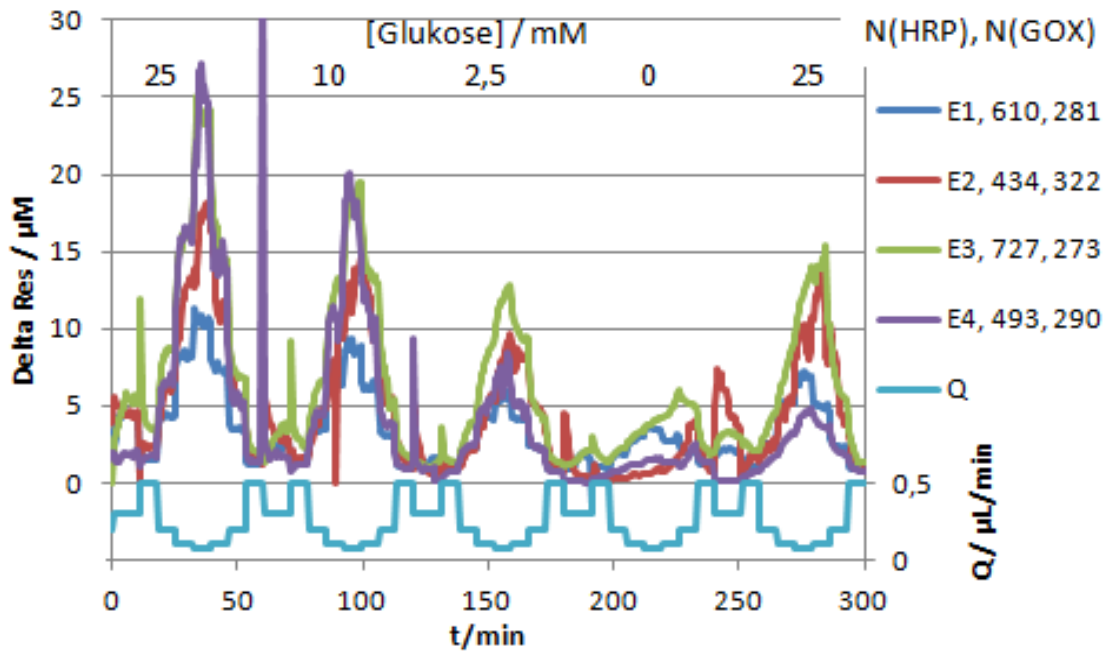


Abbildung 78: Umsatz $\Delta[\text{Res}]$ der zweistufigen Mikrofluidik mit GOX und HRP auf Partikeln mit variabler Glukosekonzentration, 100 μM Amplex Red und variablen Flussraten Q . Es sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten (E1-E4) dargestellt. Oben sind die Glukosekonzentrationen zu den Zyklen angegeben. In der Legende sind zu jedem Experiment die jeweilige Anzahl N der HRP- und GOX-beschichteten Partikel angegeben. Zusätzlich ist im unteren Teil die Flussrate Q auf der rechten Achse aufgetragen.

Die Umsätze $\Delta[\text{Res}]$ zeigten im ersten Zyklus (10 – 60 min) die erwartete stufenförmige Abhängigkeit von der Flussrate. In den folgenden Zyklen nahmen die Umsätze proportional zu der über das Pumpenprofil eingestellten Glukosekonzentration ab. Allerdings unterschieden sich die Umsätze der 4 Experimente stark. Das lag an den unterschiedlichen Partikelzahlen, bzw. daran, dass der Reaktor bei Verwendung des Y-Stücks zum Einstellen der Konzentration und mit beiden aufgestochenen Seitenkanälen zum Beladen der Fritten besonders empfindlich gegen Druckschwankungen und Turbulenzen war.

Im Vergleich zu den Experimenten mit konstanter Glukosekonzentration (25 mM) in Abbildung 72 waren die Umsätze in der gleichen Größenordnung, allerdings war die Datenqualität hier verschlechtert. Auch dort waren beide Fritten belegt, so dass die Beladung von zwei Fritten nicht die Ursache sein konnte. Allerdings gab es zwei Unterschiede:

- 1) Die Konzentration wurde hier über zwei mit einem Y-Stück verbundenen Spritzen eingestellt. Zusätzliche Schläuche, Verzweigungen und Spritzen erhöhen die

Elastizität des Systems und machen es anfälliger für Druckschwankungen, da die fluidische Kapazität steigt.^[42]

- 2) Wie in Abschnitt 2.7.3.1 diskutiert, stand zum Pumpen der Seitenkanäle nur eine einzige Spritze zur Verfügung, die über ein Ventil die Seitenkanäle ansteuerte. Beim Schalten des Ventils zum Wechseln von der Konzentrationswechselphase (S1, $Q = -2,7\mu\text{L}/\text{min}$) auf den Flussratengradient (S2, $Q = -0,05\mu\text{L}/\text{min}$) und umgekehrt kam es zu schlagartigem Drucksprüngen, so dass im Seitenkanal angereichertes Resorufin in den Hauptkanal strömen konnte. Das führte zu den großen Peaks bei E3 und E4 (ca. 10 min, 60 min, etc.). Dadurch wurden die Partikelschüttungen jedoch nicht verwirbelt, was über das Mikroskop überprüft wurde. Diese Bereiche waren zwar für die Auswertung nicht relevant, trotzdem brauchte der Reaktor länger, um die starken Drucksprünge zu kompensieren.

Im Verlauf des Experiments verloren die Stufen an Kontur. Einzig E1 zeigte bis zum Ende klare Stufen, lieferte aber insgesamt den geringsten Umsatz. Bei E2 – E4 traten vermutlich biologische Kontaminationen auf, die allmählich die Schüttungen zusetzten und damit den Strömungswiderstand erhöhten. Ohne H_2O_2 und mit Glukose und BSA im Puffer herrschten offenbar ideale Bedingungen für Bakterienwachstum.

Der Bereich 191-240 min, bei dem keine Glukose im System sein sollte, zeigte eine deutliche Hintergrundaktivität, die aber vergleichbar mit der Kontrolle bei konstanter Konzentration aus Abschnitt 2.7.2 war, die in Abbildung 97 (Anhang) dargestellt ist. Bei E2 und E3 war hier jedoch die Stufenstruktur nicht mehr erkennbar und das Maximum war nach rechts verschoben, was ebenfalls auf starkes Bakterienwachstum hinweist.

Im weiteren Verlauf der Experimente nahm die Datenqualität weiter ab, weshalb in Abbildung 78 nur die Daten bis 300 min dargestellt wurden. Der 5. Peak, bei dem erneut 25 mM Glukose eingestellt war, lag deutlich niedriger als zu Beginn des Experiments. Durch das *in situ* erzeugte H_2O_2 wurde GOX zwar weniger beansprucht, aber das flussabwärts liegende HRP wurde, wie schon in Abschnitt 0 und 2.7.2 diskutiert, vom H_2O_2 deaktiviert und verstärkt weggeschwemmt. Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse musste also die Alterung berücksichtigt werden.

Die Halbwertszeiten der Enzyme waren höher als erwartet.

Dazu wurden durch Multiplikation mit der Flussrate und Normierung auf die HRP-Partikelzahl nach Gleichung (24) die normierten Reaktionsraten r/N für jede Experiment berechnet und aus den jeweils letzten 3 min der Stufen die Mittelwerte gebildet. Wegen der variablen Glukosekonzentrationen wiederholten sich die Reaktionsbedingungen gleicher Konzentration und gleicher Flussrate erst nach vier Zyklen, also nach 240 min. In Abbildung 78 ist jedoch erkennbar, dass nach 240 min bei E2 – E4 bereits die Stufenstruktur verwischte und teilweise sehr unsymmetrische Signale entstanden. E1 hingegen zeigte für drei Durchläufe (720 min) erkennbare Stufenmuster und wurde stellvertretend für alle vier Experimente nach Gleichung (25) exponentiell gefittet. Die Daten wurden als Säulendiagramm in Abbildung 98 (Anhang) gegen die Zeit aufgetragen. Die daraus bestimmte Halbwertszeit betrug $t_{1/2} = 387 \pm 39$ min und war damit um den Faktor 1,5 – 10 größer, als für die Einzelexperimente mit konstanter Glukosekonzentration in Abschnitt 2.7.2 beobachtet worden ist. Dieser Unterschied dürfte mit der Auswertung, aber auch mit der Alterung im Experiment selber zusammenhängen. In Abschnitt 2.7.2 wurde vor dem Exponentialfit die Kontrolle ohne Glukose subtrahiert, was die betrachteten Exponentialkurven stärker krümmte und damit bei der Anpassung zu kürzeren Halbwertszeiten führte. Da hier die Kontrolle nicht als separates Experiment, sondern als jeweils vierter Zyklus gemessen wurde, unterlag sie einer längeren Alterung (180 –240 min), als die drei vorher gemessenen Zyklen (0 – 60 min/25 mM; 60-120 min/5 mM und 120-180 min/2,5 mM) und konnte noch nicht subtrahiert werden. Die Werte waren also nicht direkt miteinander vergleichbar.

Der wesentliche Unterschied war jedoch, dass im hier diskutierten Experiment die Glukosekonzentration variiert wurde. Von den jeweils vier Zyklen eines Durchlaufs wurden zwei Zyklen mit reduzierter Glukosekonzentration und der jeweils vierte ohne Glukose gemessen. Deshalb war auch das *in situ* produzierte H_2O_2 im Mittel wesentlich niedriger konzentriert, was, wie in Abschnitt 2.5.2 diskutiert, die Lebensdauer der Enzyme verlängerte.

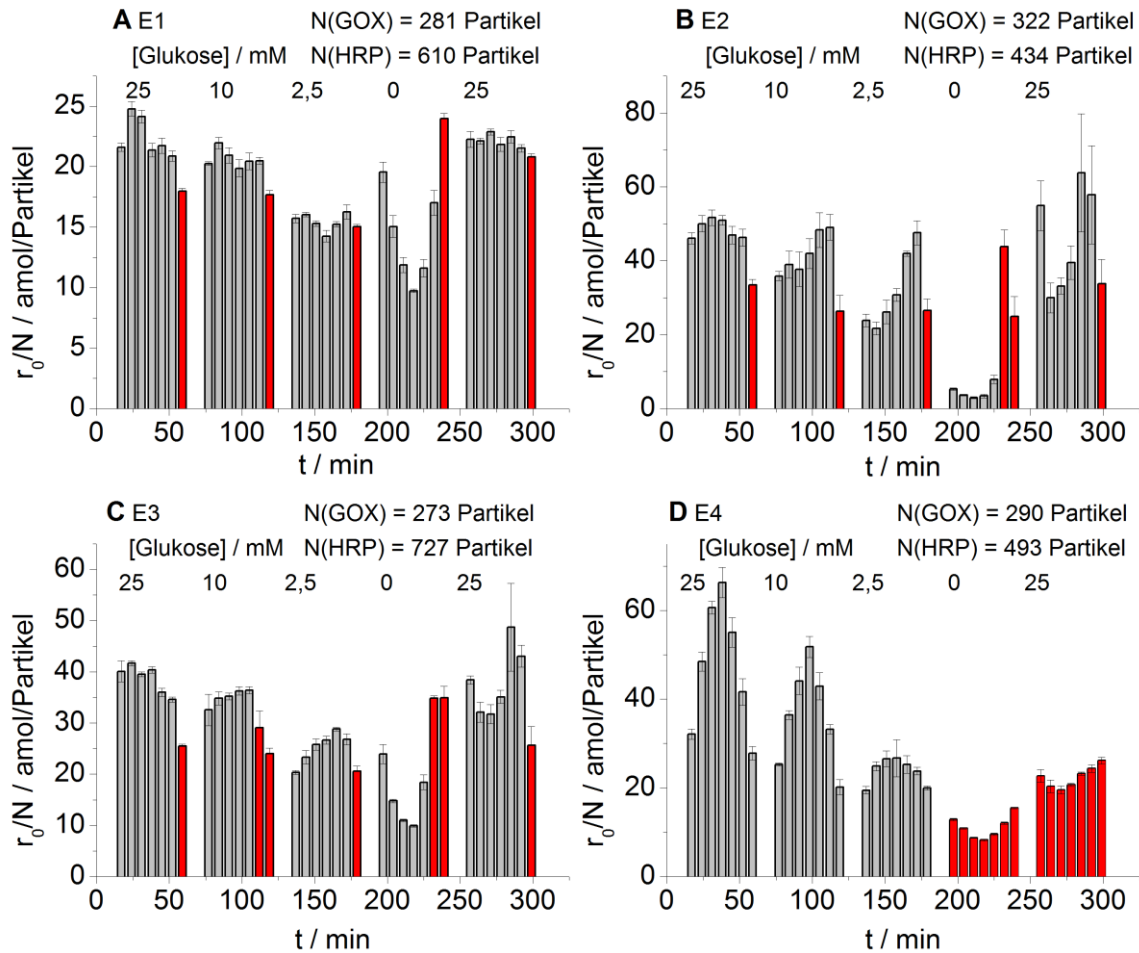


Abbildung 79: Auftragung der alterungskorrigierten normierten Reaktionsraten r_0/N der zweistufigen Mikrofluidik mit GOX und HRP auf Partikeln mit variabler Glukosekonzentration, 100 μM Amplex Red und variablen Flussraten Q . **A-D:** Experimente E1 – E4. Oben sind die GOX-Partikelzahl für jedes Experiment, sowie die Glukosekonzentration für jeden Zyklus angegeben. Die jeweils 7 Säulen entsprechen den Flussraten $Q = 0,5; 0,2; 0,1; 0,07; 0,1; 0,2$ und $0,5$ $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Roten Säulen wurden bei der weiteren Auswertung als Ausreißer nicht berücksichtigt (vgl. Abbildung 77)

Die Reaktionsraten streuen stark.

Unter der Annahme, dass die Enzyme in den Experimenten ähnlich alterten, wurden nun mit Hilfe der Halbwertszeit für jeden Zeitpunkt die ursprünglichen Reaktionsraten berechnet. Die so korrigierten Werte sind in Abbildung 79 gegen die Zeit aufgetragen.

Die Ergebnisse der vier Experimente unterschieden sich zum Teil deutlich in den Raten und den erkennbaren Trends. Bei den in **A** bis **C** dargestellten Reaktionsraten führte die Alterungskorrektur zu vergleichbaren Werten für 25 mM Glukose im 1. Zyklus (10 – 60 min) und 5. Zyklus (250 – 300 min). Die Systeme alterten also mit ähnlicher Halbwertszeit. E4 (**D**) hingegen zeigte beim 5. Zyklus niedrigere Werte und eine veränderte

Flussratenabhängigkeit (Stufenstruktur). Hier war im Experiment während des 3. Zyklus die Pumpe zum Absaugen ausgefallen, so dass bei den folgenden Konzentrationswechseln die hohen Flussraten komplett durch beide Fritten strömten, was die Enzyme stark belastete. Der 4. und 5. Zyklus konnten deshalb nicht ausgewertet werden.

Alle Experimente zeigten typisches Michaelis Menten Verhalten, also eine Abnahme der Reaktionsraten bei Verringerung der Glukosekonzentration. Die Abhängigkeit von der Flussrate war jedoch sehr unterschiedlich.

Jeder Zyklus war symmetrisch aufgebaut, die jeweils erste Flussrate (0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$) entsprach also der jeweils letzten Flussrate (0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$). Trotzdem wichen die Werte bei E1 – E3 stark voneinander ab. Wie in der Kontrolle des Flussratenprofils in Abbildung 77 erkennbar ist, war die Glukosekonzentration nicht über die gesamte Dauer der Zyklen konstant, so dass die Reaktionsraten bei den jeweils letzten, bei den Kontrollen sogar bei den letzten beiden Flussraten stark abwichen. Wie in Abschnitt 2.7.3.1 erläutert, wurde die Glukosekonzentration im Totvolumen mit zwei Spritzen verschiedener Konzentration eingestellt. Beim verwendeten Protokoll war dieser Bereich aber zu großzügig bemessen und überstieg das tatsächliche Totvolumen, so dass am Ende des Zyklus bereits ein anderes Mischungsverhältnis vorlag. Die zu den Werten gehörenden Säulen sind in Abbildung 79 rot gefärbt und wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Bei E4 trat dieser Effekt nicht auf, vermutlich war hier das Totvolumen zwischen Y-Stück und Reaktionsbereich größer, z. B. verursacht durch einen etwas höher gegossenen PDMS Mikroreaktor, so dass insgesamt mehr Volumen gleicher Konzentration für einen Zyklus zur Verfügung stand.

Auch ohne die Ausreißer zeigten die Daten eine sehr unregelmäßige Abhängigkeit von der Flussrate. Eindeutige Trends waren nur bei E4 (D) erkennbar, bei 2,5 bis 25 mM Glukose nahmen die Reaktionsraten zur Mitte des Zyklus hin (also bei niedrigeren Flussraten) zu. Die Trends dieser Daten entsprechen der für niedrige Partikelzahlen berechneten Flussratenabhängigkeit in Abbildung 71B. Unter diesen Bedingungen trat also keine Substraterschöpfung auf. Der Zyklus mit 25 mM Glukose ist von der Größenordnung (28 – 66 $\text{amol}/\text{s}/\text{Partikel}$) her mit den Ergebnissen bei konstanten 25 mM Glukose in Abbildung 73A bzw. Abbildung 74A vergleichbar.

Bei der Kontrolle (0 mM) war ein umgekehrtes Muster erkennbar. Es ist vergleichbar mit der Kontrolle in Abbildung 71B und ist typisch für Substraterschöpfung des unspezifisch gebildeten H_2O_2 , das unabhängig von der Flussrate in niedrigen Konzentrationen vorlag.

Bei E1 – E3 (A bis C) war bei den Kontrollen (0 mM) anhand des Musters ebenfalls Substraterschöpfung erkennbar. Das Muster war bei E1 und E3 besonders ausgeprägt, was vermutlich an der etwa 50 % größeren Zahl HRP-beschichteter Partikel lag. Diese Vermutung wird beim Vergleich mit Abbildung 71D (S.155) bestätigt. Die Berechnungen mit zehnfachem Überschuss von HRP führten dort zu einer ähnlichen Flussratenabhängigkeit der Kontrolle.

Bei den höheren Glukosekonzentrationen waren die Trends aber indifferent. E1 zeigte typische Muster der erhöhten HRP-Partikelzahl, die mit Abbildung 71D vergleichbar sind. Bei E2 (10 und 2,5 mM) nahmen die Reaktionsraten innerhalb des Zyklus unabhängig von der Flussrate eher zu, was auf die Maximumverschiebung der Umsätze $\Delta[\text{Res}]$ in Abbildung 78 zurückzuführen ist. E3 müsste auf Grund der hohen HRP-Partikelzahl ebenfalls ein Muster wie E1 zeigen, hier ist aber kein eindeutiger Trend erkennbar.

Bei den vier ausgewerteten Experimenten handelt es sich bereits um eine Auswahl aus insgesamt acht Experimenten, die teilweise eine katastrophale Datenqualität mit stark streuenden Werten aufwiesen. Daran wird deutlich, wie technisch anspruchsvoll und komplex das System mit zwei enzymbeladenen Schüttungen, zwei gepumpten Seitenkanälen und zwei Substratspritzen ist.

Die H_2O_2 -Konzentrationen steigen bei niedrigen Flussraten.

Wegen der Unregelmäßigkeiten und unklaren Trends der vier Experimente würde eine getrennte weitere Auswertung der Daten die Streuung noch verstärken. Da alle vier Experimente aber mit ähnlicher Anzahl GOX-beladener Partikel durchgeführt wurden, konnte hier bereits der Mittelwert gebildet werden. Die oben beschriebenen Ausreißer wurden dabei nicht berücksichtigt. Nach Subtraktion des ebenfalls gemittelten Hintergrunds (0 mM) konnte nun nach Gleichung (50) über die in der Mikrofluidik für HRP bestimmten kinetischen Konstanten (vgl. Abschnitt 0) die im Reaktor vorliegende H_2O_2 -Konzentration berechnet werden. Um die Flussratenabhängigkeit zu berücksichtigen, wurde für jede Flussrate Q das entsprechende Wertepaar K_M und r_{max}/N aus Tabelle 8 für die Berechnung

verwendet. Die so bestimmten H_2O_2 -Konzentrationen sind in Abbildung 80 gegen die Flussraten aufgetragen.

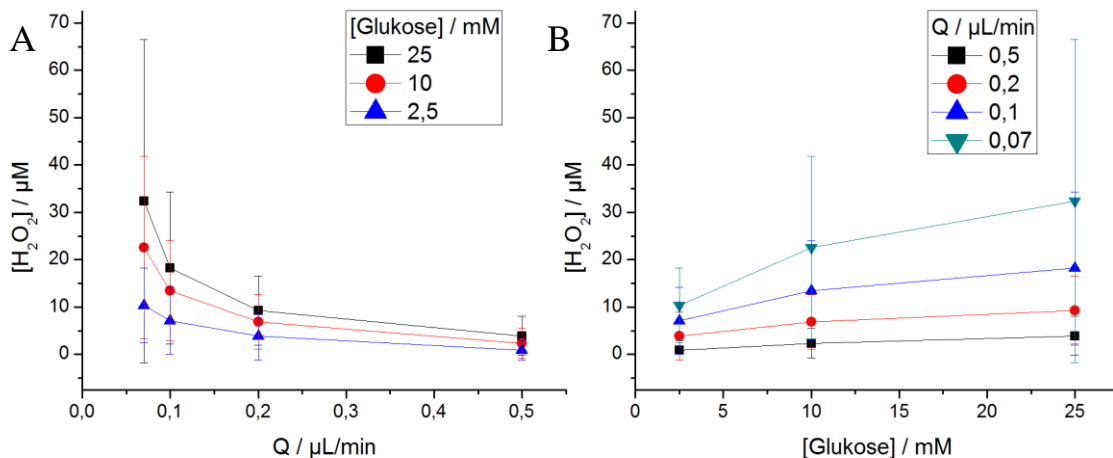


Abbildung 80: H_2O_2 -Konzentrationen, berechnet nach Gleichung (50) aus den Umsätzen r_0/N und den Michaelis Menten Parametern für jede Flussrate Q aus Tabelle 8. Die Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung berechnet. **A:** Auftragung gegen die Flussrate Q . **B:** Auftragung gegen die Glukosekonzentration.

Die H_2O_2 -Konzentrationen lagen zwischen 0,8 und $32 \mu\text{M}$ und waren damit kleiner als die zur Berechnung verwendeten K_M -Werte für HRP aus Tabelle 8 bei den entsprechenden Flussraten. Die Daten lagen damit im linearen Bereich der Michaelis Menten Kurve, und die Umrechnung nach Gleichung (50) war valide. Die großen Fehler, die teilweise über 100 % des Wertes betragen, entstanden durch die Mittelwertbildung der streuenden Daten aus Abbildung 79 sowie durch Fehlerfortpflanzung der Fehler der Michaelis Menten Parameter.

Die H_2O_2 -Konzentrationen entsprachen etwa den in Abschnitt 2.7.1 berechneten Werten für 300 GOX-beladene Partikel in Abbildung 71A, so dass die theoretischen Rechnungen gut mit dem Mittelwert der Experimente übereinstimmten. Aufgrund der großen Anzahl der HRP-beschichteten Partikel in E1 und E3 kam es in den beiden Fällen zu fast vollständigem Umsatz des H_2O_2 . Die gemittelten H_2O_2 -Konzentrationen lagen deshalb in der gleichen Größenordnung wie die daraus in 1:1 Stöchiometrie^[104] produzierten Resorufinkonzentrationen in Abbildung 78.

Da die Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration in dieser Arbeit über die Reaktionsraten des HRP erfolgte, sollte der Umsatz möglichst gering bleiben, damit keine Substraterschöpfung auftrat. Deshalb sollte, wie in Abschnitt 2.7.1 diskutiert, zur

Bestimmung der Kinetik des ersten Enzyms einer zweistufigen Reaktion in der Mikrofluidik das zweite Enzym nur in kleinen Mengen vorliegen, damit es nicht zu Substraterschöpfung kommt.

Bei der umgekehrten Strategie, die in der Mikrotiterplatte in Abschnitt 2.3.4 eingesetzt wurde, könnte die erste Reaktion durch geringere Partikelzahl und Einsatz von weniger Substrat limitiert werden. Das entstehende H_2O_2 könnte mit großen Mengen HRP-funktionalisierten Partikeln und ausreichend Amplex Red vollständig umgesetzt werden, und das entstehende Amplex Red entspräche dann 1:1 der umgesetzten Glukose. Eine vollständige Umsetzung ließ sich aber, auch wegen der wechselnden Flussraten, in der Mikrofluidik nur schlecht realisieren, deshalb sollte möglichst wenig HRP eingesetzt werden, um die o.g. Auswertung über die Kinetik zu ermöglichen.

Wenn jedoch quantitative Umsetzungen gewünscht sind, z. B. in der organischen Synthese, sollte das zweite Enzym in großen Mengen vorliegen, was sich durch Injektion einer größeren Zahl von Partikeln einfach realisieren lässt.

Die Reaktionsraten waren bei niedrigen Flussraten unerwartet hoch.

Aus den H_2O_2 -Konzentrationen konnte nun analog zu den bisherigen Auswertungen durch Multiplikation mit der Flussrate und Normierung auf die Partikelzahl nach Gleichung (25) die normierte Reaktionsrate r/N der GOX-Reaktion berechnet werden. Dabei ist zu beachten, dass während der Messzyklen kontinuierlich mit $-0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ durch den Seitenkanal S2 abgesaugt wurde, um Flackern und Verwirbelungen durch Druckschwankungen zu vermeiden. Über das Zwischenraumraumvolumen V_{Zw} und die mittlere Partikelzahl $N = 292 \pm 21$ Partikel konnte schließlich nach Gleichung (30) die Reaktionsgeschwindigkeit v für GOX bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 81 gegen die Flussrate und die Glukosekonzentration aufgetragen.

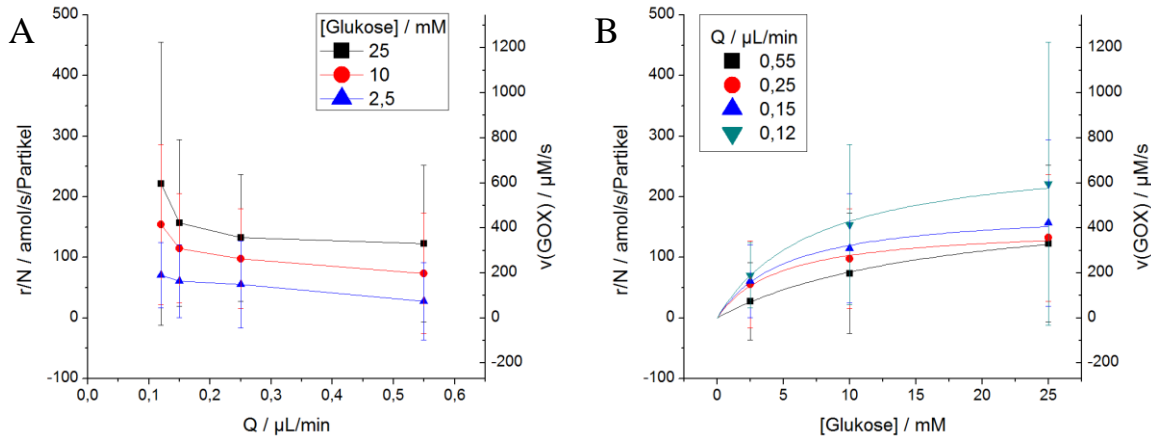


Abbildung 81: Auftragung der Reaktionsraten r/N und der Reaktionsgeschwindigkeiten v der GOX-beladenen Fritte **A**: Auftragung gegen die Flussrate Q . **B**: Auftragung gegen die Glukosekonzentration. Die Daten wurden mit Origin 8 nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) nichtlinear gefittet.

Die Reaktionsraten in Abbildung 81A stiegen bei niedrigeren Flussraten, wobei der Trend bei 25 und 10 mM Glukose stärker ausgeprägt war. Diese beiden Flussraten zeigten allerdings auch die größten Fehler. Die Werte für 25 mM Glukose (120 – 220 amol/s/Partikel) entsprachen in Größenordnung und Flussratenabhängigkeit den Ergebnissen der zweistufigen Mikrofluidik mit konstanten 25 mM Glukose in Abbildung 75B (120 – 440 amol/s/Partikel), wobei dort bei niedrigen Flussraten höhere Werte gemessen wurden. Der Vergleich mit den Ergebnissen der zweistufigen Mikrofluidik mit gelöster HRP in Abbildung 69C und D zeigt ebenfalls eine vergleichbare Größenordnung (z. B. 20 mM Glukose, 140 – 170 amol/s/Partikel, kleinere Werte bei niedrigeren Glukosekonzentrationen), jedoch mit anderen Trends: Bei 5 mM Glukose war dort eine Steigerung der Reaktionsrate mit steigender Flussrate erkennbar, was durch die Zufuhr frischen Substrats erklärt wurde. Bei den höheren Glukosekonzentrationen (10 – 100 mM) kam es nur noch bei der höchsten Flussrate $Q = 0,5 \mu\text{L/min}$ zu einer Erhöhung.

Da in beiden mikrofluidischen Systemen als erster Schritt die Reaktion von Glukose mit GOX-beladenen Partikeln stattfand, sollte die hier diskutierte Kinetik dieser ersten Reaktion der Kaskade auch identisch sein. Die Unterschiede entstanden erst durch die zweite Reaktion mit gelöster bzw. auf Partikeln immobilisierter HRP. Die damit verbundene mehrstufige Auswertung enthält also einen systematischen Fehler. Der hier beobachtete Anstieg der Reaktionsraten bei niedrigen Flussraten ist bei Betrachtung der GOX-Teilreaktion mechanistisch nicht erklärbar. Theoretisch wäre das umgekehrte Verhalten,

nämlich eine Erhöhung des Umsatzes zu erwarten, während die Reaktionsraten aber abnehmen sollten. Das spricht für einen systematischen Fehler im Fall des immobilisierten Reporterenzym.

Für die Bestimmung der zugrunde liegenden Parameter der Mikrofluidik mit HRP-beschichteten Partikeln (Abschnitt 0) entsprachen die Schüttungen etwa den hier eingesetzten Zahlen HRP-beladener Partikel. Die Substraterschöpfung sollte deshalb auch vergleichbar sein. Die Alterung wurde jedoch unterschiedlich quantifiziert. Beim Reporterenzym wurde die Alterung für jede Flussrate und H_2O_2 -Konzentration individuell bestimmt und korrigiert. Bei niedrigen Flussraten wurde dort aufgrund der Substraterschöpfung eine geringere apparente Alterung beobachtet. Im hier betrachteten System war dies nicht möglich, so dass die Daten ohne Berücksichtigung von Flussrate und Konzentration exponentiell angepasst werden mussten.

Der Unterschied wirkte sich besonders bei niedrigen Flussraten aus. Während bei den Parametern des Reporterenzym (Abschnitt 0) die ursprünglichen Reaktionsraten r_0/N nach der Alterungskorrektur eher zu niedrig ausfielen, waren die r_0/N -Werte im hier betrachteten System mit einem durchschnittlichen Alterungsausgleich tendenziell zu hoch. Bei der Datenprozessierung führte dies schließlich dazu, dass die aus den Resorufinumsätzen berechneten H_2O_2 -Konzentrationen zu hoch ausfielen. Diese Abweichung pflanzte sich fort und führte in Abbildung 81A ebenfalls zu erhöhten Reaktionsraten der GOX-beladenen Partikel bei niedrigen Flussraten.

Eine weitere Fehlerquelle war die bereits zu Abbildung 80 diskutierte Substraterschöpfung innerhalb der immobilisierten Reaktionskaskade. Hier wurde ein Großteil des auf der GOX-beladenen Fritte gebildeten H_2O_2 vom immobilisierten Reporterenzym zu Resorufin umgesetzt.

Für weitere Experimente mit dem Ziel der Bestimmung der Kinetik müsste also die Datenqualität der Enzymkaskade verbessert werden, um die Alterung individuell für jede Flussrate zu bestimmen. Gleichzeitig sollten die eingesetzten Partikelzahlen bzw. deren Verhältnis, sowie die Flussraten optimiert werden, so dass die Substratlösung beim Passieren der beladenen Fritten nur zu maximal 30 % verbraucht wird, damit eben keine Substraterschöpfung auftritt.

Die Ergebnisse der Auswertung nach Michaelis Menten liegen in der gleichen Größenordnung, wie die Ergebnisse mit gelöstem Reporterenzym in der Mikrotiterplatte und in der Mikrofluidik.

In Abbildung 81B sind Reaktionsraten bzw. Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Glukosekonzentration aufgetragen. Sie zeigen das typische Michaelis Menten Verhalten und wurden nichtlinear nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) gefittet. Bei $Q = 0,55 \mu\text{L}/\text{min}$ fällt eine veränderte Kurvenform auf, die vermutlich ein Artefakt der streuenden Ausgangsdaten ist. Die Parameter sind in Tabelle 10 aufgelistet und zusätzlich in Abbildung 82 gegen die Flussrate aufgetragen, um die Trends herauszustellen.

Tabelle 10: Parameter der nichtlinearen Anpassung der Daten aus Abbildung 81B nach Michaelis Menten (Gleichung (3)) der Mikrofluidik mit GOX- und HRP-beschichteten Partikeln. Zum Vergleich sind die Ergebnisse aus der Mikrotiterplatte für partikelgebundene und freie bGOX aus Tabelle 6 angegeben. Der Literaturwert wurde mit 1 nM GOX und 20 nM HRP mit ABTS in der Küvette bestimmt.^[23]

$Q / \mu\text{L min}^{-1}$	$r_{max}/N [\text{amol s}^{-1} \text{Partikel}^{-1}]$	$v_{max} / \mu\text{M s}^{-1}$	K_M / mM	k_{cat} / s^{-1}
0,55	203 ± 17	547 ± 45	$16,8 \pm 2,5$	92 ± 69
0,25	152 ± 15	408 ± 39	$4,7 \pm 1,3$	69 ± 51
0,15	182 ± 15	490 ± 40	$5,2 \pm 1,0$	83 ± 62
0,12	278 ± 19	748 ± 52	$7,4 \pm 0,9$	126 ± 94
Mittelwert	204 ± 54	548 ± 145	$8,5 \pm 5,6$	92 ± 69
in der Mikrotiterplatte nach Tabelle 6:				
- in Lösung		nicht	$15,0 \pm 0,2$	353 ± 3
- auf Partikeln	251 ± 21	vergleichbar	13 ± 1	112 ± 84
Literaturwert in Lösung:			$15^{[23]}$	$250^{[23]}$

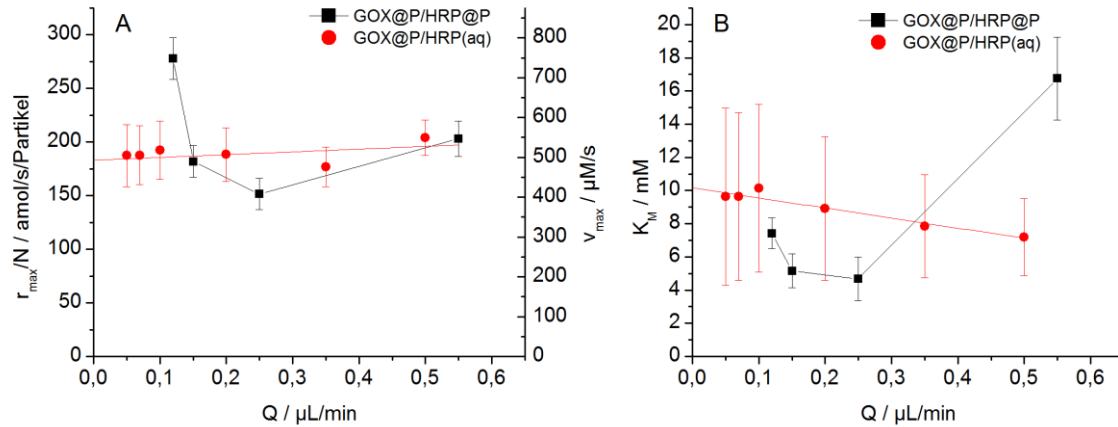


Abbildung 82: Auftragung der Michaelis Menten Parameter r_{\max}/N , v_{\max} (A) und K_M (B) gegen die Flussrate. Wegen der nicht einheitlichen Trends wurde hier kein linearer Fit durchgeführt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse aus Abschnitt 2.6.2 für GOX-beladene Partikel mit nHRP in Lösung und die zugehörigen linearen Fits ergänzt.

Die Werte für r_{\max}/N lagen zwischen 150 und 280 $\text{amol}/\text{s}/\text{Partikel}$ und lagen damit – anders als bei der Fluidik mit HRP-beladenen Partikeln in Abschnitt 0 – in der Größenordnung des in der Mikrotiterplatte bestimmten Wertes für GOX-beladene Partikel (251 $\text{amol}/\text{s}/\text{Partikel}$). Die Fehler der gefitteten Parameter betrugen unter 10 %, da die zugrunde liegenden Datenpunkte in Abbildung 81B trotz großer Fehler (75 – 230 %) exakt auf der gefitteten Hyperbel lagen. Bei nur drei zugrunde liegenden Datenpunkten kann dies aber auch Zufall sein, da die Krümmung nur unzureichend bestimmt ist. Die Einstellung von fünf oder sechs verschiedenen Glukosekonzentrationen brächte eine höhere Genauigkeit bei der Auswertung, war jedoch aufgrund der schnellen Alterung des Systems nicht möglich. Vermutlich ist deshalb auch die Abhängigkeit von der Flussrate nicht eindeutig. Bei Zunahme der Flussrate von $Q = 0,12 \mu\text{L}/\text{min}$ nach $0,25 \mu\text{L}/\text{min}$ nahm die maximale Reaktionsrate ab, was wie oben diskutiert mechanistisch unwahrscheinlich ist und vermutlich ein Artefakt der Auswertung war. Eine weitere Erhöhung der Flussrate führte wiederum zu einer Steigerung durch mehr frisch zugeführtes Substrat.

Für die K_M -Werte in Tabelle 10 bzw. Abbildung 82B wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Die Größenordnung stimmte mit dem in der Mikrotiterplatte bestimmten Wert für freie und immobilisierte bGOX, sowie dem Literaturwert überein. Der Mittelwert war aber ca. 35 % niedriger, was auf einen verbesserten Massentransfer zwischen Lösung und Partikeloberfläche in der Mikrofluidik hindeutet.^[138] Die Abhängigkeit von der Flussrate folgte aber wie r_{\max}/N keinem eindeutigen Trend, was in der geringen Anzahl der

Datenpunkte und der generell niedrigen Datenqualität der zweistufigen Reaktion begründet liegt.

Die Ergebnisse von r_{max}/N und K_M stimmten auch gut mit den zum Vergleich in Abbildung 82A und B zusätzlich aufgetragenen Werten der Mikrofluidik mit dem in Lösung vorliegendem Reporterenzym HRP überein. Allerdings unterschied sich auch hier die Abhängigkeit von der Flussrate, was durch die niedrige Datenqualität der Rohdaten, die nicht optimalen Flussratenprofile und die bereits diskutierten möglichen Ungenauigkeiten der kinetischen Parameter des Reporterenzym erklärbar ist. Trotzdem war die Bestimmung der Kinetik der zweistufigen Enzymreaktion nach Michaelis Menten möglich. Die Abhängigkeit von der Flussrate müsste allerdings in weiteren Experimenten mit einem weiter optimierten Flussratenprofil genauer bestimmt werden.

Die Ergebnisse entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Trends.

In der Literatur gibt es keine Beispiele, in denen zweistufigen Enzymkaskaden zur Bestimmung der Kinetik von immobilisierter GOX in der Mikrofluidik verwendet wurden. Alle Autoren nutzten ausschließlich amperometrische Methoden zur Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration. Ausgewählte Publikationen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenstellung der Ergebnisse von GOX-Mikroreaktoren, die in der Literatur beschrieben sind. In allen fünf Beispielen wurde H_2O_2 amperometrisch bestimmt.

Autor	Mikroreaktor	K_M / mM	K_M / mM	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat} / s^{-1}
		(imm)	(aq)	(imm)	(aq)
Liu et al. ^[145]	GOX adsorbiert an Wänden (PET), elektroosmotischer Fluss	2,64	6,0		
Su-Juan Li et al. ^[146]	GOX an Membran aus porösem ano- dischen Aluminium, Spritzenpumpen	28 – 1,7	11,7		
He et al. ^[147]	GOX elektrostatisch immobilisiert an polymeren Monolithen,	7,2	25	13,4	14,0
Guiseppe-Elie et al. ^[148]	GOX in Hydrogelkügelchen eingeschlossen, peristaltische Pumpe	2,95 – 11,3	10	steigend	
Wang et al. ^[149]	GOX _(aq) an Nanospalt aufkon- zentriert, elektrokinetischer Fluss	1,4	„similar“		

Liu et al. untersuchten an den Wänden eines PET-Mikroreaktors (Polyethylenterephthalat) adsorbierte GOX. Unter elektroosmotischem Fluss wurde Glukoselösung verschiedener Konzentrationen durch den Reaktor geleitet. Amperometrische Messungen des gebildeten H_2O_2 konnten nach einer integrierten „offline“ Form der Michaelis Menten Gleichung ausgewertet werden und resultierten in einem durchschnittlichen K_M -Wert von 2,64 mM.^[145] Im Vergleich zum dort zitierten Literaturwert von 6 mM in Lösung wurde argumentiert, dass die K_M -Werte heterogener Systeme generell niedriger seien, als in homogener Lösung. Für Glukosekonzentrationen > 25 mM liefert ihr Modell steigende Werte, die mit Sauerstofferschöpfung begründet werden.^[145] Werte für v_{max} und k_{cat} wurden dort aber nicht berechnet und diskutiert.

Su-Juan Li et al. immobilisierten GOX in einer Membran aus porösem anodischen Aluminium. In diesem nanofluidischen Reaktor konnten durch amperometrische Messung des H_2O_2 die kinetischen Daten nach Lineweaver-Burke bestimmt werden. Bei niedrigen Flussraten wurden apparente K_M -Werte von 28 mM erhalten, die sich bei höheren Flussraten einem Wert von 1,7 mM asymptotisch annäherten. Die Abnahme wurde durch den verbesserten Massentransfer begründet, so dass die Reaktion bei hohen Flussraten nur noch von der Reaktionskinetik bestimmt wurde. Der in gerührter Lösung ermittelte Wert betrug 11,7 mM und war demnach auch durch Massentransfer limitiert.^[146] Auch in dieser Veröffentlichung wurden Werte für v_{max} und k_{cat} nicht angegeben.

He et al. immobilisierten GOX in den Poren von polymeren Monolithen und untersuchten die H_2O_2 -Produktion amperometrisch. Im Vergleich mit dem freien Enzym fanden sie unveränderte k_{cat} -Werte ($k_{cat} \approx 14 \text{ s}^{-1}$) aber eine Abnahme des K_M -Wertes um den Faktor 4 auf $K_M^{app} = 7,2 \text{ mM}$ im Mikroreaktor.

Guisseppi-Elie et al. untersuchten in Hydrogelkügelchen eingeschlossene GOX in einem Festbettreaktor. Die H_2O_2 -Konzentration wurde ebenfalls amperometrisch bestimmt.^[148, 150] Die Auswertung nach dem Modell von Lilly-Hornby^[138] ergab $K_M = 2,95 \text{ mM}$ bei niedrigster Flussrate. Bei höheren Flussraten stieg der Wert bis auf $K_M = 11,30 \text{ mM}$ ^[148] und übertraf damit den zitierten Literaturwert für gelöste GOX ($K_M = 10 \text{ mM}$).^[151] Die Geschwindigkeiten wurden über die „Reaktorkapazität“ C angegeben, die vergleichbar mit der in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsrate r ist und sich auf den gesamten Reaktor bezieht. Die ermittelten

Werte nahmen ebenfalls mit der Flussrate zu. Beide Effekte wurden durch Abnahme der Diffusionsschicht und damit verbesserte Substratdiffusion zum aktiven Zentrum erklärt.^[148]

Einen anderen Weg zum Eintrag von GOX in die Mikrofluidik wählten Wang et al., indem sie gelöste GOX über den „exclusion enrichment effect“ (EEE) an einem Nanospalt aufkonzentrierten.^[149] Die Substratlösung wurde elektrokinetisch zugeführt und die H_2O_2 -Produktion hinter dem Spalt amperometrisch verfolgt. Es wurden K_M Werte von etwa 1,4 mM erhalten, was dem Wert in Lösung entsprach. Bei Anreicherung der Enzymmengen stieg der Wert aber an. Die Autoren argumentierten, dass die angereicherten Enzyme den Widerstand erhöhen und damit den Fluss hemmen, was schließlich zu verringertem Transport und verringerter Zugänglichkeit der Substrate führt und damit K_M erhöht.^[149] Dass bei einer bis zu 1 mM Enzymlösung nicht genügend gelöster Sauerstoff für die Reaktion zur Verfügung steht, und dass die Zugänglichkeit durch die lokale Enzymdichte erschwert wird, wurde aber nicht diskutiert. Auch eine Betrachtung der v_{max} Werte fand nicht statt.

Die Beispiele bestätigen, dass die K_M -Werte von immobilisierter GOX in der Mikrofluidik generell niedriger sind, als in Lösung. Die Flussratenabhängigkeit wurde nur bei Li^[146] und Guisepp-Elie^[148] untersucht und führte zu gegensätzlichem Verhalten. Während der K_M Wert bei membrangebundener GOX mit der Flussrate abnahm, wurde bei den Hydrogelkügelchen eine Zunahme beobachtet. Unterschiedliches Verhalten der K_M -Werte wurde auch für anderen Reaktoren mit immobilisierten Enzymen beschrieben und von Kerby diskutiert.^[139]

Die k_{cat} -Werte wurden nur von He et al. bestimmt und zeigten keinen Unterschied bei der Immobilisierung.^[147] In dieser Arbeit nahm k_{cat} wegen bereits diskutierter Gründe bei Immobilisierung um den Faktor 3 und in der Mikrofluidik um weitere 20 % ab. Die Systeme sind scheinbar nicht vergleichbar. Besser vergleichbar sind die GOX-beladenen Hydrogelkügelchen, die eine fünffache Steigerung der Reaktorkapazität C bei Erhöhung der Flussrate um den Faktor 4 aufwiesen.^[148] In dieser Dissertation nahm r/N mit nHRP in Lösung bei zehnfacher Erhöhung der Flussrate nur um etwa 20 % zu. Mit dem immobilisierten Reporterenzym ist kein eindeutiger Trend erkennbar. Es ist anzunehmen, dass die Flussrateabhängigkeit bei der direkten H_2O_2 -Bestimmung durch Amperometrie genauer messbar ist, als durch die nachgeschaltete Enzymreaktion mit immobilisierter HRP,

die wiederum durch Substraterschöpfung, Schwankungen der Flussrate sowie die Genauigkeit der Parameter beeinflusst wird.

Bezüglich mehrstufiger Mikroreaktoren gibt es viele Beispiele in der Literatur, vor allem mit dem GOX/HRP-Modellsystem. Häufig wurden die Daten aber nur qualitativ als Konzeptstudie für neue Reaktoren oder neue Immobilisierungsmethoden ausgewertet. In den einfachsten Fällen wurde gezeigt, dass beide Enzyme binden, funktional sind, und dass eine mehrstufige Reaktion möglich ist. Einige Autoren berechneten auch die Gesamtausbeute bezogen auf die Edukte der ersten Reaktion. In ausführlicheren Studien wurde zusätzlich die Alterungsstabilität oder die Abhängigkeit von der Flussrate berechnet. Matosevic fasst die aktuellen Beispiele übersichtlich zusammen.^[68, 152]

Aber nur von wenigen Gruppen wurden die Michaelis-Menten-Parameter der Enzyme einer Reaktionskaskade in der Mikrofluidik bestimmt. Halim et al. untersuchten in getrennten Festbettreaktoren eine zweistufige Transketolase/Transaminase-katalysierte Reaktion.^[77] Die Reaktionsprodukte der beiden Teilreaktionen wurden über HPLC bestimmt, um daraus nach Lilly Hornby^[138] die Michaelis Menten Parameter zu bestimmen. Für die Reaktionskaskade wurden beide Reaktoren hintereinander geschaltet und der Teil- bzw. Gesamtumsatz bestimmt. Da das Zwischenprodukt und die Produkte über HPLC bestimmt werden konnten, musste nicht wie in dieser Arbeit über die Kinetik des zweiten Enzyms die Konzentration des „unsichtbaren“ Intermediat und daraus die Kinetik des ersten Enzyms berechnet werden.^[77]

Lee et al. immobilisierten Sojabohnenperoxidase in einem mikrofluidischen Kanal und untersuchten deren Kinetik mit H_2O_2 und *p*-Cresol. Die Ergebnisse wurden nach einer integrierten Michaelis Menten Gleichung ausgewertet und stimmten gut mit den Experimenten in Lösung überein. In weiteren Experimenten wurde Lipase B koimmobilisiert und produzierte in einer vorgelagerten Reaktion das *p*-Cresol.^[65] Dieses System ist konzeptionell vergleichbar mit der in dieser Arbeit untersuchten GOX/HRP-Kaskade, da nur die Kinetik des zweiten (Reporter-) Enzyms bestimmbar war. Die Autoren berechneten den Umsatz der zweistufigen Reaktion bei verschiedenen Flussraten und gaben für die Lipase Werte für v_{max} und K_M an, die aus dem Gesamtumsatz unter Annahme vollständigen Umsatzes abgeleitet wurden. Eine genauere Betrachtung des Umsatzes und der Konzentration des Intermediats *p*-Cresol, die für die Berechnung der Kinetik notwendig wäre, fehlte aber.

Die diskutierten Beispiele verdeutlichen, dass es in der Literatur nur einzelne Fälle gibt, in denen zweistufige Reaktionen nach Michaelis Menten ausgewertet wurden. Entweder wurden die Parameter für jede Stufe einzeln bestimmt, oder die Berechnungen gingen näherungsweise von vollständigem Umsatz aus. Die quantitative Bestimmung über die Kinetik des Reporterenzym wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Schlussfazit und weitere Optimierungsvorschläge.

Abschließend betrachtet bietet der beschriebene Festbettreaktor eine einfache Plattform zur Untersuchung von mehrstufigen Enzymkaskaden. Hier wurden erstmalig ausführliche Kinetikmessungen nach Michaelis Menten in einem solchen Reaktor durchgeführt, bei denen das Intermediat H_2O_2 spektroskopisch nicht sichtbar war. Die Ergebnisse entsprachen in der Größenordnung den Ergebnissen, die in der Mikrotiterplatte erzielt wurden. Neben dem GOX/HRP-Modellsystem könnten nun neuartige Enzyme oder ganze Stoffwechselwege schonend in den Reaktor integriert werden.^[71] Die Immobilisierung auf Partikel führte zu optimalen Kontakt mit der Substratlösung, was eine effiziente Umsetzung ohne Diffusionslimitierung ermöglichte. Unterschiedliche Aktivitäten von Enzymen einer Enzymkaskade könnten durch Anpassung der Enzymmenge ausgeglichen werden,^[65, 68] was hier einfach durch die Wahl der Partikelzahl erreicht werden könnte.

Reaktive Enzyme sollten nur in geringen Mengen im Reaktor eingesetzt werden, da sonst wegen der Substraterschöpfung zu niedrige Durchschnittsgeschwindigkeiten gemessen werden, die bei der Auswertung nach Michaelis Menten zu Abweichungen bei langsamen Flussraten und niedrigen Substratkonzentrationen führten. Mit der rekursiven Folgeentwicklung wurde ein erster Schritt zur Beschreibung des Effekts und zur Vorhersage der Parameter realisiert. Durch Umkehrung des Modells könnte die Substraterschöpfung auch bei der Auswertung berücksichtigt werden. Alternativ könnten die Daten auch durch eine integrierte Geschwindigkeitsgleichung analog zu Lilly Hornby^[138] ausgewertet werden. Das Modell müsste bei der Lösung der nichtlinearen Differenzialgleichungen um die variable Partikelzahl und die Konzentration des zweiten Substrats erweitert werden. Darüber hinaus könnten CFD (Computational Fluid Dynamics) Simulationen orts aufgelöst Aufschluss über das Strömungsverhalten und den Substratumsatz innerhalb der Schüttungen geben.

Der Reaktor könnte weiter verbessert werden, in dem eine Y-Verbindung mit anschließendem Mischbereich integriert würde. Als Techniken wurden beispielsweise ausgedehnte Partikelschüttungen^[69], die 3D-Fokussierung^[153, 154] und ein System mit einer eingeschlossenen Luftblase, die durch einen Piezokristall zum Schwingen angeregt wird und einen starken Wirbel erzeugt^[155], entwickelt. Diese Techniken ermöglichen die vollständige Vermischung im Mikro- bis Millisekundenbereich. Die Substratkonzentration könnte so direkt im Reaktor eingestellt werden und die Zeiten zum Mischen und Austauschen der Lösung würden minimiert.

Darüber hinaus könnten die Seitenkanäle über Mikroventile verschlossen werden, so dass kein Austausch mit der dort ruhenden Lösung stattfindet. Das Problem der Signalschwankungen bei Flussratenwechsel würde wegfallen und die Stufen konstanter Flussrate könnten verkürzt werden.

Beide Konzepte würden die benötigte Zeit zum Einstellen von Konzentration und Flussrate extrem verkürzen. Anstelle der in dieser Arbeit benötigten 4 – 6 h für einen kompletten Durchlauf aller Bedingungen würde das Experiment nur etwa 30 – 60 min dauern und wäre weniger von Alterungseffekten betroffen. Dadurch könnten trotz der geringen Halbwertszeiten von HRP reproduzierbare Werte gemessen werden und es wäre kein Alterungsausgleich nötig. Mit diesem optimierten Reaktor ließen sich außerdem auch instabile Enzyme untersuchen.

Insbesondere für die Charakterisierung mehrstufiger Enzymkaskaden, wäre eine differenzierte Analytik der Intermediate hilfreich. Im einfachsten Fall der hier beschriebenen Modellkaskade gelänge dies durch Integration einer Mikroelektrode zur Bestimmung des von GOX gebildeten H_2O_2 .^[145] In komplexeren Systemen könnte der Mikroreaktor auch mit NMR,^[53] HPLC und ICP-MS^[156] oder ESI^[157] gekoppelt werden, um so die Umsätze jeder Stufe zu quantifizieren.

3 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien zum Aufbau von kompartimentierten GOX/HRP-Reaktionskaskaden untersucht. Die erste Strategie bestand in der Assemblierung der Enzyme im Nanometermaßstab durch Methoden der DNA Nanotechnologie. Hierdurch sollten künstliche Multienzymkomplexe aufgebaut werden, die auf eine mögliche Beschleunigung der Gesamtreaktion durch räumliche Nähe, dem sogenannten „Channeling“, untersucht wurden. Bei der zweiten Strategie wurden die Enzyme in einen Festbettreaktor im Mikrometermaßstab angeordnet, um in der Mikrofluidik die Kinetik der gekoppelten Reaktionen nach Michalis Menten zu bestimmen.

Für den Aufbau der Multienzymkomplexe wurden zunächst neuartige DNA-Enzymkonjugate synthetisiert und charakterisiert (Abschnitt 2.1). Die Anordnung der Konjugate auf einem DNA-Trägerstrang führte nicht zu einer Beschleunigung der zweistufigen Reaktion (Abschnitt 2.2.1). Die Analyse mittels Gelelektrophorese zeigte, dass die erwarteten bienzymatischen Komplexe zwar gebildet wurden, aber gleichzeitig ungebundene Enzyme vorlagen. Die frei diffundierenden Enzyme reagierten aufgrund der höheren Freiheitsgrade schneller und überdeckten den postulierten Effekt des Channelings.

Durch direkte Kopplung von komplementären DNA-Konjugaten konnten höhere Ausbeuten der bienzymatischen Komplexe erreicht werden (Abschnitt 2.2.2). Als Kontrolle dienten freie Enzyme, die durch Strangverdrängung gebildet wurden. Auch hier war jedoch kein signifikanter Vorteil der in räumlicher Nähe angeordneten Enzyme nachweisbar.

Auch die publizierten Ergebnisse der Anordnung von GOX/HRP auf linearen DNA-Hexagon-Strukturen nach Willner^[35] ließen sich nicht reproduzieren (Abschnitt 2.2.3). Die Proben mit der DNA-Struktur zeigten zwar vergleichbare Aktivitäten wie in der Publikation, aber die entscheidende Negativkontrolle zeigte ebenfalls die gleiche Aktivität. Damit konnte keine Beschleunigung durch räumliche Anordnung auf der DNA-Struktur nachgewiesen werden.

Um die Assemblierung der bienzymatischen Komplexe möglichst vollständig zu gestalten, wurden die GOX- und HRP-Konjugate auf Oberflächen-gebundenen Trägersträngen organisiert (Abschnitt 2.2.4). Auf diese Art war ein einfaches Entfernen der störenden ungebundener Enzyme durch Waschen möglich. Tatsächlich zeigten die

enzymkinetischen Studien, dass die heterodimeren Komplexe höhere Aktivitäten aufwiesen, als die homodimeren Kontrollen. Experimente mit reduzierter Anzahl von Fängersträngen auf der Oberfläche und in Anwesenheit von Katalase, die frei in der Lösung diffundierendes H_2O_2 zersetzt, bestätigten die These, dass die gekoppelte GOX/HRP-Kaskade in diesem System vermutlich über den Mechanismus des „leaky Channeling“ abläuft.

Theoretische Betrachtungen (Abschnitt 2.2.5) der Interenzymabstände der verschiedenen DNA-basierten Multienzymkomplexe führten zu dem Ergebnis, dass bei den gelöst vorliegenden Systemen das Intermediat H_2O_2 bereits nach etwa 1 s als homogen in der Lösung verteilt betrachtet werden kann und deshalb kein Channelingeffekt messbar war. Einzig beim immobilisierten System war eine dauerhafte Beschleunigung möglich, da die Diffusion des Intermediats durch die Fest/Flüssig-Grenzfläche limitiert war und somit ein „leaky Channeling“ Mechanismus ablaufen kann.

Durch die DNA-Nanotechnologie ergeben sich vielseitige Möglichkeiten, neuartige Multienzymkomplexe aufzubauen. Jedoch müssten für die weitere Entwicklung dieses Ansatzes höhere Ausbeuten der an DNA Gerüsten organisierten Strukturen erreicht werden. Diesbezügliche Arbeiten sind Gegenstand der aktuellen Forschung.^[26] Für einen dauerhaften Effekt des Channelings dürfte es jedoch nicht reichen, Enzyme paarweise in räumlicher Nähe anzuordnen, da mittlerweile als sicher angesehen werden kann, dass die reine Nähe zweier Enzyme nicht für ein Channeling ausreicht. Aus heutiger Sicht sollten die Enzyme entweder als Cluster vorliegen, oder es müssen diffusionslimitierende Grenzflächen vorhanden sein, um den Verlust von Intermediaten in die Bulk Lösung zu minimieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die GOX/HRP-Enzymkaskade in einen neu entwickelten Festbett-Mikroreaktor integriert (Abschnitt 2.4). Hier waren die Enzyme nicht mehr auf molekularer Ebene angeordnet, sondern wurden in zwei getrennten Kompartimenten auf der Mikrometerskala lokalisiert, und das Intermediat wurde fluidisch transportiert. Das Ziel bestand darin, zu untersuchen, ob mit einem solchen Reaktorsystem die kinetischen Eigenschaften detailliert und quantitativ erfassbar sind.

Zunächst wurde der einfachste Fall untersucht, in dem lediglich Mikropartikel, die mit HRP beladen waren, in den Reaktor eingebracht wurden. Die Fluoreszenzentwicklung an der Fritte wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops quantifiziert (Abschnitt 2.5). Wegen der teilweise hohen H_2O_2 -Konzentrationen alterten die Enzyme schnell ($t_{1/2} \approx 1 - 3$ h), so dass

keine Langzeitexperimente durchgeführt werden konnten. In Einzelexperimenten konnte durch Variation der Substratkonzentration und der Flussrate die Kinetik nach Michaelis Menten flussratenabhängig bestimmt werden. Im Vergleich zum statischen System in der Mikrotiterplatte waren die k_{cat} -Werte im fluidischen System um den Faktor 4 - 7 erniedrigt, während K_M um den Faktor 2 zunahm. Die Unterschiede wurden auf die Substraterschöpfung zurückgeführt, die besonders bei langsamen Flussraten und niedrigen H_2O_2 Konzentrationen auftrat. Als weitere Gründe wurden die hohe lokale Enzymdichte und die Deaktivierung der Enzyme durch H_2O_2 identifiziert. Die Flussratenabhängigkeit der Parameter entsprach jedoch den Erwartungen und korreliert auch mit anderen literaturbeschriebenen Untersuchungen.

Zur Untersuchung der Kinetik von immobilisierter GOX im Reaktor konnte das Reporterenzym HRP der Substratlösung beigemischt werden (Abschnitt 2.6), oder immobilisiert auf Partikeln an der flussabwärtsliegenden Fritte positioniert werden (Abschnitt 2.7). Da das H_2O_2 erst *in situ* bei Kontakt mit GOX entstand, verlängerte sich die Lebensdauer der Enzyme. Dadurch waren Langzeitexperimente ($t > 12$ h) unter Variation von Substratkonzentration und Flussrate möglich. Technische Probleme aufgrund von fehlenden Mischstrukturen vor und im Reaktor, und die daraus resultierenden großen Totvolumina und Druckschwankungen, konnten durch speziell angepasste Flussratenprofile gelöst werden.

Die Experimente mit dem Reporterenzym HRP in der mobilen Phase konnten zweistufig nach Michaelis Menten ausgewertet werden (Abschnitt 2.6.2). Die Ergebnisse lagen nur etwa 25 % unter den im statischen System der Mikrotiterplatte bestimmten Werten. Dies wurde auf die höhere Stabilität der Enzyme aufgrund des *in situ* erzeugten H_2O_2 zurückgeführt.

Die Experimente mit dem flussabwärts immobilisierten Reporterenzym HRP waren technisch herausfordernd und führten zu stark streuenden Signalen (Abschnitt 2.7). Bei der zweistufigen Auswertung nach Michaelis Menten halfen theoretische Berechnungen zur Vorhersage der erwarteten Reaktionsraten und Intermediatkonzentrationen (Abschnitt 2.7.1). Die Resultate entsprachen den Ergebnissen, die mit dem gelösten Reporterenzym erhalten wurden, wobei die Werte bei niedrigen Flussraten durch Substraterschöpfung und Alterung nur sehr ungenau bestimmt werden konnten (Abschnitt 2.7.3).

Trotz der genannten Schwierigkeiten könnte der Reaktor zukünftig einsetzbar sein, um statt des GOX/HRP-Modellsystems, auch andere, neuartige Enzyme oder ganze Stoffwechselwege qualitativ zu untersuchen. Um quantitative Kinetikmessungen zu ermöglichen, müsste der Reaktor weiter entwickelt werden. Beispielsweise könnte durch die leicht zu realisierende Erweiterung des Reaktors mit Y-Mischern eine deutlich einfachere Prozessführung erreicht werden. Darüber hinaus wäre die Kopplung mit weiteren Analysemethoden wünschenswert, um auch fluoreszenzspektroskopisch „unsichtbare“ Intermediate und Produkte quantifizieren zu können. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es auch möglich ist, Kinetik und Umsatz eines nicht detektierbaren Intermediats durch ein flussabwärts immobilisiertes Reporterenzym zu analysieren. Hierfür erwiesen sich mathematische Berechnungen und Modellierungen als außerordentlich wichtiges Hilfsmittel.

Somit kann insgesamt geschlussfolgert werden, dass die weitere Entwicklung und Anwendung von komplexen Kompartimentierungssystemen insbesondere von Simulationen und computergestützte Prozessmodellierung auf Basis von „Big Data“ aus multiskalaren experimentellen Analysen profitieren wird. In Kombination mit dem technologischen Fortschritt im Bereich der Mikrofluidik, Robotik und additiven Fertigungstechniken kann so eine neue Generation biotechnologischer Prozesse erschaffen werden.^[26]

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Die Standardchemikalien und –reagenzien wurden von Sigma-Aldrich, Roth und Acros bezogen. Daneben wurden ABTS, Amplex Red, H₂O₂ (30 %) und DTT von Fluka erworben, β -D-Glukose und NHS-PEG4-Biotin von Sigma-Aldrich, sSMCC und sEMCS von Pierce, Resorufin Natriumsalz von Invitrogen, Heringssperma-(HS)-DNA von Roche und SybrGold von Molecular Probes.

Amplex Red wurde als 10 mM Stocklösung in DMSO bei -20 °C gelagert und für die Experimente frisch aufgetaut. Da es lichtempfindlich ist, wurde es in roten Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert und während der Experimente am Arbeitsplatz in einer geschlossenen Kühlbox aufbewahrt. H₂O₂ wurde als 30 % Lösung bei 4 °C gelagert und ebenfalls während der Experimente in einer Kühlbox am Arbeitsplatz aufbewahrt. β -D-Glukose wurde als 1 M Stammlösung in KPi300 angesetzt und über Nacht bei RT stehen gelassen, damit sich das Gleichgewicht zwischen α - und β -Form durch Mutarotation einstellen konnte. Anschließend wurden die Lösungen als 2 mL Aliquots bei -20 °C gelagert. ABTS wurde täglich neu in KPi300 eingewogen und spektroskopisch über $\epsilon_{340} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^[103] quantifiziert.

4.1.2 Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Proteine und Bezugsquellen

Name	Bezugsquelle
Peroxidase aus Meerrettich (HRP) Typ VI-A	Sigma-Aldrich
Glukose Oxidase aus <i>Aspergillus Niger</i> (GOX) Typ X-S	Sigma-Aldrich
Katalase aus Rinderleber (Kat)	Sigma Aldrich
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma Aldrich
Streptavidin (STV), rekombinant in <i>E.coli</i> exprimiert	Arbeitsgruppe Niemeyer

4.1.3 Oligonucleotide

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Modifizierungen wurden mit SH für Thiol, b für Biotin, T6 für 6 x Thymin und A6 für 6 x Adenin abgekürzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Oligonucleotide am 5'-Ende modifiziert. Die komplementären Sequenzen sind mit c gekennzeichnet. Sämtliche Oligonucleotide wurden bei Sigma-Aldrich synthetisiert, HPLC gereinigt und lyophilisiert. Nach Erwerb wurde das lyophilisierte Pulver in TE Puffer gelöst, auf 100 µM verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide von 5' nach 3'.

Name	Sequenz
F5	GGT CCG GTC ATA AAG CGA TAA G
F9	GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA G
cF5	C TTA TCG CTT TAT GAC CGG ACC
cF9	C TTC ACG ATT GCC ACT TTC CAC
cF9cF5	C TTC ACG ATT GCC ACT TTC CAC C TTA TCG CTT TAT GAC CGG ACC
cF5cF9	C TTA TCG CTT TAT GAC CGG ACC C TTC ACG ATT GCC ACT TTC CAC
cF5-2	C TTA TCG CTT TAT GAC CGG ACC C TTA TCG CTT TAT GAC CGG ACC
cF9-2	C TTC ACG ATT GCC ACT TTC CAC C TTC ACG ATT GCC ACT TTC CAC
W7*	CCC TCC CTC C
W8*	GGC TGG CTG G
W1*	CTC TCA AAT AAA TAA AAA TAA ATA AGA GAG AGA GAT GTC TGT CTG GCT GCT GCT GTC TCT GGA GGG AGG G
W2*	TCC ATC AGA CAG ACA CAG CAG CAG CAT GGA TGG ATA AAT AAA TAA AAA TAA ATA AAT CCA CCA GCC AGC C

* nach ^[35]

4.1.4 Puffer und Lösungsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer wurden mit bidstilliertem Wasser angesetzt, welches zuvor mit dem Milli-Q BioCell System (Millipore) gereinigt wurde. Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung und pH-Wert
Blockingpuffer	TBS, 0,1 mg/mL HS-DNA, 0,1 mg/mL BSA (-20 °C)
Glycinpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, pH 8,3
KPi	50 mM Kaliumphosphat; pH 7,4
KPi300	50 mM Kaliumphosphat, 300 mM NaCl; pH 7,4
KPi300BDF	KPi300, 0,1 mg/mL BSA, 0,1 mg/mL HS-DNA, sterilfiltriert (-20 °C)
PBS	50 mM Kaliumphosphat, 150 mM NaCl; pH 6,8
Phosphatpuffer	10 mM Kaliumphosphat; pH 7,4
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5
5xTBE	445 mM Tris-HCl, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,3
TETBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween20; pH 7,3
TETBS300	300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween20; pH 7,3
bioTETBS	TETBS, 800 µM Biotin (7 °C)
Tris A	20 mM Tris-HCl; pH 6,3
Tris B	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl; pH 6,3

Die verwendeten Lösungsmittel DMF, DMSO und Ethanol waren von p.A. Qualität und wurden von Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

4.1.5 Sonstige Materialien

Die STV-beschichteten Partikel für die Mikrofluidik (Bestellnr. PC-S-10.0) wurden von Kiesker (Steinfurt) bezogen. Die Partikel mit einem Durchmesser von 10 µm können laut Herstellerangaben 0,067 nmol Biotin-FITC pro 1 mg Partikel binden, was 32,2 amol Biotin-FITC pro Partikel entspricht.

Die mikrofluidischen Reaktoren wurden aus Silikon gegossen und polymerisiert. Die genaue Vorgehensweise wird in Abschnitt 4.3.7 erläutert. Als Ausgangsstoffe dienten das Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit von Dow Corning (Midland, MI, USA).

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der Konjugate wurden Gradientengele der Firma BioRad (Ready Gel TBE Gel, 4 – 20 %I, 15 wells, 15 µL) eingesetzt. Zum Gießen der nativen Gele wurde Acrylamid Fertiglösung 40 % (37,5:1) von Merck verwendet. Als

Standard dienten „O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder“ (SM0613) und „O’RangeRuler 100 bp DNA Ladder“ (SM0623). Als Ladepuffer wurde der „Orange DNA Loading Dye (6x)“ (R0631) eingesetzt, alle drei von Thermo Fischer.

4.2 Instrumentation

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit den folgenden Geräten und Hilfsmitteln durchgeführt.

4.2.1 Chromatographie

Die Aufreinigung der DNA-Enzymkonjugate erfolgte an der FPLC-Anlage Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech. Die Anlage wurde gesteuert durch das Programm „Unicorn“ Version 4.00.16 von Amersham Pharmacia Biotech. Als stationäre Phase wurde die Anionenaustauschsäule MonoQ 5/5 HR eingesetzt.

4.2.2 Spektroskopie

Die UV-VIS Spektren wurden mit dem Cary 100 Bio UV/VIS Spektrometer aufgenommen. Der temperierbare Zellblock für sechs Küvetten, der ebenfalls über eine magnetische Rührfunktion verfügte, wurde für die Kinetikmessungen mit ABTS verwendet.

4.2.3 Elektrophorese

Alle PA-Gelelektrophoresen wurden mit dem Mini Protean 3 System von BioRad durchgeführt. Als Spannungsquelle diente der Power Pax 300 von BioRad. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Alpha-Imager 2200 (Alpha Innotech Corporation) unter Verwendung der Software Alpha Ease FC Version 3.2.1.

4.2.4 Mikrotiterplattenleser

Die Untersuchungen im Mikrotiterplattenformat wurden mit dem Mikrotiterplattenlesern Synergy HT und Synergy 2 der Firma BioTek (Bad Friedrichshall) durchgeführt und wurden mit der zugehörigen Software KC4 (Synergy HT) und Gen5 (Synergy 2) gesteuert, ausgewertet und nach Excel exportiert. Für die Messung von Resorufin wurde der Anregungsfilter 530 ± 25 nm und der Emissionsfilter 590 ± 35 nm

verwendet. Für eine höhere Sensitivität wurde ein dichroischer Spiegel eingesetzt. Die Umrechnung auf die Resorufinkonzentration erfolgte mithilfe der Kalibrierkurven in Abbildung 85. Die Bestimmung von ABTS erfolgte über Absorptionsmessungen mit $\epsilon_{405} = 36\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [103].

4.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikrofluidikexperimente wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (IX8-1) mit einer temperierbaren Inkubationskammer analysiert. Als Lichtquelle diente der Brenner Olympus IX2-UCB. Die Bilder wurden mit einer EM-CCD Digitalkamera C9100-12 der Firma Hamamatsu aufgenommen. Die Steuerung des Mikroskops und der Datenaufnahme erfolgte mit der Software Xcellence RT.

4.2.6 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik wurde mit drei Pumpenmodulen der Firma Cetoni durchgeführt, die sich aus der Starter-Achse 14:1 NEM-B003-02 D, sowie zwei Modulen OEM310 zusammensetzen. Zur Dosierung wurden Glasspritzen von Hamilton Typ 1750 LT gastight mit 500 μL Volumen eingesetzt. Die Module enthielten ein abnehmbares Mikroventil, das bei den Experimenten in Abschnitt 2.7.3 genutzt wurde. Die Pumpen und Ventile wurden mit der zugehörigen Software Nemesys User Interface 2.6.0.4 gesteuert.

4.2.7 Software

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word 2007 verfasst. Das Literaturverzeichnis wurde mit Endnote X4 erstellt. Zur Datenauswertung wurden Excel 2007 (Microsoft) und Origin 8 Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet, mit denen auch die Diagramme erstellt wurden. Die Grafiken wurden mit Corel X3 gezeichnet, während chemische Formeln mit ChemSketch 2016 erstellt wurden. Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden mit dem Programm ImageJ 1.44o (Public Domain) ausgewertet.

4.2.8 Weitere Materialien und Geräte

Weitere verwendete Materialien und Geräte sind in Tabelle 15 aufgelistet:

Tabelle 15: Weitere Geräte und Materialien

Produkt	Hersteller
Einweg-Gelfiltrationssäulen, Sephadex NAP-5, NAP-10	GE Healthcare
Rührküvetten und Mikroküvetten	Hellma
Deckgläser 24 x 24 mm ²	Fisher scientific
Einweg Petrischalen	BD Falcon
Mikrotiterplatten F16-Module Maxisorp, schwarz, U-Boden	NUNC
Mikrotiterplatten F96 Polystyrol, schwarz, U-Boden	NUNC
Mikrotiterplatten F96 Polystyrol, transparent, U-Boden	NUNC
Filterplatten Unifilter 96 Well microplate mesh bottom	GE Healthcare
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2; 15; 50 mL	Eppendorf, VWR
Reaktionsgefäße 1,5 mL Low Binding	Eppendorf
VIVA-Spin Zentrifugenkonzentratoren (30, 100, 1000 kDa)	Sartorius
Spritzensterilfilter 0,2 µm	Sartorius
Biopsiestanzen 1,5 mm, steril	kai medical
Schläuche Silikon, Ø = 0,5 mm (innen) Ø = 2,5 mm (außen)	Vieweg GmbH
Schläuche PVC, Ø = 0,8 mm (innen) Ø = 1,5 mm (außen)	Vieweg GmbH
Y-Stück für Schläuche 2 mm	Vieweg GmbH
Adapter, Schlauch (2 mm) auf Luer-Lock	Vieweg GmbH
Plasma Anlage flecto 10 USB	Innovative Technische Systeme Hattersheim
Tischzentrifugen 5804R und 5415 R	Eppendorf
Orbitalschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.3.1 Enzymmodifikationen

4.3.1.1 Synthese von DNA-Enzymkonjugaten

Zur Reduzierung der Disulfidbrücken wurden 100 μL einer 100 μM Lösung des thiolmodifizierten Oligonucleotids gewünschter Sequenz in TE mit 60 μL DTT (Dithiothreitol) (1 M) versetzt und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Etwa 2 mg des Crosslinkers sSMCC (sulfo-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat) wurden in 60 μL DMF gelöst und mit 200 μL einer 100 μM Lösung des gewünschten Enzyms unter Lichtausschluss für 90 min bei RT inkubiert.

Die beiden aktivierten Proben wurden durch Gelfiltration mit NAP5 / NAP10 Säulen aufgereinigt. Die Säulen wurden vorher mit gekühltem KPi300 Puffer äquilibriert. Direkt nach der Elution wurden beide Proben gemischt und unter Lichtausschluss für 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mittels eines Vivaspin Zentrifugenkonzentrators (10000 MWCO für HRP, MWCO 50000 für GOX) bei 5000 RPM auf etwa 300 – 500 μL eingengt. Die Zentrifugenkonzentratoren wurde anschließend zweimal mit Tris A aufgefüllt und umgepuffert.

Das Gemisch wurde auf der FPLC mittels Anionenaustausch-Chromatographie (Säule MonoQ HR 5/5) über einen linearen Salzgradienten mit Tris B (1 M NaCl) bei 1 mL/min aufgereinigt. HRP: 0 – 70 % B innerhalb von 15 mL, GOX: 0 – 40 % innerhalb von 6 mL, 40 – 100 % innerhalb von 20 mL. Dabei wurde das Produkt über die Wellenlängen 260 und 280, sowie 405 nm (HRP) bzw. 454 nm (GOX) detektiert. Das Eluat wurde fraktionsweise gesammelt, in KPi300 umgepuffert, aufkonzentriert und über UV-VIS-Spektroskopie analysiert. Die Lagerung erfolgte in Aliquots à 20 μL bei -20 °C.

4.3.1.2 Synthese von DNA-Enzymkonjugaten nach Willner

1 μM nGOX bzw. 1 μM nHRP wurde mit 5 μM des Crosslinkers sEMCS (N-(ϵ -Maleimidocapropoxy)sulfosuccinimidester) in 0,5 mL 10 mM Phosphatpuffer für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges sEMCS wurde durch die Aufreinigung mit Vivaspin Zentrifugenkonzentratoren (30 000 MWCO) entfernt. 10 μM thiolmodifizierte DNA wurde

für 3 h mit 2 mM DTT in Phosphatpuffer bei RT inkubiert und anschließend durch Gelfiltration mit NAP 5 und NAP 10 Säulen aufgereinigt. Je 1 μM der aktivierten Enzyme wurden mit 10 μM der aufgereinigten thiolmodifizierten Oligonucleotide SH-W8 (für GOX) bzw. SH-W7 (für HRP) in 0,5 mL gemischt und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde überschüssige DNA durch Ultrafiltration mit Vivaspin Zentrifugenkonzentratoren (30 000 MWCO) entfernt und die Konjugate in KPi300 umgepuffert. Sie konnten nun auf Willners DNA-Hexagonstruktur hybridisiert werden (Abschnitt 4.3.4.3)

4.3.1.3 Biotinylierung der Enzyme für die Mikrofluidik

Die Biotinylierung der Enzyme erfolgte durch Kupplung mit NHS-PEG4-Biotin. Dazu wurden etwa 5 mg nHRP (ca. 100 nmol) eingewogen, in 490 μL KPi300 gelöst und durch Gelfiltration mit einer NAP 5 Säule gereinigt. Für die Biotinylierung von GOX wurde entsprechend 16 mg nGOX (ca. 100 nmol) eingesetzt. Bei der Gelfiltration wurde die Lösung 1:1 verdünnt, so dass eine etwa 1 mL einer 90-100 μM Lösung resultierte. 1,35 mg NHS-PEG4-Biotin (etwa 4 μmol) wurden in 400 μL DMSO gelöst. Die Kupplungsreaktion wurde in drei verschiedenen molaren Verhältnissen durchgeführt. Zu 110 μL der Enzymlösung (10 nmol) wurden 1,5; 5 und 15 μL der NHS-PEG4-Biotin-Lösung (15; 50 und 150 nmol) pipettiert und 60 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Die Reaktionslösungen wurden anschließend durch Gelfiltration mit NAP 5 und NAP 10 Säulen aufgereinigt, UV-spektrometrisch quantifiziert, aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Der Erfolg der Biotinylierung wurde durch Immobilisierung auf STV-beschichteten Mikrotiterplatten und anschließender Aktivitätsbestimmung bestätigt, vgl. Abschnitt 4.3.5.

4.3.2 Gelelektrophorese

4.3.2.1 Gradientengele

Die assemblierten bienzymatischen Komplexe und die zugehörigen Komponenten wurden in kommerziell erhältlichen Polyacrylamid-Gradientengele (4-20 %) der Firma Biorad analysiert. Die Zusammensetzung und Stöchiometrie der Komponenten ist den Legenden der Gele in Abschnitt 2.2.1.1 zu entnehmen.

Da die Konjugate meist in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 μM vorlagen, wurden sie unverdünnt eingesetzt. Das Volumen, das 5 bzw. 7 pmol entsprach, wurde in die gewählten PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Trägeroligonucleotid wurde in H_2O auf 5 bzw. 7 μM verdünnt und entsprechend dem stöchiometrischen Verhältnis hinzugefügt. Als Standard wurde eine Probe mit 1,1 μL „O’RangeRuler 50 bp Ladder“ (Thermo Fischer, SM0613) angesetzt. Reaktionsgefäße mit geringen Volumen wurden mit H_2O auf etwa 7 μL aufgefüllt, wobei das Volumen einiger Proben größer war. Zu jeder Probe wurde je 1 μL 5xTBE-Puffer und 1/5 des Probenvolumens „6x Orange DNA Loading Dye“ (Thermo Fischer R0631) pipettiert. Die Proben wurden für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Die Gradientengele wurden, wie vom Hersteller angegeben, in das Gelelektrophoresesystem „Mini Protean“ der Firma Biorad eingesetzt, und das System wurde mit 4 °C vorgekühlten 1xTBE-Puffer gefüllt. Dann wurden die vorinkubierten Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4 °C mit $U = 120 \text{ V}$ für etwa 3 h. Die Visualisierung wird in Abschnitt 4.3.2.3 beschrieben.

4.3.2.2 Gelelektrophorese mit 8,5 % Polyacrylamid

Die direkt hybridisierten bienzymatischen Komplexe, bei denen die Kontrollen durch Strangverdrängung erzeugt wurden, wurden durch Gelelektrophorese mit 8,5 % Polyacrylamid untersucht. Zur Herstellung der Gele wurden die in Tabelle 16 angegebenen Volumina verwendet.

Zuerst wurde das Trenngel (8,5 %) gegossen und sofort mit einer dünnen Schicht Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberkante zu erzeugen. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol abgegossen, die frisch angesetzte Lösung des Sammelgels über das Trenngel gegossen und ein 10er Kamm zur Ausbildung der Taschen eingesetzt. Beide Polymerisationsvorgänge dauerten etwa 45-60 min.

Tabelle 16: Ansätze für 2 Gele, alle Volumenangaben in μL .

Komponente	Sammelgel 5 %	Trenngel 8,5 %
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, 30 %	500	2833
TrisHCl 1,5 M, pH 8,8		2500
TrisHCl 1,0 M, pH 6,8	400	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	30	50
Triethylmethylethyldiamin (TEMED)	3,0	5,0
H ₂ O	2100	4670

Die Zusammensetzung und Stöchiometrie der Proben ist der Legende des Gels in Abschnitt 2.2.2.1 zu entnehmen. Auch hier wurden die Konjugate unverdünnt eingesetzt. Das Volumen, das 3 pmol entsprach, wurde in die gewählten PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Von den Verdrängeroligonucleotiden F5-A6 und cF5 (je 100 μM) wurden 0,3 μL bzw. von einer 1:50 Verdünnung 1,5 μL zu den entsprechenden Proben zugegeben. Als Standard wurde eine Probe mit 1,0 μL „O’RangeRuler 100 bp Ladder“ (Thermo Fischer, SM0623) angesetzt. Alle Reaktionsgefäße wurden mit H₂O auf 7,5 μL aufgefüllt, und es wurden 1,5 μL „6x Orange DNA Loading Dye“ (Thermo Fischer R0631) zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei RT und weitere 20 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben vorsichtig in die Taschen des 8,5 % Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 4 °C in Glycinpuffer bei 100-150 V für 90 min durchgeführt. Die Visualisierung wird in Abschnitt 4.3.2.3 beschrieben.

4.3.2.3 Visualisierung

Da alle Proben entweder DNA oder DNA-Konjugate enthielten, konnten die Banden mit dem Interkalationsfarbstoff SybrGold (Thermo Fischer, S11494) angefärbt werden. Dazu wurden 2,5 μL der 10000x SybrGold-Stocklösung in 25 mL TE-Puffer verdünnt. In dieser Lösung wurde das zu färbende Gel etwa 15 min unter Lichtausschluss bei leichtem Schwenken inkubiert. Die angefärbten Banden wurden mit dem Geldokumentationsgerät AlphaImager (Biozym) bei 300 nm angeregt und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

4.3.3 Methoden zur Immobilisierung der Enzyme

4.3.3.1 Herstellung von Streptavidin-Platten

Die Vertiefungen von schwarzen Maxisorp® Mikrotiterplatten (MTP) 16F- Modulen (NUNC) mit Flachboden wurden mit je 50 µL einer 200 µM Streptavidin (STV)-Lösung in PBS gefüllt, kurz mit 3700 RPM zentrifugiert, mit einer Klebefolie abgedichtet und mindestens 48 h bei 4 °C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurden die STV-beschichteten Vertiefungen dreimal mit 250 µL TBS für 1 min gewaschen. Um später unspezifische Adsorption zu verhindern, wurden die MTP mit 150 µL Blockingpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Mit Klebefolie abgedichtet waren die MTP im Kühlschrank bei 4 °C für mehrere Wochen haltbar.

4.3.3.2 DNA-vermittelte Immobilisierung der DNA-Enzymkonjugate

Nach Entfernen des Blockingpuffers wurden die nach Abschnitt 4.3.3.1 hergestellten Platten zweimal 30 s und zweimal 5 min mit 240 µL TETBS gewaschen. In jede Kavität wurden 50 µL einer 240 nM Lösung der biotinylierten Fängeroligonucleotide pipettiert. Für die Experimente in Abschnitt 2.2.4. wurden hier entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt. Als Kontrolle wurde in einige Vertiefungen reiner Puffer oder nichtkomplementäre biotinylierte DNA gegeben. Nach 30 min Inkubation unter orbitalem Schütteln bei 4 °C wurden die Vertiefungen zweimal 30 s mit 240 µL TETBS und zweimal 5 min mit 240 µL bioTETBS gewaschen. Die zu immobilisierenden DNA-Enzymkonjugate wurden in TETBS300 auf die benötigte Enzymkonzentration verdünnt. Davon wurden 50 µL pro Vertiefung pipettiert und für mindestens 90 min bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige Konjugate zu entfernen, wurde die MTP zweimal 30 s und einmal 5 min mit 240 µL TETBS300 gewaschen. Es folgte ein letzter fünfminütiger Waschschrift mit 240 µL KPi300, damit kein EDTA in den Vertiefungen zurückblieb.

Nun konnte die Aktivität immobilisierten Enzyme gemessen werden, indem mit einer Multipipette je 100 µL Substratlösung in jede Vertiefung transferiert wurden. Für HRP bestand die Substratlösung aus 20 µM Amplex Red und 1 mM H₂O₂ in KPi300. Für GOX wurden 20 µM Amplex Red, 10 mM bzw. 1 mM Glukose und 1 nM nHRP eingesetzt. Bei den Experimente in Abschnitt 2.2.4 wurde teilweise 1 µM Katalase zugegeben. Die Messung

im Mikrotiterplattenleser wurde sofort gestartet und erfolgte, wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben.

4.3.3.3 Direkte Immobilisierung der biotinylierten Enzyme

Nach Entfernen des Blockingpuffers wurden die nach Abschnitt 4.3.3.1 hergestellten Platten zweimal 30 s und zweimal 5 min mit 240 μL TETBS gewaschen. Die biotinylierten Enzyme wurden in TETBS auf 1 nM verdünnt. Von der Lösung wurden jeweils 50 μL in die benötigten Kavitäten pipettiert und für 60 min bei 4 °C unter orbitalem Schütteln inkubiert. Es folgten zweimal 30 s und einmal 5 min Waschen mit TETBS. Nach einem letzten fünfminütigen Waschschrift mit KP300 konnte die Aktivität der immobilisierten Enzyme gemessen werden, indem mit einer Multipipette je 100 μL Substratlösung in jede Vertiefung transferiert wurden. Für HRP bestand die Substratlösung aus 20 μM Amplex Red und 1 mM H_2O_2 in KP300. Für GOX wurden 20 μM Amplex Red, 10 mM Glukose und 1 nM nHRP eingesetzt. Die Messung im Mikrotiterplattenleser wurde sofort gestartet und erfolgte, wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben.

4.3.3.4 Immobilisierung auf STV-beschichteten Mikropartikeln

10 pmol der biotinylierten Enzyme wurden mit 250 000 Partikeln inkubiert und anschließend siebenmal mit 0,2 μm Spritzenfiltern und nach Rückgewinnung fünfmal durch Ultrafiltration (bHRP mit 100 000 MWCO, bGOX mit 1 000 000 MWCO) aufgereinigt. Die Partikel wurden so intensiv gewaschen, damit nicht, wie in Abschnitt 2.3.2 beobachtet, Enzyme in den Membranen zurückgehalten wurden. Außerdem ähnelt dieses intensive Waschen den Bedingungen im Festbettreaktor in der Mikrofluidik, bei der die dichte Partikelschüttung direkt vor den Fritten ebenfalls hohen lokalen Flussraten ausgesetzt ist, so dass nur schwach gebundenes Enzym gewegewaschen wird.

Nach mehreren Pipettierschritten und dem intensiven Kontakt mit Membranen und Filtern war zu erwarten, dass nicht alle Partikel wieder zurückgewonnen werden können. Deshalb wurde nach der Resuspendierung der Partikel in KP300BDF ein Aliquot mit Hilfe der Neubauer Zählkammer im Mikroskop gezählt, vgl. Abschnitt 4.3.6. Die Suspensionen konnten nun, wie in Abschnitt 4.3.5.2 und 4.3.5.3 beschrieben, in einer unbehandelten Mikrotiterplatte kinetisch untersucht werden.

4.3.4 DNA-vermittelte Assemblierung der Enzymkaskade in Lösung

4.3.4.1 Anordnung auf einem Trägeroligonucleotid

Je 6,25 pmol der Konjugate wurden in Low Binding Cups mit 0 bis 1,6 Äquivalenten des Trägeroligonucleotids in 50 μL KPi300 mit 0,1 mg/mL BSA inkubiert. Die Proben wurden für 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde in einem Bereich von sechs mal sechs Vertiefungen (Spalten 1-6, Reihen B-G) einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe von 0 (Reihe B) bis 78 μL (Reihe G) KPi300 mit BSA vorgelegt. Die vorinkubierten Proben wurden um den Faktor 50 in KPi300 mit BSA verdünnt. Davon wurden 80 μL (Reihe B) bis 2 μL (Reihe G) zum vorgelegten Puffer zugegeben, wobei die Probe mit 0 eq DNA in Spalte 1, 0,3 eq DNA in Spalte 2 pipettiert wurde usw. Durch Zugabe von je 20 μL Substratlösung (50 mM Glukose, 100 μM Amplex Red) mit der Multipipette wurde die Aktivitätsmessung gestartet und konnte im Mikrotiterplattenleser verfolgt werden, vergleiche Abschnitt 4.3.5.4. Die Endkonzentrationen betragen 10 mM Glukose und 20 μM Amplex Red. Für die Katalasemessungen wurde in die Substratlösung 500 nM Katalase zugesetzt, was zu einer Endkonzentration von 100 nM im Experiment führte.

4.3.4.2 Direkte Kopplung komplementärer DNA-Enzymkonjugate

Die beiden Enzymkonjugate (HRP-F5 und GOX-T6cF5) wurden gemeinsam in 3500 μL KPi300 auf 1,25 nM verdünnt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Verdrängerstränge F5-A6 und cF5 wurden einzeln in 400 μL KPi300 auf 25 nM verdünnt. Von dieser Lösung wurden Verdünnungsreihen in den Spalten einer schwarzen MTP pipettiert, indem zunächst in zwei Spalten 40-20 μL KPi300 vorgelegt wurden und dann 0-20 μL der jeweiligen Lösung hinzugefügt wurden. In einer dritten Spalte wurde 40-0 μL KPi300 pipettiert und von beiden DNA-Verdünnungen 0-20 μL zugegeben. So resultierte in allen Vertiefungen ein Volumen von 40 μL . Anschließend wurden je 40 μL der Enzymlösung zugegeben und die MTP für 30 min bei RT unter orbitalem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von je 20 μL Substratlösung (5 mM Glukose, 100 μM Amplex Red) mit der Multipipette wurde die Aktivitätsmessung gestartet und konnte im Mikrotiterplattenleser verfolgt werden, vergleiche Abschnitt 4.3.5.4. Die Endkonzentrationen betragen 1 mM Glukose und 20 μM Amplex Red.

4.3.4.3 Assemblierung der Hexagonstruktur nach Willner

Die Assemblierung erfolgte nach dem Protokoll von Willner.^[33] Die Oligonucleotide W1 und W2 zum Aufbau der Hexagonstruktur wurden separat in 800 μL Phosphatpuffer auf 50 nM verdünnt und in danach im Verhältnis 1:1 in 8-16 Aliquots zu einer Endkonzentration von 25 nM gemischt. Mit einem Thermocycler wurde ein Temperaturprofil zur Assemblierung der Struktur durchlaufen. Die Proben wurden zunächst für 10 min auf 94 °C erhitzt. Von 94 °C wurde in 90 Schritten à 1 min je um -0,5 K auf 49 °C abgekühlt. In den folgenden 90 Schritten à 1 min wurde um je 0,22 K auf 30 °C abgekühlt. Die Hexagonstruktur konnte nun mit Enzymkonjugaten hybridisiert werden. Dazu wurden die Enzymkonjugate GOX-W8 und HRP-W7 (vgl. Abschnitt 4.3.1.2) bei RT in äquimolarem Verhältnis mit der Hexagonstruktur gemischt und für 30 min inkubiert.

Die Aktivität der Proben wurde anschließend im UV-Spektrometer in einer 1500 μL Rührküvette (Hellma) untersucht. Dazu wurden je 1200 μL der Substratlösung (133 mM Glukose, 533 μM ABTS in KPi300) in Küvette 1 und 2 pipettiert. In eine dritte Küvette wurde eine 533 μM ABTS Lösung als Kontrolle gegeben. Zum Start der Reaktion wurden 400 μL der mit den Hexagonstrukturen vorinkubierten Enzymkonjugate (0,8 nM) zügig in Küvette 1 und 3 pipettiert. In Küvette 2 wurde die beiden Enzymkonjugate ohne DNA-Struktur gegeben, was als weitere Kontrolle diente. Die Datenaufnahme erfolgt mit einem UV-Spektrometer mit einem Schlitten für bis zu 12 Küvetten. Die Absorption des sich bildenden ABTS-Radikals wurde bei $\lambda = 405$ nm mit einer Zeitauflösung von 15 s für 5 min detektiert.

4.3.5 Kinetikmessungen in der Mikrotiterplatte

4.3.5.1 Kinetikmessungen mit HRP-Konjugaten bei variabler Amplex Red Konzentration

Die Kinetik von HRP unter Variation der Amplex Red Konzentration wurde bestimmt, indem in einer Spalte einer schwarzen Mikrotiterplatte (MTP) die Substratlösungen in verschiedenen Konzentrationen gemischt wurden, weitere 3-4 Spalten mit HRP-Lösung gefüllt wurden und schließlich mit einer Multipipette die Substratlösungen zügig zur Enzymlösung transferiert wurden. Zum Mischen der Substratlösungen wurden 0 bis 196 μL KPi300 in die Vertiefungen vorgelegt, jeweils 50 μL der auf 10 mM verdünnten H_2O_2

Lösung zugegeben und schließlich 200 bis 4 μL in KPi300 verdünntes Amplex Red (1,25 mM) zugegeben, so dass 250 μL resultierten. Die MTP mit den Substratlösungen wurde etwa 30 s auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. In weiteren Spalten wurden je 50 μL der zu untersuchenden HRP-(Konjugat)-Lösungen (0,2 nM in KPi300, in Low Binding Cups verdünnt) vorgelegt. Als Kontrolle diente eine Spalte mit jeweils 50 μL KPi300. Die so vorbereitete MTP wurde für 3 min im Mikrotiterplattenleser auf 25 °C vorgewärmt, bevor mit einer Multipipette je 50 μL der Substratlösungen in die HRP- bzw. Pufferenthaltenden Vertiefungen pipettiert wurde und die Messung, wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben, gestartet wurde. Die Endkonzentrationen betragen 0,1 nM HRP(-Konjugate), 1 mM H_2O_2 und 10 bis 500 μM Amplex Red in einem Gesamtvolumen von 100 μL pro Vertiefung. Da Proben ohne Amplex Red quasi keine Fluoreszenz zeigten, wurden keine Kontrollen ohne Amplex Red gemessen. Die MTP wurden wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben im Mikrotiterplattenleser gemessen.

4.3.5.2 Kinetikmessungen mit bHRP bei variabler H_2O_2 -Konzentration

Bei den Messungen von bHRP in Lösung und auf nach Immobilisierung aufgereinigten Partikeln wurde die H_2O_2 -Konzentration variiert. (Abschnitt 2.3.4) Dazu wurde Puffer und H_2O_2 in der MTP vorgelegt, HRP dazugegeben und die Reaktion durch Zugabe von Amplex Red gestartet. Im Detail wurden in jede zu verwendende Spalte 0 bis 40 μL KPi300BDF in jede Kavität pipettiert und 40 bis 0 μL einer 625 μM H_2O_2 Lösung in KPi300BDF zugegeben. Nach 30 s orbitalem Schütteln wurden entweder 10 μL einer 0,2 nM bHRP-Lösung (verdünnt in KPi300BDF in Low Bindung Cups), 10 μL der aufgewirbelten Partikelsuspension ($N/V=147 \mu\text{L}^{-1}$) aus Abschnitt 4.3.3.4 oder 10 μL des dazugehörigen Überstandes zu jeder Vertiefung pipettiert. Die Reaktion wurde gestartet, indem mit einer Multipipette je 50 μL einer 200 μM Lösung aus Amplex Red in KPi300BDF aus einer Wanne in jede Kavität transferiert wurde. Die Endkonzentrationen betragen 250 bis 0 μM H_2O_2 , 100 μM Amplex Red und 20 pM bHRP bzw. 1470 Partikel pro Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 100 μL . Die MTP wurden wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben im Mikrotiterplattenleser gemessen, wobei wegen der niedrigen Enzymkonzentrationen mit einer Sensitivität von 70 gemessen wurde.

4.3.5.3 Kinetikmessungen mit GOX bei variabler Glukosekonzentration

Native GOX und die **DNA-GOX-Konjugate** wurden kinetisch untersucht, indem in einer schwarzen Mikrotiterplatte (MTP) die Substratlösungen in verschiedenen Konzentrationen gemischt wurden, weitere 4 Spalten mit GOX-Lösung verschiedener Sequenz gefüllt wurden und schließlich mit einer Multipipette die Substratlösungen zügig zur Enzymlösung transferiert wurden. Für die Substratlösung wurde zunächst eine Lösung mit 3,33 nM nHRP und 66,7 μM Amplex Red in KPi300 angesetzt und davon je 150 μL in eine Spalte der MTP pipettiert. In die 8 Vertiefungen wurden dann 0 – 99 μL KPi300 und 100 – 1 μL Glukoselösung (in KPi300 auf 200 μM verdünnt) zugegeben, so dass insgesamt 250 μL Substratlösung verschiedener Glukosekonzentrationen resultierten. In die zu messenden Spalten wurde jeweils 2 nM Lösungen der zu untersuchenden GOX-Konjugate, nGOX oder Puffer (Kontrolle) pipettiert. Die MTP wurde für 3 min im Mikrotiterplattenleser bei 25 °C vorgewärmt, bevor mit einer Multipipette je 50 μL der Substratlösungen in die GOX-enthaltenden Vertiefungen pipettiert wurde und die Messung, wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben, gestartet wurde. Die Endkonzentrationen betragen 1 nM GOX(-Konjugate), 20 μM Amplex Red, 1 nM nHRP und 0,4 bis 40 mM Glukose in einem Gesamtvolumen von 100 μL pro Vertiefung.

Die Kinetikmessungen mit **bGOX** in Lösung und auf (nach Immobilisierung) aufgereinigten Partikeln (Abschnitt 2.3.4) erfolgten ebenfalls unter Variation der Glukosekonzentration. In einer Spalte einer MTP wurden 0 bis 240 μL KPi300BDF vorgelegt und 240 bis 0 μL einer 300 mM Glukoselösung in KPi300BDF dazugegeben. In die Vertiefungen von vier weiteren Spalten wurden jeweils 50 μL einer Lösung aus 200 μM Amplex Red und 4 nM nHRP (verdünnt in KPi300BDF in Low Binding Cups) pipettiert und die MTP 30 s mit einem Orbitalschüttler gemischt. Anschließend wurden je 10 μL einer 0,2 nM bGOX-Lösung (verdünnt in KPi300BDF in Low Binding Cups), der aufgewirbelten Partikelsuspension ($N/V=194 \mu\text{L}^{-1}$) aus Abschnitt 4.3.3.4 oder des dazugehörigen Überstandes spaltenweise zu den Amplex Red und HRP enthaltenden Vertiefungen pipettiert. Die Reaktion wurde gestartet, indem mit einer Multipipette je 50 μL der Glukoseverdünnungen in die enzymenthaltenden Spalten pipettiert wurde. Die Endkonzentrationen betragen 120 bis 0 μM Glukose, 100 μM Amplex Red, 2 nM nHRP und 20 pM bGOX bzw. 1940 Partikel pro Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 100 μL . Die

MTP wurden wie in Abschnitt 4.3.5.4 beschrieben im Mikrotiterplattenleser gemessen, wobei wegen der niedrigen Enzymkonzentrationen mit einer Sensitivität von 70 gemessen wurde.

4.3.5.4 Datenaufnahme im Mikrotiterplattenleser

Die Kinetikmessungen der vorbereiteten MTP erfolgten im Mikrotiterplattenleser Synergy 2 mit der Software Gen5, vergleiche Abschnitt 4.2.4. Die Fluoreszenz des sich bildenden Resorufin wurde über einen Filter bei 530 ± 25 nm angeregt. Die Emission wurde mit einem dichroischen Filter bei 590 ± 35 nm mit einer Sensitivität von 50 detektiert. Je nach Anzahl der zu messenden Vertiefungen konnte als minimales Zeitintervall 20 – 30 s eingestellt werden, so dass jede Vertiefung mit einer Zeitauflösung von 20 – 30 s gemessen werden konnte. Vor jedem Zyklus wurde die MTP im Gerät für 1 s geschüttelt. Die Kinetikmessungen dauerten insgesamt 20-30 min.

Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten v_0 erfolgte mit der Steuerungssoftware Gen5, durch lineare Regression der ersten 3 min. Bei extrem reaktiven Vertiefungen erfolgte bereits nach wenigen Datenpunkten ein Abflachen der Kurven, so dass in solchen Fällen nur die ersten 3 – 4 Datenpunkte (1 – 1,5 min) berücksichtigt wurden. Aus den so bestimmten Fluoreszenzwerten konnte mithilfe der Kalibrierkurve (Abbildung 86, S. 233) die Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden.

Bei den Messungen mit ABTS wurde die Bildung des ABTS-Radikals über die Absorption verfolgt. Über lineare Regression und den Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{405} = 36\,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^[103] konnte ebenfalls die Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden.

4.3.6 Zählen der Partikel

Neue Partikelchargen, sowie nach Abschnitt 4.3.3.4 aufgereinigte enzybeladene Partikel, wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer im Mikroskop ausgezählt. Die Zählkammer besteht aus einem geschliffenen Glasträger, auf dem ein exakt skaliertes Gitter aus Groß- und Kleinquadraten geätzt ist. Ein plangeschliffenes Deckglas, das in definiertem Abstand von 0,1 mm aufgelegt wird, bildet die obere Begrenzung. Auf diese Weise entspricht jedes Quadrat einem exakten Volumenelement, das im Mikroskop betrachtet wird.

Bei verdünnten Partikelsuspensionen wurden alle neun Großquadrate als Duplikate gezählt. Division der Summe der gezählten Partikel durch das Volumen der neun Großquadrate ($V = 0,9 \mu\text{L}$) ergab die Partikelkonzentration. Bei konzentrierten Suspensionen wurden nur die 16 Eckquadrate, deren Gesamtvolumen $0,1 \mu\text{L}$ betrug, ebenfalls als Duplikate ausgezählt.

Die Anzahl der Partikel einer Schüttung im mikrofluidischen Reaktor wurde graphisch mit Hilfe der Mikroskopiebilder bestimmt, wie in Abschnitt 2.4.4 hergeleitet und diskutiert wurde.

4.3.7 Herstellung der Mikroreaktoren

Das Gießen, Aushärten und Versiegeln der Mikroreaktoren erfolgte angelehnt an das Protokoll von Jonathan West, der den Wafer mit den Mikrostrukturen mitentwickelt hatte.^[158]

Die gesamte Herstellung der Mikroreaktoren sollte möglichst staubarm und unter Vermeidung von Fingerabdrücken durchgeführt werden. Das Silikon wurde angesetzt, indem 40-50 g PDMS (Polydimethylsiloxan) mit 10 gew% (4-5 g) Härter in einem Einweg-Wägeschälchen gründlich vermischt und in einem mit Wasserstrahlpumpe evakuiertem Exsikkator für 30 – 45 min entgast wurden. Sobald die Mischung keine Blasen mehr enthielt, konnte das Silikon eingesetzt werden.

Als Negativform des Reaktors diente ein Siliziumwafer, der mit dem in Abschnitt 2.4.1 vorgestelltem Design geätzt worden war. Zur Begrenzung wurden aus Kunststoff gefräste Rahmen mit den inneren Maßen von 24x24 mm auf die abzubildenden Mikrostrukturen des Wafers gelegt. Anschließend wurde das entgaste Silikon vorsichtig ca. 4-8 mm hoch in die Rahmen gegossen.

Die Mikroreaktoren wurden auf einer Heizplatte bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ für ca. 25-30 min ausgehärtet. Danach wurden sie vorsichtig vom Wafer abgelöst und der Rahmen entfernt. PDMS-Reste, die am Rahmen oder auf dem Wafer hafteten, wurden entfernt und die nächsten Reaktoren gegossen. Alle 5-6 Gießvorgänge wurde das Silikon erneut entgast, da es sonst beim Aushärten zu Blasenbildung an den Mikrostrukturen kam.

Mit Biopsiestanzen (Durchmesser 1,5 mm) wurden die Einlässe durchbohrt, um später die Schläuche anschließen zu können. Die Stanzen wurden nur für jeweils eine Charge verwendet, da sie durch die häufige Nutzung stumpf wurden und die Lochprofile sonst

unregelmäßig wurden. Außerdem entstanden durch das Stanzen des Silikons Trümmer bzw. Staub, der durch intensives Ausblasen der gestochenen Löcher und Mikrostrukturen mit Druckluft größtenteils entfernt werden konnte. Trotzdem sammelten sich in den meisten Fluidikexperimenten etwas Staub und Trümmer an den Fritten.

Parallel zum Gießen der Reaktoren wurden die späteren Unterseiten, sogenannte „PDMS-Cookies“ hergestellt. Dazu wurde die PDMS-Mischung auf großen Petrischalen (Durchmesser 120 mm) als dünne Schicht von etwa 0,5 – 2 mm Höhe ausgegossen. Es erwies sich als zweckmäßig, einen dicken Tropfen (Durchmesser ca. 40 mm) in die Mitte der Petrischale zu gießen und ihn durch manuelle Rotation der Petrischale gleichmäßig verlaufen zu lassen. Daraufhin wurden dünne Deckgläser (24x24 mm) vorsichtig auf die PDMS-Schicht gelegt, so dass es möglichst nicht zu Lufteinschlüssen unter dem Glas kam. Das funktionierte am besten, indem zuerst nur die Kante des Deckglases in das PDMS eingetaucht wurde, so dass es, durch die hohe Viskosität des Silikons gebremst, langsamer umkippte. Die „Cookies“ wurden ebenfalls ca. 25-30 min bei 80 °C ausgehärtet. Danach wurden sie mit einem Skalpell entlang der Deckglaskante ausgeschnitten und durch leichtes Verbiegen der Petrischalen partiell abgelöst. Durch vorsichtiges Hebeln mit dem Skalpell und geschicktes Verbiegen der Schalen, konnten die Cookies vollständig abgelöst werden.

Im letzten Schritt wurden die Oberflächen der Reaktoren und der „Cookies“ durch Plasmabehandlung aktiviert und miteinander verklebt.^[130] Unter optimierter Vorgehensweise wurde die Plasmakammer mit den leeren Ablagegittern zunächst 5 min mit 0,1 mbar O₂-Plasma bei voller Leistung (100 W) behandelt, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Die Plasma-Aktivierung der Reaktoren und der „Cookies“ erfolgte daraufhin für 30 s mit 0,1 mbar O₂-Plasma (50 W). Nachdem die Kammer wieder belüftet war, wurden die Reaktoren zügig zusammengeklebt und zum Nachhärten für 30 min in den Trockenschrank bei 110 °C gelegt. Da es im Laufe der Doktorarbeit immer wieder zu Undichtigkeiten kam, die meist erst während der Fluidik durch den hohen Innendruck auftraten, wurde als Schnelltest ein Metallstift in eines der gestochenen Löcher gesteckt und hin und her bewegt. Eine unvollständige Haftung konnte so schon früh erkannt werden und führte nicht zu überraschenden Ausfällen während des Fluidikexperiments.

4.3.8 Mikrofluidik

Der mikrofluidische Reaktor wurde vorbereitet, indem die mit Streptavidin beschichteten Partikel mit den biotinylierten Enzymen inkubiert wurden, die Spritzen mit den entsprechenden Suspensionen und Lösungen blasenfrei gefüllt wurden und alles unter dem Mikroskop mit dem Reaktor verbunden wurde. Die genaue Vorgehensweise wird im Folgenden beschrieben.

Da die Mikrofluidik sehr empfindlich gegen Schwebstoffe und biologische Kontaminationen ist, wurden der verwendete Puffer KPi300BDF sterilfiltriert und als Aliquots à 2 mL bei -20 °C gelagert.

4.3.8.1 Vorbereitungen

Die biotinylierten Enzyme (bHRP bzw. bGOX) wurden zunächst in KPi300BDF auf 10,26 nM verdünnt. Davon wurden 39 µL mit 1 µL der vorher gründlich aufgewirbelten Partikelsuspension (streptavidinbeschichtete Polystyrolpartikel, Kiesker, Konzentration ca. 10000 Partikel µL⁻¹) vermischt, so dass ein Mischungsverhältnis von 400 fmol Enzym zu 10000 Partikel (40 amol:Partikel) resultierte. Die Suspension wurde bei 4 °C, 850 RPM für 60-90 min inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Spritzen (Hamilton Gastight, 500 µL) und Schläuche ausgiebig mit Wasser gespült, mit Ethanol gewaschen und schließlich mit Ethanol gefüllt stehen gelassen. Diese Waschschrte erfolgten in der Regel direkt nach dem jeweiligen Experiment, so dass die Spritzen und Schläuche mit Ethanol gefüllt auch gelagert wurden.

Etwa 30 min vor Beginn des Experiments wurde die Temperatur in der Inkubationskammer des Mikroskops mit der Temperiereinheit auf 25 °C eingestellt. Anschließend wurden die Ethanol gefüllten Schläuche und Spritzen mit ddH₂O mehrfach gespült und schließlich mit Druckluft durchgeblasen. Die Spritzen wurden daraufhin mit KPi300BDF bzw. Substratlösung gefüllt. Die besten Resultate wurden erzielt, indem ca. 300 µL der Lösungen gefolgt von Luft durch den Schlauch in die Spritze gezogen wurden. Die ursprünglich in der Spritze vorhandene Luft wurde durch Klopfen an die Glaswand zur Spitze der Spritze befördert und anschließend durch den Schlauch herausgedrückt. Durch Klopfen des Kolbens der Spritze auf den Labortisch konnten außerdem Mikrobläschen aus dem Bereich des LUER-Adapters entfernt werden. Nach Entfernen sämtlicher Luftblasen

wurde die restliche Substratlösung aufgezogen. Wenn irgendwo noch Blasen erkennbar waren, wurden die letzten Schritte wiederholt.

Im nächsten Schritt wurden die Pumpen (Nemesys) mit der Steuerungssoftware (neMESYS UserInterface, Version 2.6.0.4, Cetoni) auf die entsprechenden Füllstände der Spritzen eingestellt und die Spritzen in den Halterungen befestigt. Die KPi300BDF enthaltende Spritze wurde verwendet, um den Reaktor mit Puffer zu füllen und die Luft aus den Fritten zu spülen. Wegen der vom Einstechen resultierenden Trümmer wurde dazu der Hauptkanal in Rückwärtsrichtung durchströmt. Der Schlauch wurde also am Auslass des Hauptkanals angeschlossen. Der Reaktor wurde bei Flussraten von 20-30 $\mu\text{L}/\text{min}$ gefüllt und dabei durch das Mikroskop beobachtet. Zum Überwinden der Fritten mussten kurzzeitig höhere Flussraten bis 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet werden, da es zu Druckabfall an den noch offenen Seitenkanälen kam. Anschließend wurde bei Flussraten von 20-30 $\mu\text{L}/\text{min}$ solange gespült, bis die letzten Luftblasen verschwanden und sich auf der Oberfläche des Reaktors auf allen Einlässen konvexe Flüssigkeitsmenisken oder sogar Tropfen gebildet hatten. Die Einlässe der nicht benötigten Seitenkanäle wurden nun mit Metallstiften (ca. 10 mm Abschnitte einen Schweißdrahts aus der technischen Werkstatt, Durchmesser 1,5 mm, Kanten manuell rundgeschliffen) verschlossen. Sollten sich erneut Blasen an den Fritten gesammelt haben, wurde weiter mit Puffer gespült, bis sie entfernt waren.

4.3.8.2 Aufbau des Reaktors

Im Folgenden wird der Aufbau der GOX/HRP-Enzymkaskade beschrieben. Bei Experimenten mit nur einem immobilisierten Enzym oder ganz ohne Partikel (Kalibrierkurven) wurden die entsprechenden Schritte weggelassen und die betreffenden Seitenkanäle mit Metallstiften verschlossen.

Der Pufferschlauch wurde vorsichtig entfernt, um nun sämtliche benötigten Spritzen/Schläuche in der Konfiguration des Experiments anzuschließen. Bei den folgenden Schritten war es wichtig, dass die Schläuche bis zum Ende gefüllt waren, da es sonst zum Lufteintrag in den Reaktor kommen konnte. Zunächst wurde der Schlauch der substratenthaltenden Spritze am Eingang des Hauptkanals angeschlossen und mit ca. 2-4 $\mu\text{L}/\text{min}$ gespült.

Bei Experimenten, in denen die Substratkonzentration durch Mischen zweier Spritzen variiert wurde, wurde hier ein Y-Stück zwischengeschaltet. Die beiden Schenkel wurden mit den beiden substratenthaltenden Spritzen verbunden. Ein direktes Einstecken in das PDMS führte aber zu Undichtigkeiten, da das PDMS riss. Deshalb wurde ein etwa 7 mm langes Stück Silikonschlauch am Y-Stück angesetzt in das ein etwa 7 mm langes Stück PVC Schlauch gesteckt wurde, welches dann optimal in den Eingang des Hauptkanals passte.

Der Schlauch für das Abwasser wurde mit dem Auslass des Hauptkanals verbunden. Für die Enzymkaskaden wurde zunächst der Schlauch einer Pufferspritze mit 2 μL der HRP-beschichteten Partikel (vorher gründlich aufgewirbelt) mit 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ aufgezogen und in den mittleren Seitenkanaleinlass S2 eingeführt. Mit einer zweiten Pufferspritze wurden 2 μL der GOX-beschichteten Partikel (ebenfalls vorher aufgewirbelt) mit 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ ins Schlauchende aufgezogen und in den ersten Seitenkanal S1 eingeführt. Falls erneut Blasen im System waren, wurden diese durch Spülen des Hauptkanals entfernt.

Bei den Experimenten mit GOX und HRP unter Variation der Glukosekonzentration (Abschnitt 2.7.3) wurde aus Mangel an Spritzenpumpen nur eine Spritze für beide Seitenkanäle verwendet. Über ein elektrisch schaltbares Ventil konnten zwei Schläuche an einer Spritze angeschlossen werden und beide je nach Ventilstellung einzeln angesprochen werden. Auf diese Weise wurden, wie oben beschrieben, je 2 μL der enzymladenen Partikel in die beiden entsprechenden Schlauchenden blasenfrei aufgezogen und mit den zugehörigen Seitenkanälen verbunden.

4.3.8.3 Befüllen des Reaktors

Das Befüllen mit den Partikeln erfolgte manuell gesteuert mit variablen Flussraten und wurde im Mikroskop verfolgt, um flexibel auf unsymmetrische Schüttungen, Luftblasen oder Verunreinigungen zu reagieren. Als erstes wurden die GOX-beschichteten Partikel mit ca. $Q = 2-4 \mu\text{L}/\text{min}$ über den Seitenkanal S1 injiziert. Die Flussrate des Hauptkanals wurde dazu auf $Q = 0,5-0,3 \mu\text{L}/\text{min}$ gedrosselt. Aus dem Verhältnis der Flussraten ergab sich die Form der Partikelschüttung an der Fritte und erlaubte in gewissem Maße auch Korrekturen. Nach ca. 5-7 μL kamen keine Partikel mehr dazu, und es wurde noch mit ca. 2-3 μL aus dem Seitenkanal gewaschen. Im zweiten Schritt wurden die HRP-beschichteten Partikel auf gleiche Art in S2 injiziert. Die Flussraten betragen dabei $Q = 2-4 \mu\text{L}/\text{min}$ für HRP und je

0,1-0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ aus dem Seiten- und Hauptkanal. Bei der Regulierung war es wichtig, dass die Flussrate der HRP-beschichteten Partikel im Vergleich zu den anderen Flussraten nicht zu groß eingestellt wurde, da sich sonst die GOX-beschichteten Partikel wieder von der Fritte ablösen. Auch hier kamen nach ca. 5-7 μL keine Partikel mehr hinzu, und es wurde noch mit weiteren 2-3 μL gespült. Danach wurde die Flussrate des Hauptkanals für 3 min auf 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ erhöht, um eventuell unspezifisch gebundene Enzyme wegzuwaschen. Währenddessen wurden die Flussraten beider Seitenkanäle sukzessive auf 0 verringert. Zuletzt wurde auch die Flussrate des Hauptkanals auf 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ zurückgesetzt, da die Experimente in der Regel mit dieser Flussrate begannen. Nun war der Mikroreaktor bereit für das kinetische Experiment.

4.3.8.4 Messungen im Reaktor

Im Folgenden werden die Programmierung des Mikroskops und der Pumpen für die Messung beschrieben. Vor dem Start des Experiments wurden Bilder von den Fritten aufgenommen (1ms, DIC, 10x Objektiv), um später die Partikelzahl zu bestimmen und um die Zunahme von Kontaminationen an den Fritten zu erkennen. Außerdem war eine Veränderung der Partikelschüttung oder das Verschwinden von Partikeln ein Indiz für Undichtigkeiten, Verstopfungen oder Blasen im Reaktor.

Mit der Mikroskopsoftware „Xcellence RT“ wurde zunächst der Bildausschnitt in Y-Richtung verringert, um Speicherplatz zu sparen. Hier wurde einheitlich der Pixelbereich 251-801 als Ausschnitt gewählt. Zur Messung der Resorufin Fluoreszenz wurde der „CY3“ Filter ($\lambda_{\text{Exc}} = 530\text{-}550 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 575\text{-}625 \text{ nm}$) verwendet, dessen spektrale Eigenschaften gut mit dem Resorufin Fluoreszenzspektrum (vgl. Abbildung 85A, S. 232) übereinstimmen. Als weitere Parameter für das Experiment wurden das Zeitintervall (30 s), die Dauer des Experiments (zwischen 3 h und 18 h) und die Belichtungszeit (20 ms) eingestellt. In einigen Fällen, bei denen mit starker Fluoreszenz zu rechnen war, wurden auch Belichtungszeiten von 5 oder 10 ms verwendet, während bei Negativkontrollen 50 ms Belichtungszeit gute Ergebnisse lieferte. Die Einstellung der Belichtungszeit war deshalb wichtig, da die Kamera die Bilder mit 12 Bit pro Pixel aufnimmt und somit nur Helligkeitswerte bis 4095 ($2^{12} - 1$) speichert. Einerseits sollte auch bei schwachen Signalen

ein Großteil des Helligkeitsspektrums abgedeckt werden, um eine gute Auflösung zu erhalten. Andererseits führten zu lange Belichtungszeiten bei hohen Fluorophorkonzentrationen zu einer Überstrahlung der Kamera und die Daten ließen sich nicht mehr auswerten. Die Fluoreszenzwerte ließen sich mit Hilfe von Kalibrierkurven, die bei den entsprechenden Belichtungszeiten aufgenommen wurden, in die Resorufinkonzentration zurückrechnen (vgl. Abschnitt 4.3.9 und Abbildung 86, S. 233).

Im letzten Schritt wurden die Pumpen für die jeweilige Reaktorkonfiguration programmiert (vergleiche Abschnitt 4.3.8.5). Bei allen Experimenten wurde die Loggingfunktion auf das Zeitintervall von 30 s gesetzt und auf „start all“ getriggert, damit sie exakt zum Start der Fluidik beginnt, die Flussraten zu protokollieren. Die Fluidik wurde gestartet, indem zuerst die Pumpensteuerung und sofort danach die Bildaufnahme des Mikroskops gestartet wurden.

4.3.8.5 Erstellen der Flussratenprofile

Die Programmierung der Pumpen erfolgte über die Steuerungssoftware neMESYS UserInterface. Bei den Experimenten **ohne Variation der Substratkonzentration** wurde ein einfaches Flussratenprofil eingesetzt, das in Tabelle 17 aufgelistet ist. Die Flussrate Q wurde in 7,5 min Intervallen stufenweise von 0,55 bis 0,12 $\mu\text{L}/\text{min}$ und zurück variiert. Gleichzeitig wurde zur Unterdrückung von Flackern und Druckschwankungen kontinuierlich durch den Seitenkanal S1 mit $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ abgesaugt. Die resultierenden Flussraten betragen also 0,5 bis 0,07 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tabelle 17: Flussratenprofil für die Experimente ohne Substratvariation.

t / min	$Q_{\text{Substrat}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{Seite}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{resultierend}} / \mu\text{L}/\text{min}$
7,5	0,55	-0,05	0,5
7,5	0,25	-0,05	0,2
7,5	0,15	-0,05	0,1
7,5	0,12	-0,05	0,07
7,5	0,15	-0,05	0,1
7,5	0,25	-0,05	0,2

Bei den Experimenten **unter Variation der Substratkonzentration** wurden die Substratlösungen mit Hilfe von zwei Spritzen während des Experiments gemischt und

variiert. Dazu wurden komplexere Flussratenprofile programmiert. Die Wahl der Parameter war begrenzt einerseits durch eine möglichst kurze Zeit, damit die Enzyme nicht zu stark altern, andererseits durch die Spritzengröße von 500 μL , so dass nicht zu viel Volumen verwendet werden durfte. Ein weiterer limitierender Faktor war, dass die Pumpen bei den eingesetzten Spritzen bei Flussraten $Q < 0,03 \mu\text{L}/\text{min}$ unzuverlässig wurden. Wenn Flussraten bis $Q = 0,07 \mu\text{L}/\text{min}$ gemessen werden sollten, wurde dieser Wert bei fast allen Mischungsverhältnissen von einer der beiden Pumpen unterschritten und führte zu unerwarteten Abbrüchen.

Deshalb gliederte sich jeder Zyklus des Flussratenprofils in zwei Phasen: In der ersten Phase wurde die Konzentration eingestellt, die dann im Totvolumen zwischen Y-Stück und Reaktor vorherrschte. Da das Totvolumen etwa 12 μL (abhängig von der Dicke des gegossenen Reaktors) betrug, mussten mindestens 30 μL gepumpt werden, damit der Mischvorgang vollständig abgeschlossen war und die Mischung mit der gewünschten Konzentration den Reaktor erreicht hatte. Wegen des großen Volumens wurde mit $Q = 3 \mu\text{L}/\text{min}$ gepumpt. Während dieser Phase wurde zum Schutz der Enzyme etwa 80-90 % der Lösung durch den Seitenkanal S1 abgepumpt, damit nur moderate 0,3-0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch die Fritten strömten und die Partikel und Enzyme nicht zu hohen Flussraten ausgesetzt waren.

In der zweiten Phase, dem eigentlichen Flussratengradienten, wurde die Lösung im Totvolumen mit variablen Flussraten durch den Reaktor gepumpt. Die Steuerung erfolgte dabei, aus oben genannten Gründen, nur über eine Spritze. Beim kontinuierlichen Gradienten wurden die Flussraten nur minimal nach Gleichung (51) variiert, so dass keine starken Druckschwankungen entstanden.

$$Q = \frac{1}{120} e^{\left(\frac{t}{\{min\} \cdot 5} + 0,8\right)} + 0,03167 \quad (51)$$

Tabelle 18: Flussratenprofil für die Experimente mit GOX-beladenen Partikeln mit variabler Glukosekonzentration, wie es in Abschnitt 2.6.2 verwendet wurde.

Phase	t / min	$Q_{\text{Puffer}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{Substrat}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{Seite}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{resultierend}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$V_{\text{Puffer+Substrat}} / \mu\text{L}$
Konz. auf 100 %	10	-0,15	3,15	-2,6	0,4	30
stabilisieren	2	0	0,5	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0	0,5 - 0,05	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0	0,05	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	16,25	0	0,05 - 0,5	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0	0,5	0	0,5	
Reinigen	1	2,5	0,5	-2,6	0,4	3
Konz. auf 50 %	9	1,5	1,5	-2,6	0,4	27
stabilisieren	2	0	0,5	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0	0,5 - 0,05	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0	0,05	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	16,25	0	0,05 - 0,5	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0	0,5	0	0,5	
Konz. auf 20 %	10	2,4	0,6	-2,6	0,4	30
stabilisieren	2	0,5	0	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0,5 - 0,05	0	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0,05	0	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	16,25	0,05 - 0,5	0	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0,5	0	0	0,5	
Konz. auf 10 %	10	2,7	0,3	-2,6	0,4	30
stabilisieren	2	0,5	0	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0,5 - 0,05	0	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0,05	0	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	16,25	0,05 - 0,5	0	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0,5	0	0	0,5	
Konz. auf 5 %	10	2,85	0,15	-2,6	0,4	30
stabilisieren	2	0,5	0	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0,5 - 0,05	0	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0,05	0	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	16,25	0,05 - 0,5	0	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0,5	0	0	0,5	
Konz. auf 0 %	10	3,15	-0,15	-2,6	0,4	30
stabilisieren	2	0	0,5	0	0,5	$\Sigma = 9,65$
kontinuierlicher Gradient	17,75	0	0,5 - 0,05	0	0,5 - 0,05	
stabilisieren	10	0	0,05	0	0,05	
kontinuierlicher Gradient	0,25	0	0,05021317	0	0,05 - 0,5	
stabilisieren	4	0	0,5	0	0,5	

Beim Stufengradient wurde zur Unterdrückung von Druckschwankungen kontinuierlich durch den Seitenkanal S2 mit $Q = -0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ abgesaugt. Die Flussratenprofile sind in Tabelle 18 (kontinuierlicher Gradient, zu Abschnitt 2.6.2) und Tabelle 19 (Stufengradient, zu Abschnitt 2.7.3) aufgelistet.

Tabelle 19: Flussratenprofil für die Experimente mit GOX- und HRP-beladenen Partikeln mit variabler Glukosekonzentration, wie es in Abschnitt 2.7.3 verwendet wurde.

Phase	Zeit / min	$Q_{\text{Substrat}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{Puffer}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{Seite}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$Q_{\text{resultierend}} / \mu\text{L}/\text{min}$	$V_{\text{Puffer}} + V_{\text{Substrat}} / \mu\text{L}$
Konz. auf 100 %	11	3,15	-0,15	-2,7 (S1)	0,3	33
Messzyklus Flussratengradient	7	0,55	0	-0,05 (S2)	0,5	$\Sigma = 14,14$
	7	0,25	0	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0,15	0	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0,12	0	-0,05 (S2)	0,07	
	7	0,15	0	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0,25	0	-0,05 (S2)	0,2	
Reinigen	1	0,5	2,5	-2,7 (S1)	0,3	3
Konz. auf 40 %	10	1,2	1,8	-2,7 (S1)	0,3	30
Messzyklus Flussratengradient	7	0	0,55	-0,05 (S2)	0,5	$\Sigma = 14,14$
	7	0	0,25	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0	0,15	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0	0,12	-0,05 (S2)	0,07	
	7	0	0,15	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0	0,25	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0	0,55	-0,05 (S2)	0,5	
Konz. auf 10 %	11	0,3	2,7	-2,7 (S1)	0,3	33
Messzyklus Flussratengradient	7	0	0,55	-0,05 (S2)	0,5	$\Sigma = 14,14$
	7	0	0,25	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0	0,15	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0	0,12	-0,05 (S2)	0,07	
	7	0	0,15	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0	0,25	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0	0,55	-0,05 (S2)	0,5	
Konz. auf 0 %	11	-0,15	3,15	-2,7 (S1)	0,3	33
Messzyklus Flussratengradient	7	0,55	0	-0,05 (S2)	0,5	$\Sigma = 14,14$
	7	0,25	0	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0,15	0	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0,12	0	-0,05 (S2)	0,07	
	7	0,15	0	-0,05 (S2)	0,1	
	7	0,25	0	-0,05 (S2)	0,2	
	7	0,55	0	-0,05 (S2)	0,5	

4.3.9 Aufnahme der Kalibrierkurve im Fluoreszenzmikroskop

Zur Bestimmung der Resorufinkonzentration aus der Fluoreszenzintensität der Mikroskopiebilder wurden Kalibrierkurven aufgenommen. Dazu wurde zunächst eine frische Resorufinlösung von etwa 75 μM in KPi300BDF angesetzt und im UV-Spektrometer quantifiziert. ($\epsilon_{571} = 54\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).^[104] Anschließend wurden zwei Spritzen mit zugehörigen Silikonschläuchen, wie in Abschnitt 4.3.8.1 beschrieben, mit Puffer (KPi300BDF) bzw. der 75 μM Resorufinlösung in KPi300BDF blasenfrei gefüllt und über die Schenkel eines Y-Stücks miteinander verbunden. Beide Spritzen wurden in die Spritzenpumpen eingesetzt, die auf den aktuellen Füllstand der Spritzen eingestellt waren. Auf dem gegenüberliegende Ende des Y-Stücks diente ein etwa 8 mm langes Stück Silikonschlauch ($\varnothing = 2,5\text{ mm}$) als Adapter für ein ebenfalls etwa 8 mm langes Stück PVC-

Schlauch ($\varnothing = 1,5$ mm). Der PVC-Schlauch wurde schließlich in den Einlass eines nach Abschnitt 4.3.8.1 mit KPi300BDF blasenfrei gefüllten Mikroreaktors angeschlossen, der keine Partikel enthielt. Die 3 Seitenkanäle wurden nicht benötigt und wurden deshalb nach einem kurzen Pumpvorgang mit Metallstiften verschlossen.

Über die Steuerungssoftware wurde der in Tabelle 20 aufgeführte Stufengradient programmiert. Alle 15 s wurde im Wechsel ein Fluoreszenzbild mit 2; 5; 10 und 20 ms Belichtungszeit aufgenommen, so dass alle 60 s die gleiche Belichtungszeit verwendet wird (10x Objektiv, Cy3-Filter, $\lambda_{\text{Exc}} = 530\text{-}550$ nm / $\lambda_{\text{Em}} = 575\text{-}625$ nm). Aus den so erhaltenen stufenförmigen Kurven wurden von den jeweils letzten 10 Messwerten (10 min einer Stufe von 30 min) die Mittelwerte bestimmt und in Abbildung 86 (S. 233) gegen die Resorufinkonzentration aufgetragen. Durch lineare Regression mit Origin 8 wurden Steigung und y-Achsenabschnitt bestimmt, die dann als Kalibriergeraden für die Berechnung der Resorufinkonzentration aus beliebigen Fluoreszenzintensitäten dienten.

Dabei war zu beachten, dass die Mikroskopsoftware überstrahlten Pixeln den Maximalwert des 12 Bit TIF Formats von 4095 zuordnet. Wenn mehr als 10 % der Pixel überstrahlt sind, weicht die mittlere Signalintensität signifikant nach unten ab, deshalb konnten mit 10 bzw. 20 ms Belichtungszeit die hohen Resorufinkonzentrationen nicht ausgewertet werden. Die Kalibrierkurven zeigen einen guten linearen Zusammenhang bis ca. 75 μM Resorufin. Die Kalibrierkurven wurden alle 3 Monate neu gemessen.

Tabelle 20: Flussratenprofil zur Aufnahme der Kalibrierkurve. Die Resorufinkonzentration der Lösung wurde über ein Y-Stück aus zwei Spritzen mit KPi300 bzw. 75 μM Resorufin in KPi300 gemischt.

t / min	$Q_{\text{Resorufin}} / \mu\text{L/min}$	$Q_{\text{Puffer}} / \mu\text{L/min}$	Anteil Resorufin	$c(\text{Resorufin}) / \mu\text{M}$
10	0,75	0,75	50 %	37,5
30	1,6	-0,1	100 %	75
30	1,2	0,3	80 %	60
30	0,9	0,6	60 %	45
30	0,6	0,9	40 %	30
30	0,3	1,2	20 %	15
30	0,15	1,35	10 %	7,5
30	0,075	1,425	5 %	3,75
30	-0,1	1,6	0 %	0
30	0,075	1,425	5 %	3,75
30	0,15	1,35	10 %	7,5
30	0,3	1,2	20 %	15
30	0,6	0,9	40 %	30
30	0,9	0,6	60 %	45
30	1,2	0,3	80 %	60
60	1,6	-0,1	100 %	75

5 Literatur

1. Agapakis, C.M., Boyle, P.M. und Silver, P.A., *Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology*. Nat. Chem. Biol., 2012. **8**(6): S. 527-535.
2. Reed, L.J., *Multienzyme complexes*. Acc. Chem. Res., 1974. **7**(2): S. 40-46.
3. Rock, C.O. und Jackowski, S., *Forty years of bacterial fatty acid synthesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002. **292**(5): S. 1155-66.
4. Fischbach, M.A. und Walsh, C.T., *Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms*. Chem Rev, 2006. **106**(8): S. 3468-96.
5. Weissman, K.J. und Muller, R., *Protein-protein interactions in multienzyme megasynthetases*. Chembiochem, 2008. **9**(6): S. 826-48.
6. Vance, S., Tkachenko, O., Thomas, B., Bassuni, M., Hong, H., Nietlispach, D. und Broadhurst, W., *Sticky swinging arm dynamics: studies of an acyl carrier protein domain from the mycolactone polyketide synthase*. Biochem J, 2016. **473**(8): S. 1097-110.
7. Sherman, D.H., *The Lego-ization of polyketide biosynthesis*. Nat Biotech, 2005. **23**(9): S. 1083-1084.
8. Lehninger, A., Nelson, D. und Cox, M., *Principles of Biochemistry* 2008: W. H. Freeman.
9. Petsko, G.A., Ringe, D., *Protein Structure and Function* 2004: New Science Press. 195.
10. Hyde, C.C., Ahmed, S.A., Padlan, E.A., Miles, E.W. und Davies, D.R., *Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem., 1988. **263**: S. 17857-17871.
11. Anderson, K.S., Miles, E.W. und Johnson, K.A., *Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase - a novel intersubunit triggering mechanism*. J. Biol. Chem., 1991. **266**: S. 8020-8033.
12. Dunn, M.F., *The tryptophan synthase bienzyme complex transfers indole between the alpha-sites and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel*. Biochemistry, 1990. **29**: S. 8598-8607.
13. Srere, P.A., *Complexes of sequential metabolic enzymes*. Annu. Rev. Biochem., 1987. **56**: S. 89-124.
14. Huang, X.Y., Holden, H.M. und Raushel, F.M., *Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions*. Annu. Rev. Biochem., 2001. **70**: S. 149-180.
15. Spivey, H.O. und Ovadi, J., *Substrate channeling*. Methods, 1999. **19**: S. 306-321.
16. Idan, O. und Hess, H., *Origins of activity enhancement in enzyme cascades on scaffolds*. ACS Nano, 2013. **7**: S. 8658-8665.
17. Castellana, M., Wilson, M.Z., Xu, Y., Joshi, P., Cristea, I.M., Rabinowitz, J.D., Gitai, Z. und Wingreen, N.S., *Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(10): S. 1011-8.
18. An, S., Kumar, R., Sheets, E.D. und Benkovic, S.J., *Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells*. Science, 2008. **320**(5872): S. 103-6.

19. Wheeldon, I., Minter, S.D., Banta, S., Barton, S.C., Atanassov, P. und Sigman, M., *Substrate channelling as an approach to cascade reactions*. Nat. Chem., 2016. **8**(4): S. 299-309.
20. Chen, A.H. und Silver, P.A., *Designing biological compartmentalization*. Trends Cell Biol., 2012. **22**(12): S. 662-670.
21. Bülow, L. und Mosbach, K., *Multi-enzyme systems obtained by gene fusion*. Trends Biotechnol., 1991. **9**(1): S. 226-231.
22. Pettersson, H. und Pettersson, G., *Kinetics of the coupled reaction catalysed by a fusion protein of beta-galactosidase and galactose dehydrogenase*. Biochim. Biophys. Acta, 2001. **1549**: S. 155-160.
23. Zhang, Y., Tsitkov, S. und Hess, H., *Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade*. Nat. Commun., 2016. **7**: S. 13982.
24. Conrado, R.J., Varner, J.D. und DeLisa, M.P., *Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy*. Curr. Opin. Biotechnol., 2008. **19**(5): S. 492-9.
25. Schoffelen, S. und van Hest, J.C.M., *Multi-enzyme systems: bringing enzymes together in vitro*. Soft Matter, 2012. **8**(6): S. 1736-1746.
26. Rabe, K.S., Müller, J., Skoupi, M. und Niemeyer, C.M. *Cascades in Compartments: En route to Machine-Assisted Biotechnology*. Angew. Chem., Int. Ed., in press. DOI: 10.1002/anie.201703806.
27. Feldkamp, U., Schroeder, H. und Niemeyer, C.M., *Design and evaluation of single-stranded DNA carrier molecules for DNA-directed assembly*. J Biomol Struct Dyn, 2006. **23**(6): S. 657-66.
28. Niemeyer, C.M., Sano, T., Smith, C.L. und Cantor, C.R., *Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA--streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(25): S. 5530-9.
29. Niemeyer, C.M., Boldt, L., Ceyhan, B. und Blohm, D., *DNA-Directed immobilization: efficient, reversible, and site-selective surface binding of proteins by means of covalent DNA-streptavidin conjugates*. Anal Biochem, 1999. **268**(1): S. 54-63.
30. Meyer, R., Giselsbrecht, S., Rapp, B.E., Hirtz, M. und Niemeyer, C.M., *Advances in DNA-directed immobilization*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2014. **18**: S. 8-15.
31. Niemeyer, C.M., *Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2000. **4**(6): S. 609-18.
32. Niemeyer, C.M., Koehler, J. und Wuerdemann, C., *DNA-directed assembly of bienzymic complexes from in vivo biotinylated NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase*. ChemBiochem, 2002. **3**(2-3): S. 242-5.
33. Wilner, O.I., Shimron, S., Weizmann, Y., Wang, Z.G. und Willner, I., *Self-assembly of enzymes on DNA scaffolds: en route to biocatalytic cascades and the synthesis of metallic nanowires*. Nano letters, 2009. **9**(5): S. 2040-3.
34. Fu, J., Liu, M., Liu, Y., Woodbury, N.W. und Yan, H., *Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures*. J. Am. Chem. Soc., 2012. **134**(12): S. 5516-9.

35. Wilner, O.I., Weizmann, Y., Gill, R., Lioubashevski, O., Freeman, R. und Willner, I., *Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds*. Nat. Nanotechnol., 2009. **4**(4): S. 249-54.
36. Rothemund, P.W., *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. **440**(7082): S. 297-302.
37. Rajendran, A., Nakata, E., Nakano, S. und Morii, T., *Nucleic-Acid-Templated Enzyme Cascades*. Chembiochem, 2017. **18**(8): S. 696-716.
38. Grotzky, A., Nauser, T., Erdogan, H., Schluter, A.D. und Walde, P., *A fluorescently labeled dendronized polymer-enzyme conjugate carrying multiple copies of two different types of active enzymes*. J. Am. Chem. Soc., 2012. **134**(28): S. 11392-5.
39. Fessner, W.D., *Systems Biocatalysis: Development and engineering of cell-free "artificial metabolisms" for preparative multi-enzymatic synthesis*. N Biotechnol, 2015. **32**(6): S. 658-64.
40. Ley, S.V., Fitzpatrick, D.E., Myers, R.M., Battilocchio, C. und Ingham, R.J., *Machine-Assisted Organic Synthesis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(35): S. 10122-36.
41. Ley, S.V., Fitzpatrick, D.E., Ingham, R.J. und Myers, R.M., *Organic synthesis: march of the machines*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(11): S. 3449-64.
42. Nguyen, N.-T., *Mikrofluidik - Entwurf, Herstellung und Charakterisierung* 2004, Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag. 256.
43. Juncker, D., Schmid, H., Drechsler, U., Wolf, H., Wolf, M., Michel, B., de Rooij, N. und Delamarche, E., *Autonomous Microfluidic Capillary System*. Anal. Chem., 2002. **74**(24): S. 6139-6144.
44. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): S. 368-373.
45. Hessel, V., Löwe, H. und Schönfeld, F., *Micromixers—a review on passive and active mixing principles*. Chem. Eng. Sci., 2005. **60**(8): S. 2479-2501.
46. Zhang, J., Wang, K., Teixeira, A.R., Jensen, K.F. und Luo, G., *Design and Scaling Up of Microchemical Systems: A Review*. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2017. **8**: S. 285-305.
47. Li, L., Gattass, R.R., Gershgoren, E., Hwang, H. und Fourkas, J.T., *Achieving lambda/20 resolution by one-color initiation and deactivation of polymerization*. Science, 2009. **324**(5929): S. 910-3.
48. Xia, Y. und Whitesides, G.M., *Soft Lithography*. Angew Chem Int Ed, 1998. **37**(5): S. 550-575.
49. Unger, M.A., Chou, H.P., Thorsen, T., Scherer, A. und Quake, S.R., *Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*. Science, 2000. **288**(5463): S. 113-6.
50. Gai, H., Li, Y. und Yeung, E.S., *Optical detection systems on microfluidic chips*. Top Curr Chem, 2011. **304**: S. 171-201.
51. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. und Zengerle, R., *Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications*. Chem Soc Rev, 2010. **39**(3): S. 1153-82.
52. Roman, G.T. und Kennedy, R.T., *Fully integrated microfluidic separations systems for biochemical analysis*. J. Chrom. A, , 2007. **1168**(1-2): S. 170-88; discussion 169.

53. Oosthoek-de Vries, A.J., Bart, J., Tiggelaar, R.M., Janssen, J.W., van Bentum, P.J., Gardeniers, H.J. und Kentgens, A.P., *Continuous Flow 1H and 13C NMR Spectroscopy in Microfluidic Stripline NMR Chips*. *Anal Chem*, 2017. **89**(4): S. 2296-2303.
54. Neuzi, P., Giselbrecht, S., Lange, K., Huang, T.J. und Manz, A., *Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(8): S. 620-32.
55. Guzik, U., Hupert-Kocurek, K. und Wojcieszynska, D., *Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases*. *Molecules*, 2014. **19**(7): S. 8995-9018.
56. Kim, D. und Herr, A.E., *Protein immobilization techniques for microfluidic assays*. *Biomicrofluidics*, 2013. **7**(1932-1058 (Linking)).
57. Mross, S., Pierrat, S., Zimmermann, T. und Kraft, M., *Microfluidic enzymatic biosensing systems: A review*. *Biosens Bioelectron*, 2015. **70**: S. 376-91.
58. Jang, E. und Koh, W.-G., *Multiplexed enzyme-based bioassay within microfluidic devices using shape-coded hydrogel microparticles*. *Sens Actuator B Chem*, 2010. **143**(2): S. 681-688.
59. Ji, Q., Wang, B., Tan, J., Zhu, L. und Li, L., *Immobilized multienzymatic systems for catalysis of cascade reactions*. *Process Biochem*, 2016. **51**(9): S. 1193-1203.
60. Mahdizadeh, F. und Eskandarian, M., *Glucose oxidase and catalase co-immobilization on biosynthesized nanoporous SiO₂ for removal of dissolved oxygen in water: Corrosion controlling of boilers*. *J Ind Eng Chem*, 2014. **20**(4): S. 2378-2383.
61. Qiu, H., Li, Y., Ji, G., Zhou, G., Huang, X., Qu, Y. und Gao, P., *Immobilization of lignin peroxidase on nanoporous gold: enzymatic properties and in situ release of H₂O₂ by co-immobilized glucose oxidase*. *Bioresour Technol*, 2009. **100**(17): S. 3837-42.
62. Luo, J., Meyer, A.S., Mateiu, R.V. und Pinelo, M., *Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol*. *N Biotechnol*, 2015. **32**(3): S. 319-27.
63. Logan, T.C., Clark, D.S., Stachowiak, T.B., Svec, F. und Frechet, J.M., *Photopatterning enzymes on polymer monoliths in microfluidic devices for steady-state kinetic analysis and spatially separated multi-enzyme reactions*. *Anal Chem*, 2007. **79**(17): S. 6592-8.
64. Fornera, S., Kuhn, P., Lombardi, D., Schlüter, A.D., Dittrich, P.S. und Walde, P., *Sequential Immobilization of Enzymes in Microfluidic Channels for Cascade Reactions*. *ChemPlusChem*, 2012. **77**(2): S. 98-101.
65. Lee, M.Y., Srinivasan, A., Ku, B. und Dordick, J.S., *Multienzyme catalysis in microfluidic biochips*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003. **83**(1): S. 20-8.
66. Luckarift, H.R., Ku, B.S., Dordick, J.S. und Spain, J.C., *Silica-immobilized enzymes for multi-step synthesis in microfluidic devices*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007. **98**(3): S. 701-5.
67. Holden, M.A., Jung, S.Y. und Cremer, P.S., *Patterning enzymes inside microfluidic channels via photoattachment chemistry*. *Anal Chem*, 2004. **76**(7): S. 1838-43.
68. Matosevic, S., Lye, G.J. und Baganz, F., *Immobilised enzyme microreactor for screening of multi-step bioconversions: characterisation of a de novo transketolase-*

- omega-transaminase pathway to synthesise chiral amino alcohols*. Journal of biotechnology, 2011. **155**(3): S. 320-9.
69. Seong, G.H. und Crooks, R.M., *Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(45): S. 13360-1.
70. Heo, J., *Spatial distance effect of bienzymes on the efficiency of sequential reactions in a microfluidic reactor packed with enzyme-immobilized microbeads*. Anal Sci, 2014. **30**(10): S. 991-7.
71. Kampe, T., Konig, A., Schroeder, H., Hengstler, J.G. und Niemeyer, C.M., *Modular microfluidic system for emulation of human phase I/phase II metabolism*. Anal Chem, 2014. **86**(6): S. 3068-74.
72. Schroder, H., Hoffmann, L., Muller, J., Alhorn, P., Flegler, M., Neyer, A. und Niemeyer, C.M., *Addressable microfluidic polymer chip for DNA-directed immobilization of oligonucleotide-tagged compounds*. Small, 2009. **5**(13): S. 1547-52.
73. Vong, T., Schoffelen, S., van Dongen, S.F.M., van Beek, T.A., Zuilhof, H. und van Hest, J.C.M., *A DNA-based strategy for dynamic positional enzyme immobilization inside fused silica microchannels*. Chemical Science, 2011. **2**(7): S. 1278-1285.
74. Zhan, W., Seong, G.H. und Crooks, R.M., *Hydrogel-based microreactors as a functional component of microfluidic systems*. Anal Chem, 2002. **74**(18): S. 4647-52.
75. Kim, D.N., Lee, Y. und Koh, W.-G., *Fabrication of microfluidic devices incorporating bead-based reaction and microarray-based detection system for enzymatic assay*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009. **137**(1): S. 305-312.
76. Choi, D., Jang, E., Park, J. und Koh, W.-G., *Development of microfluidic devices incorporating non-spherical hydrogel microparticles for protein-based bioassay*. Microfluid Nanofluidics, 2008. **5**(5): S. 703.
77. Halim, A.A., Szita, N. und Baganz, F., *Characterization and multi-step transketolase-omega-transaminase bioconversions in an immobilized enzyme microreactor (IEMR) with packed tube*. J. Biotechnol., 2013. **168**(4): S. 567-75.
78. Müller, D., *Oxidation von Glukose mit Extrakten aus Aspergillus niger*. Biochemische Zeitschrift, 1928: S. 199.
79. Hayashi, S. und Nakamura, S., *Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions*. Biochim Biophys Acta, 1981. **657**(1): S. 40-51.
80. Swoboda, B.E. und Massey, V., *Purification an properties of the Glucose Oxidase from Aspergillus Niger*. J Biol Chem, 1965. **240**: S. 2209-15.
81. Ferri, S., Kojima, K. und Sode, K., *Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes*. J Diabetes Sci Technol, 2011. **5**(5): S. 1068-76.
82. Ghassemi, Z. und Slaughter, G., *Biological Fuel Cells and Membranes*. Membranes (Basel), 2017. **7**(1).
83. Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. und Hecht, H.J., *1.8 and 1.9 A resolution structures of the Penicillium amagasakiense and Aspergillus niger glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 5): S. 969-77.

84. Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A. und Hajdu, J., *The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution*. Nature, 2002. **417**(6887): S. 463-8.
85. Bach, A.N.C., R., *Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Über Peroxydase*. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1903. **36**: S. 600-5.
86. Dunford, H.B. und Stillman, J.S., *On the function and mechanism of action of peroxidases*. Coord. Chem. Rev., 1976. **19**: S. 187-251.
87. Welinder, K.G., *Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase*. Eur J Biochem, 1985. **151**(3): S. 497-504.
88. Haschke, R.H. und Friedhoff, J.M., *Calcium-related properties of horseradish peroxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **80**(4): S. 1039-42.
89. Shiro, Y., Kurono, M. und Morishima, I., *Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase*. J Biol Chem, 1986. **261**(20): S. 9382-90.
90. Mauk, M.R.G., A. W. , *The protoporphyrin-apoperoxidase complex. Photooxidation studies*. Biochemistry, 1974. **13**: S. 1757-1763.
91. Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T. und Poulos, T.L., *Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(12): S. 1032-8.
92. Lopes, G.R., Pinto, D.C.G.A. und Silva, A.M.S., *Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry*. RSC Advances, 2014. **4**(70): S. 37244-37265.
93. Zhang, W. und Li, G., *Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins*. Anal Sci, 2004. **20**(4): S. 603-9.
94. Krainer, F.W. und Glieder, A., *An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015. **99**: S. 1611-1625.
95. Niemeyer, C.M., *The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(9): S. 395-401.
96. Müller, J., *Untersuchungen zur Aktivität halbsynthetischer Häm-Enzyme*. Diplomarbeit 2005, Universität Dortmund
97. Feldkamp, U., Wacker, R., Schroeder, H., Banzhaf, W. und Niemeyer, C.M., *Microarray-based in vitro evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico*. Chemphyschem, 2004. **5**(3): S. 367-72.
98. Wong, C.M., Wong, K.H. und Chen, X.D., *Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008. **78**(6): S. 927-38.
99. Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J. und D'Cunha, G.B., *Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(15): S. 8471-6.
100. Fruk, L., Muller, J. und Niemeyer, C.M., *Kinetic analysis of semisynthetic peroxidase enzymes containing a covalent DNA-heme adduct as the cofactor*. Chemistry, 2006. **12**(28): S. 7448-57.
101. Dunford, H.B., *Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties*. Peroxidases in Chemistry and Biology, ed. J. Everse, K.E. Everse und M.B. Grisham. Vol. 2. 1991, Boca Raton, Florida: CRC Press. 1-24.

102. Dunford, H.B., *Heme Peroxidases* 1999, New York: Wiley-VCH.
103. Childs, R.E. und Bardsley, W.G., *The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen*. *Biochem J*, 1975. **145**(1): S. 93-103.
104. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. und Haugland, R.P., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. *Anal Biochem*, 1997. **253**(2): S. 162-8.
105. Brotea, G.P. und Thibert, R.J., *Fluorometric determination of hydrogen peroxide using resorufin and peroxidase*. *Microchem J*, 1988. **37**(3): S. 368-76.
106. Gorris, H.H. und Walt, D.R., *Mechanistic aspects of horseradish peroxidase elucidated through single-molecule studies*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(17): S. 6277-82.
107. Debski, D., Smulik, R., Zielonka, J., Michalowski, B., Jakubowska, M., Debowska, K., Adamus, J., Marcinek, A., Kalyanaraman, B. und Sikora, A., *Mechanism of oxidative conversion of Amplex(R) Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies*. *Free Radic. Biol. Med*, 2016. **95**: S. 323-32.
108. Michaelis, I.M., M. L., *Die Kinetik der Invertinwirkung*. *Biochem. Z.*, 1913. **49**: S. 333-69.
109. Bisswanger, H., *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*. 3. Auflage ed2000, Weinheim: Wiley-VCH.
110. Glettenberg, M. und Niemeyer, C.M., *Tuning of peroxidase activity by covalently tethered DNA oligonucleotides*. *Bioconjug Chem*, 2009. **20**(5): S. 969-75.
111. Rho, H.S., Hanke, A.T., Ottens, M. und Gardeniers, H., *Mapping of Enzyme Kinetics on a Microfluidic Device*. *PloS one*, 2016. **11**(4): S. e0153437.
112. Seong, G.H., Heo, J. und Crooks, R.M., *Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system*. *Anal Chem*, 2003. **75**(13): S. 3161-7.
113. Bright, H.J.P., D.J.T., *Flavoprotein oxidases*, in *The enzymes*, 3rd edition, P.D. Boyer, Editor 1975, Academic Press: New York. S. 421-505.
114. Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J. und Pericin, D., *Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors*. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2005. **37**(4): S. 731-50.
115. Tippkötter, N., *Reaktionssysteme zur Aufarbeitung und Umsetzung nachwachsender Rohstoffe. Einsatz chromatographischer Verfahren sowie Membran- und Festbettreaktoren zur Verarbeitung von Molke, Stärke und Cellulose*. Dissertation 2010, TU Kaiserslautern
116. Hayashi, S. und Nakamura, S., *Comparison of fungal glucose oxidases. Chemical, physicochemical and immunological studies*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **438**(1): S. 37-48.
117. Karmali, K., Karmali, A., Teixeira, A. und Curto, M.J., *Assay for glucose oxidase from Aspergillus niger and Penicillium amagasakiense by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Anal. Biochem.*, 2004. **333**(2): S. 320-7.
118. Bergmayer, H.U., *Glucose oxidase: assay method*, in *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmayer, Editor 1974, Academic Press: New York. S. 457-60.

119. Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. und Salemme, F.R., *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science, 1989. **243**(4887): S. 85-8.
120. Niemeyer, C.M., Boldt, L., Ceyhan, B. und Blohm, D., *Evaluation of single-stranded nucleic acids as carriers in the DNA-directed assembly of macromolecules*. J Biomol Struct Dyn, 1999. **17**(3): S. 527-38.
121. Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, A.P., Simmel, F.C. und Neumann, J.L., *A DNA-fuelled molecular machine made of DNA*. Nature, 2000. **406**(6796): S. 605-608.
122. Wedler, G., *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 5. Auflage ed2004, Weinheim: Wiley-VCH.
123. Pescador, P., Katakis, I., Toca-Herrera, J.L. und Donath, E., *Efficiency of a bienzyme sequential reaction system immobilized on polyelectrolyte multilayer-coated colloids*. Langmuir, 2008. **24**(24): S. 14108-14.
124. Poshyvailo, L., von Lieres, E. und Kondrat, S., *Does metabolite channeling accelerate enzyme-catalyzed cascade reactions?* PLoS One, 2017. **12**(2): S. e0172673.
125. Roberts, C.C. und Chang, C.E., *Modeling of enhanced catalysis in multienzyme nanostructures: effect of molecular scaffolds, spatial organization, and concentration*. J Chem Theory Comput, 2015. **11**(1): S. 286-92.
126. Sanz, V., de Marcos, S., Castillo, J.R. und Galbán, J., *Application of Molecular Absorption Properties of Horseradish Peroxidase for Self-Indicating Enzymatic Interactions and Analytical Methods*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(3): S. 1038-1048.
127. Schonbaum, G.R. und Lo, S., *Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): S. 3353-60.
128. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): S. 265-75.
129. Erickson, H.P., *Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy*. Biol Proced Online, 2009. **11**: S. 32-51.
130. Jo, B.-H.V.L., L.M.; Motsegood, K.M.; Beebe, D.J., *Three-dimensional micro-channel fabrication in Polydimethyl-Siloxane (PDMS) elastomer*. J. Microelectromech. Syst. , 2000. **9**(1): S. 76-81.
131. Münster, R., Mierka, O., Platte, F. und Turek, S., *CFD Simulationen*. unveröffentlichte Daten, 2011.
132. Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A., Varon, R. und Garcia-Canovas, F., *A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1041**(1): S. 43-7.
133. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp22188.pdf>. [abgerufen 2017 22.7.].
134. Zhao, B., Summers, F.A. und Mason, R.P., *Photooxidation of Amplex red to resorufin: Implications of exposing the Amplex red assay to light*. Free Radic. Biol. Med., 2012. **53**(5): S. 1080-1087.
135. Summers, F.A., Zhao, B., Ganini, D. und Mason, R.P., *Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light*. Methods Enzymol, 2013. **526**: S. 1-17.

136. Schoenitz, M., Grundemann, L., Augustin, W. und Scholl, S., *Fouling in microstructured devices: a review*. Chem Commun (Camb), 2015. **51**(39): S. 8213-28.
137. Peus, D., Meves, A., Vasa, R.A., Beyerle, A., O'Brien, T. und Pittelkow, M.R., *H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation*. Free Radic. Biol. Med., 1999. **27**(11-12): S. 1197-202.
138. Lilly, M.D., Hornby, W.E. und Crook, E.M., *The kinetics of carboxymethylcellulose--ficin in packed beds*. Biochem J, 1966. **100**(3): S. 718-23.
139. Kerby, M.B., Legge, R.S. und Tripathi, A., *Measurements of kinetic parameters in a microfluidic reactor*. Anal Chem, 2006. **78**(24): S. 8273-80.
140. <http://www.chemie-master.de/pse/pse.php?modul=tab13>. [abgerufen 2017 23.7.].
141. Markov, D.A., Lillie, E.M., Garbett, S.P. und McCawley, L.J., *Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions*. Biomed Microdevices, 2014. **16**(1): S. 91-6.
142. Tanaka, Y., Slyadnev, M.N., Sato, K., Tokeshi, M., Kim, H.B. und Kitamori, T., *Acceleration of an enzymatic reaction in a microchip*. Anal Sci, 2001. **17**(7): S. 809-10.
143. Yamashita, K., Miyazaki, M., Nakamura, H. und Maeda, H., *Nonimmobilized enzyme kinetics that rely on laminar flow*. J Phys Chem A, 2009. **113**(1): S. 165-9.
144. Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. und Massey, V., *Kinetics and mechanism of action of Glucose Oxidase*. J Biol Chem, 1964. **239**: S. 3927-34.
145. Liu, A.L., Zhou, T., He, F.Y., Xu, J.J., Lu, Y., Chen, H.Y. und Xia, X.H., *Off-line form of the Michaelis-Menten equation for studying the reaction kinetics in a polymer microchip integrated with enzyme microreactor*. Lab chip, 2006. **6**(6): S. 811-8.
146. Li, S.-J., Wang, C., Wu, Z.-Q., Xu, J.-J., Xia, X.-H. und Chen, H.-Y., *Real-Time Monitoring of Mass-Transport-Related Enzymatic Reaction Kinetics in a Nanochannel-Array Reactor*. Chem. Eur. J., 2010. **16**(33): S. 10186-10194.
147. He, P., Greenway, G. und Haswell, S.J., *Development of enzyme immobilized monolith micro-reactors integrated with microfluidic electrochemical cell for the evaluation of enzyme kinetics*. Microfluid Nanofluidics, 2010. **8**(5): S. 565-573.
148. Guiseppi-Elie, A., Sheppard, N.F., Jr., Brahim, S. und Narinesingh, D., *Enzyme microgels in packed-bed bioreactors with downstream amperometric detection using microfabricated interdigitated microsensor electrode arrays*. Biotechnol. Bioeng., 2001. **75**(4): S. 475-84.
149. Wang, C., Li, S.J., Wu, Z.Q., Xu, J.J., Chen, H.Y. und Xia, X.H., *Study on the kinetics of homogeneous enzyme reactions in a micro/nanofluidics device*. Lab chip, 2010. **10**(5): S. 639-46.
150. Brahim, S., Narinesingh, D. und Guiseppi-Elie, A., *Kinetics of glucose oxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor*. J. Mol. Catal. B: Enzym, 2002. **18**(1): S. 69-80.
151. Shu, F.R. und Wilson, G.S., *Rotating ring-disk enzyme electrode for surface catalysis studies*. Anal Chem, 1976. **48**(12): S. 1679-86.
152. Matosevic, S., Szita, N. und Baganz, F., *Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2011. **86**(3): S. 325-334.

153. Gambin, Y., Simonnet, C., VanDelinder, V., Deniz, A. und Groisman, A., *Ultrafast microfluidic mixer with three-dimensional flow focusing for studies of biochemical kinetics*. Lab chip, 2010. **10**(5): S. 598-609.
154. Burke, K.S., Parul, D., Reddish, M.J. und Dyer, R.B., *A simple three-dimensional-focusing, continuous-flow mixer for the study of fast protein dynamics*. Lab chip, 2013. **13**(15): S. 2912-2921.
155. Xie, Y., Ahmed, D., Lapsley, M.I., Lin, S.-C.S., Nawaz, A.A., Wang, L. und Huang, T.J., *Single-Shot Characterization of Enzymatic Reaction Constants K_m and k_{cat} by an Acoustic-Driven, Bubble-Based Fast Micromixer*. Anal Chem, 2012. **84**(17): S. 7495-7501.
156. Bishop, D.P., Blanes, L., Wilson, A.B., Wilbanks, T., Killeen, K., Grimm, R., Wenzel, R., Major, D., Macka, M., Clarke, D., Schmid, R., Cole, N. und Doble, P.A., *Microfluidic high performance liquid chromatography-chip hyphenation to inductively coupled plasma-mass spectrometry*. J. Chrom. A., 2017. **1497**: S. 64-69.
157. Liuni, P., Rob, T. und Wilson, D.J., *A microfluidic reactor for rapid, low-pressure proteolysis with on-chip electrospray ionization*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 2010. **24**(3): S. 315-20.
158. Dinh, N.D., Chiang, Y.Y., Hardelauf, H., Waide, S., Janasek, D. und West, J., *Preparation of neuronal co-cultures with single cell precision*. J Vis Exp, 2014(87).

6 Anhang

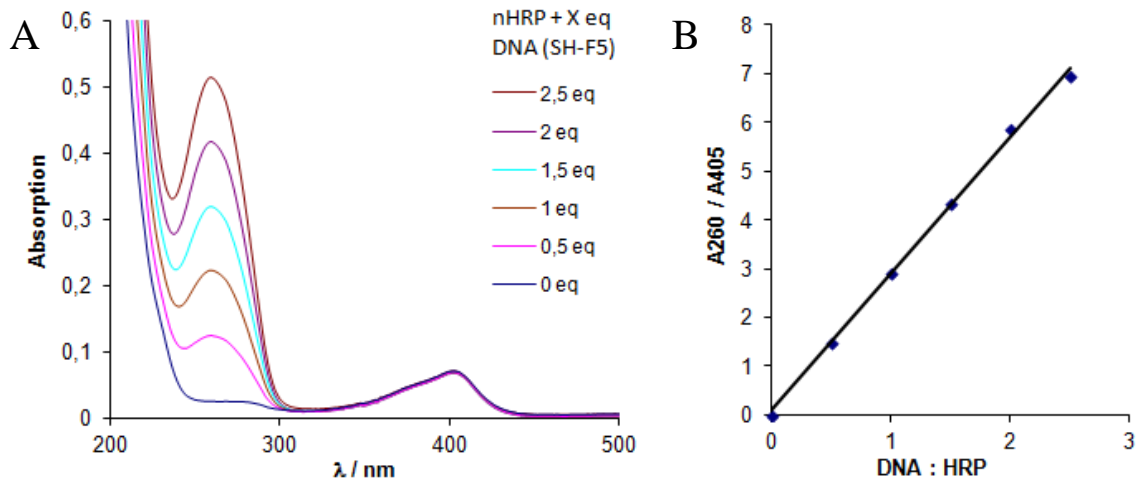


Abbildung 83: Kalibrierkurven zur Bestimmung der Stöchiometrie der DNA-HRP-Konjugate. Eine konstante Menge nativer HRP (nHRP) ($n = 4 \text{ nmol}$ in $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 8 \mu\text{M}$) wurde mit variablen Mengen DNA (SH-F5) gemischt (ohne Reaktion) und die Absorptionsspektren aufgenommen. **A:** Hintergrundkorrigiertes Absorptionsspektrum **B:** Daraus berechnete Kalibrierkurve zur Bestimmung der Stöchiometrie der Konjugate (zu Abschnitt 2.1.1).

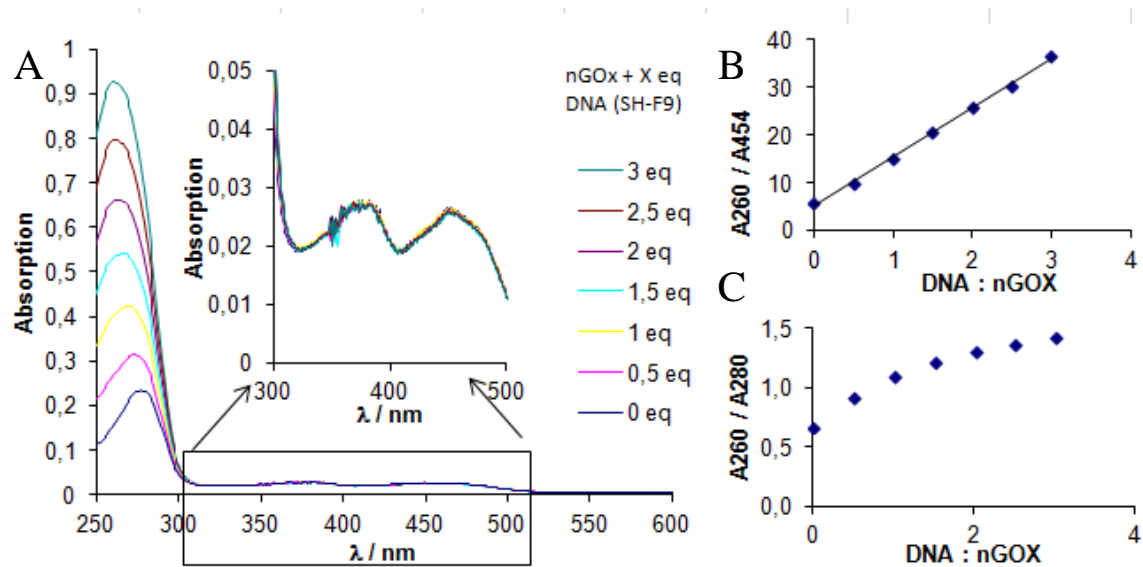


Abbildung 84: Kalibrierkurven zur Bestimmung der Stöchiometrie der DNA-GOX-Konjugate. Eine konstante Menge nativer GOX (nGOX) ($n = 4 \text{ nmol}$ in $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 8 \mu\text{M}$) mit variablen Mengen DNA (SH-F9) gemischt (ohne Reaktion) und die Absorptionsspektren aufgenommen. **A:** Hintergrundkorrigiertes Absorptionsspektrum, der vergrößerte Bereich zeigt die charakteristische Absorption des FAD-Kofaktors. **B und C:** Daraus berechnete Kalibrierkurven zur Bestimmung der Stöchiometrie der Konjugate. Hier wurde auch das Verhältnis A260:A280 aufgetragen, da A454 in den Chromatogrammen nur relativ schwach erkennbar war (zu Abschnitt 2.1.1).

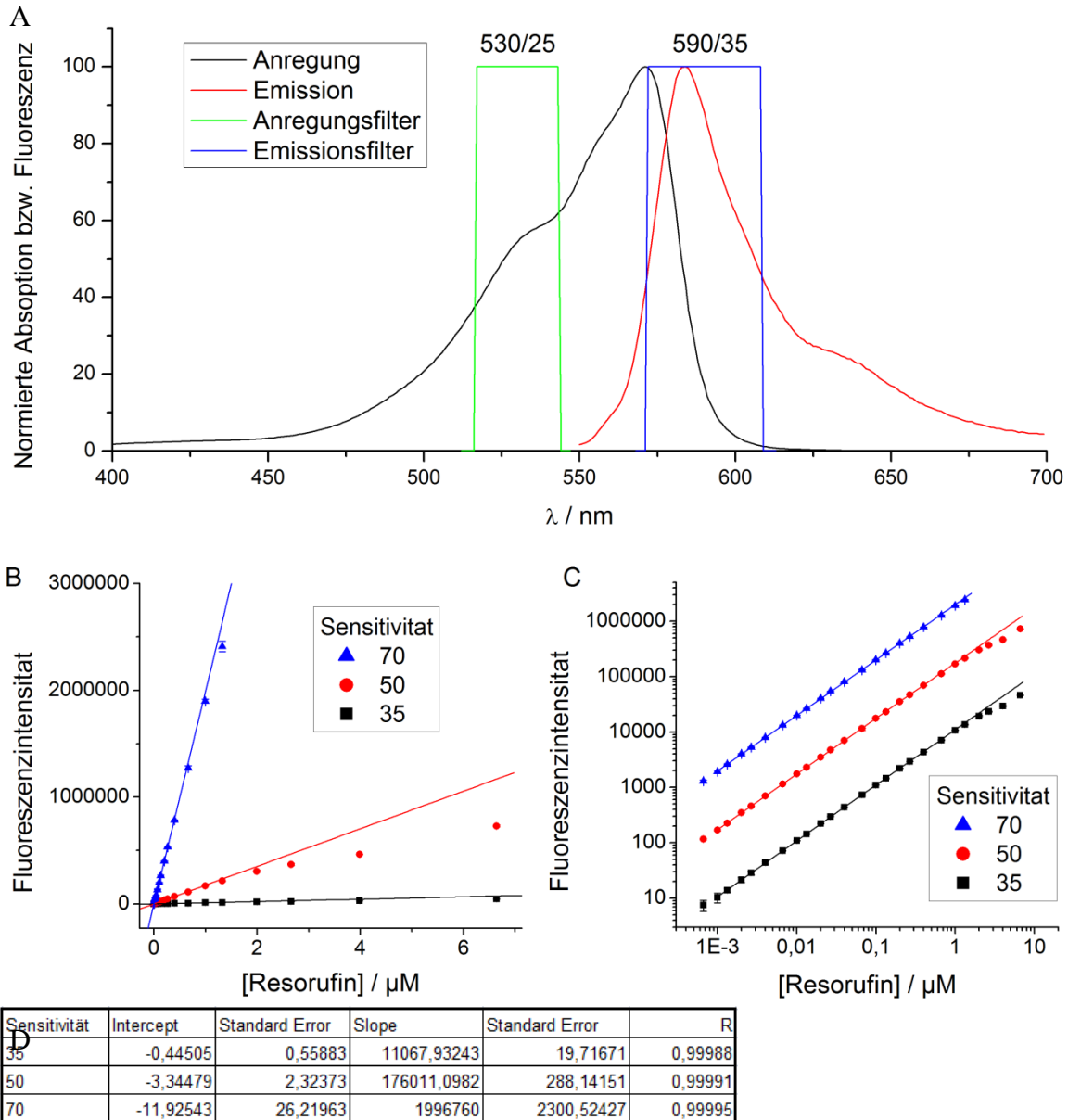


Abbildung 85: Kalibrierkurven für Resorufin im Mikrotiterplattenleser Synergy II. **A:** Anregungs- und Emissionsspektrum des Oxidationsprodukts Resorufin und verwendete Filter im Mikrotiterplattenleser (Synergy II, Biotek). **B:** Auftragung der Fluoreszenzintensität bei drei Sensitivitätseinstellungen gegen die Resorufinkonzentration. **C:** Gleiche Auftragung doppeltlogarithmisch skaliert. **D:** Parameter der linearen Regression. Die Daten für die Kalibrierkurven wurden in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten (NUNC) mit 100 μL pro Vertiefung aufgenommen.

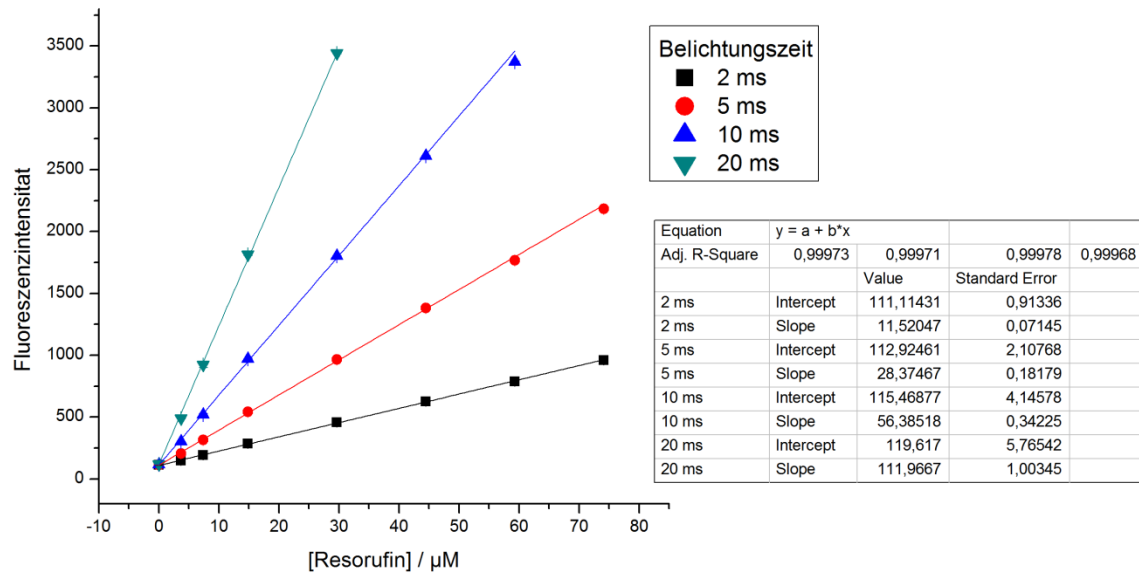


Abbildung 86: Resorufinkalibrierkurven im Fluoreszenzmikroskop. Über ein Y-Stück wurden aus zwei Spritzen mit KPi300BDF mit und ohne Resorufin stufenweise die gewünschten Resorufinkonzentrationen im Reaktor eingestellt. Bei einer Flussrate von $Q = 1,5 \mu\text{L}/\text{min}$ wurde jede Stufe 30 min (45 μL) konstant gehalten. Die Mittelwerte der Fluoreszenz jeder Stufe wurden gegen die zugehörige Konzentration aufgetragen und mit Origin 8 linear gefittet. Die Kalibrierkurven zeigen einen guten linearen Zusammenhang bis ca. 75 μM Resorufin. Die Steigungen und y-Achsenabschnitte sind in der nebenstehenden Tabelle aufgelistet. In einem Kontrollexperiment wurde zusätzlich sichergestellt, dass die Fluoreszenz im Rahmen von $Q = 0 - 5 \mu\text{L}/\text{min}$ nicht von der Flussrate abhängt, Daten nicht gezeigt. Die Kalibrierkurven wurden alle 3 Monate neu gemessen.

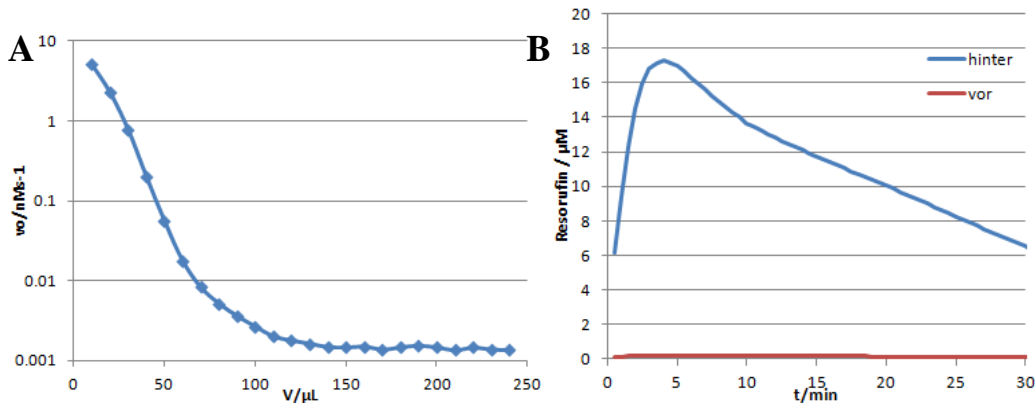


Abbildung 87: Einfluss der Strömung auf das Ausbluten von HRP-beladenen Partikeln auf der Reaktorfritte. **A:** Fraktionen (10 μL) des KPi300 Puffers, der mit $Q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ durch den frisch mit HRP-beladenen Partikeln gefüllten Reaktor gepumpt wurde, wurden in der Mikrotiterplatte gesammelt. Die Aktivität der Fraktionen wurde mit 20 μM Amplex Red und 100 μM H_2O_2 in 100 μL Gesamtvolumen gemessen. **B:** Anschließendes Mikrofluidik Experiment der ausführlich gewaschenen Schüttung mit Substratlösung (20 μM Amplex Red, 50 μM H_2O_2 , $Q = 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$). Die Ergebnisse wurden in Abschnitt 2.5.2 diskutiert.

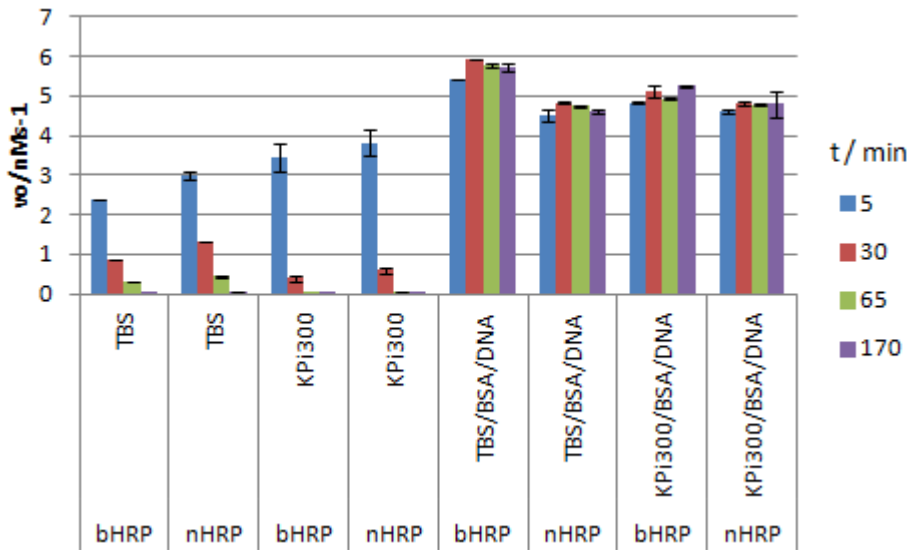


Abbildung 88: Stabilität von HRP in verschiedenen Puffern. Es wurden 0.1 nM nHRP bzw. bHRP in TBS und KPi300 Puffern jeweils mit und ohne Zusatz von je 0,1 mg/mL BSA und HS-DNA in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (5; 3; 65 und 170 min) wurde die Anfangsgeschwindigkeit durch Zugabe von 100 μM H_2O_2 und 20 μM Amplex Red ermittelt. Die Daten zeigen, dass bei Anwesenheit von BSA und HS-DNA keine signifikante Alterung auftritt, vergleiche Abschnitt 2.5.2.

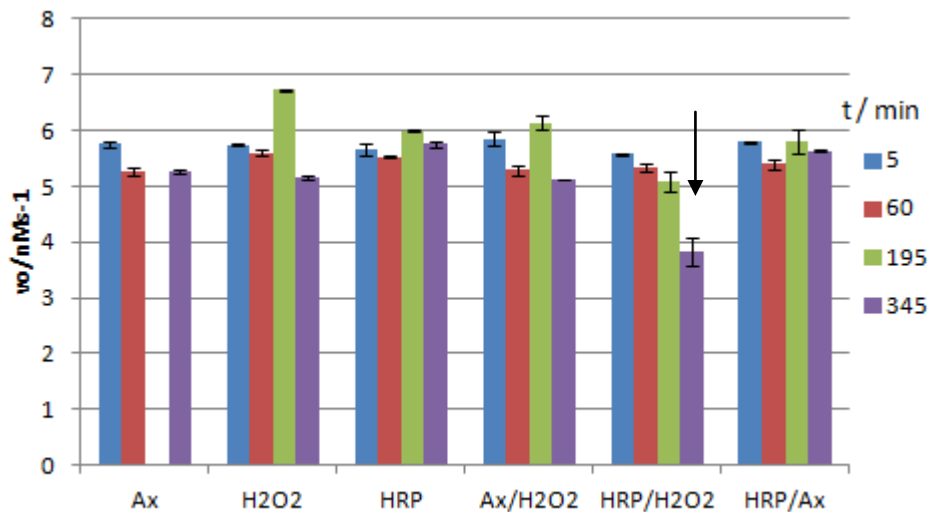


Abbildung 89: Stabilität der Einzelkomponenten (20 μM Amplex Red (Ax), 100 μM H_2O_2 , 0,1 nM bHRP) und deren Kombinationen in KPi300BDF. Nur die Kombination HRP/ H_2O_2 zeigt eine signifikante Abnahme mit der Zeit (markiert durch einen Pfeil). Die Säule bei Ax nach 195 min fehlt, da hier ein Pipettierfehler vorlag. Nach 345 min ist die Aktivität aber noch vorhanden, vergleiche Abschnitt 2.5.2.

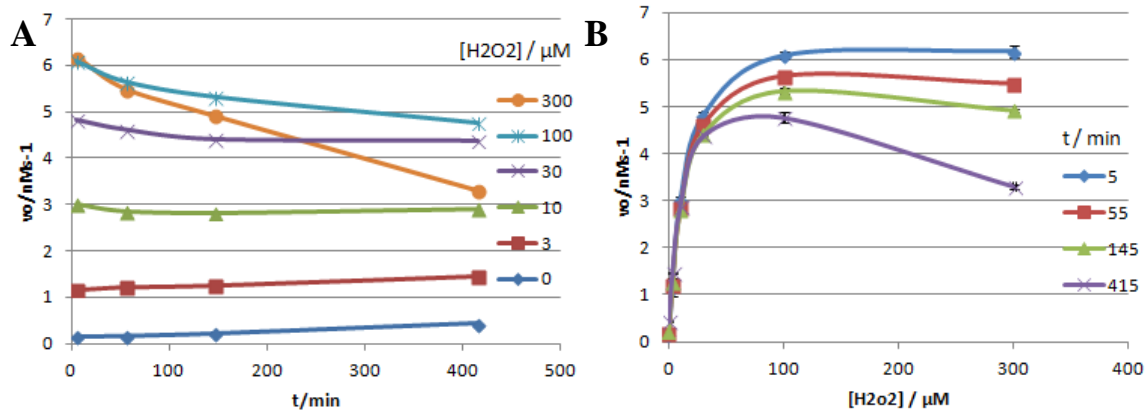


Abbildung 90: Alterung von bHRP durch H_2O_2 . 0.1 nM bHRP wurde mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (0 - 300 μM) in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde durch Zugabe von 20 μM Amplex Red die Anfangsgeschwindigkeit des Enzyms gemessen. **A:** Auftragung gegen die Inkubationszeit, **B:** Auftragung gegen die H_2O_2 -Konzentration. Bei Konzentrationen > 30 μM kam es zu signifikanter Alterung, vergleiche Abschnitt 2.5.2.

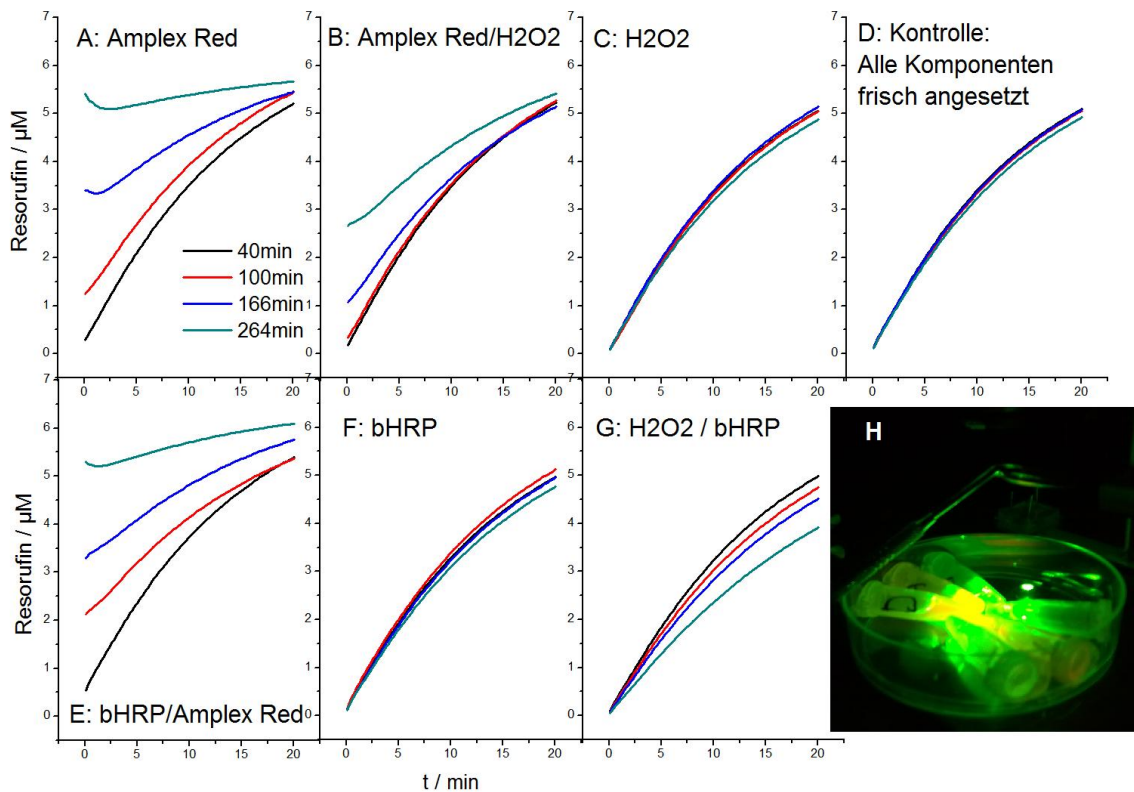


Abbildung 91: Belichtungsstabilität von Amplex Red (20 μM), H_2O_2 (100 μM) und HRP (0,1 nM). Die einzelnen Komponenten (**A**, **C**, **F**) und deren Kombinationen (**B**, **E**, **G**) wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Strahlengang des Mikroskops (**H**) mit dem Cy3-Filter ($\lambda_{\text{Exc}} = 530\text{-}550$ nm) dauerhaft für 2,5 h bestrahlt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots in die Mikrotiterplatte überführt und durch Zugabe der restlichen Komponenten die Aktivitätsmessung gestartet. **D:** Bei der Kontrolle wurden alle Komponenten frisch angesetzt, vergleiche Abschnitt 2.5.2.

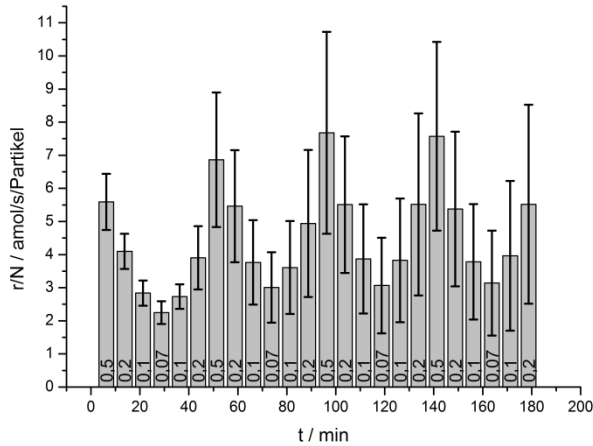


Abbildung 92: Gemittelte normierte Reaktionsraten r/N der Reaktion von HRP-funktionalisierten Partikeln mit Amplex Red, Kontrolle ohne H_2O_2 . Die angegebenen Zahlen entsprechen den Flussraten Q . Zu Abschnitt 2.5.3.3.

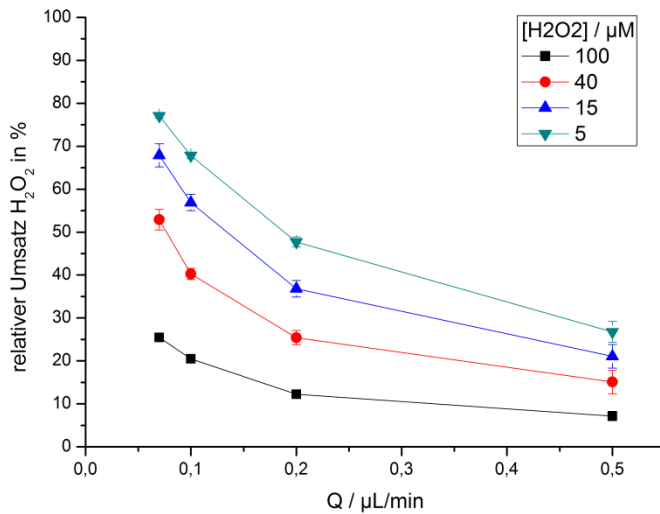


Abbildung 93: Relativer Umsatz bezogen auf das eingesetzte H_2O_2 bei der Mikrofluidik mit bHRP mit 100 μM Amplex Red und variabler H_2O_2 -Konzentration, abgeschätzt für durchschnittlich 500 Partikel. Vergleiche Diskussion in Abschnitt 0.

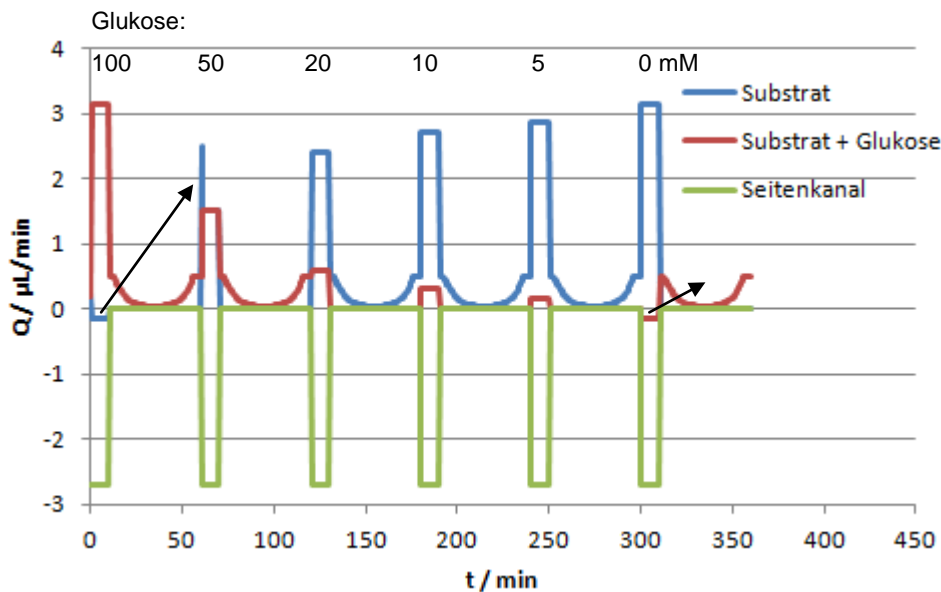


Abbildung 94: Flussratenprofil der Mikrofluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln für die Variation von Konzentration und Flussrate in einem Experiment. Die Glukosekonzentration (100; 50; 20; 10; 5; 0 mM) wird über das Verhältnis der „Substrat“ und „Substrat + Glukose“-Spritze eingestellt. Das Profil setzt sich zusammen aus 10-minütigen Blöcken zum Einstellen der Konzentration ($Q = 3 \mu\text{L}/\text{min}$, $V = 30 \mu\text{L}$) und dazwischenliegenden 50-minütigen Phasen, in denen die Flussrate im Reaktor kontinuierlich variiert wird ($Q = 0,5 - 0,05 - 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$, $V = 9,7 \mu\text{L}$).

Beim Einstellen der Konzentration wird jeweils mit $-2,7 \mu\text{L}/\text{min}$ durch den Seitenkanal S1 abgesaugt. Die daraus resultierende Flussrate im Reaktor beträgt damit nur noch $0,3 \mu\text{L}/\text{min}$ und schont damit die Enzyme. Beim Einstellen von 100 % ($t = 0$) bzw. 0 % Glukose ($t = 300 \text{ min}$) wurde zur Verringerung von Kontaminationen durch Ausbluten am Y-Stück mit der nichtbenötigten Spritze mit 5 % der Flussrate ($Q = -0,15 \mu\text{L}/\text{min}$, $V = 1,5 \mu\text{L}$) abgesaugt. Die Flussrate der anderen Spritze wurde zum Ausgleich um $0,15 \mu\text{L}/\text{min}$ erhöht. Die eingesaugte Lösung wurde im bzw. nach dem anschließenden Zyklus wieder herausgepumpt, so dass die Konzentration am Y-Stück wieder dem Inhalt der Spritze entsprach (verdeutlicht durch die Pfeile in der Abbildung).

Bei der Variation der Flussrate während der Messungen ($t = 10-60 \text{ min}$; $70-120 \text{ min}$ etc.) wurde die in den ca. $12 \mu\text{L}$ Totvolumen eingestellte Konzentration (vergleichbar mit einem „sample loop“) mit variabler Flussrate durch den Reaktor gepumpt. Dazu wurde immer nur eine Pumpe verwendet, da das Pumpenprogramm bei $Q < 0,03 \mu\text{L}/\text{min}$ zu unerwarteten Abbrüchen führte. Dadurch sind die Phasen konstanter Konzentration jedoch auf maximal $12 \mu\text{L}$, besser $10 \mu\text{L}$ beschränkt.

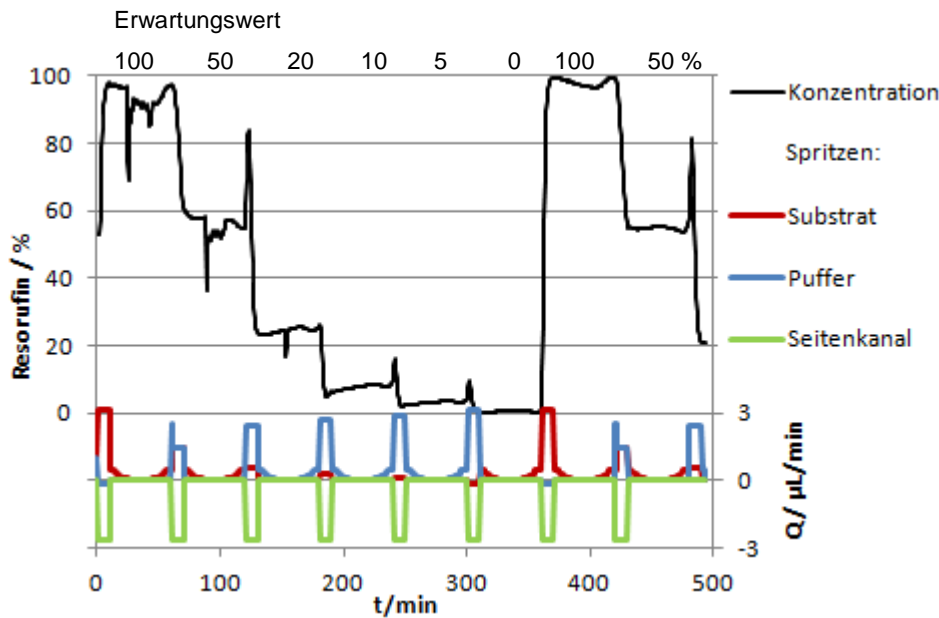


Abbildung 95: Kontrolle des abgerundeten Flussratenprofils aus Abbildung 94 mit Resorufin für die Mikrofluidik mit GOX-funktionalisierten Partikeln für die Variation von Konzentration und Flussrate in einem Experiment (vgl. Abschnitt 2.6.2) Die gemessenen Resorufinkonzentrationen bildeten das erwartete Stufenmuster ab. Die Abweichungen der Mittelwerte lagen ca. 7 bis 35% von den Erwartungswerten entfernt. Große Schwankungen entstanden bei den Minima der Flussraten ($Q = 0,05 \mu\text{L}/\text{min}$). Hier waren die Flussraten bedingt durch die Pumpen nicht mehr stabil und es kam zu Druckausgleich mit den Seitenkanälen, da nicht kontinuierlich abgesaugt wurde (vgl. Abschnitt 2.5.3.1). Diese Störungen nahmen im Verlauf des Experiments ab. Außerdem waren Peaks am Ende der Stufen erkennbar, die vermutlich ebenfalls durch Druckausgleich der Seitenkanäle bei schlagartiger Änderung der Flussrate der drei beteiligten Pumpen entstanden.



Abbildung 96: Undichtigkeit der Luer-Steckverbindung (vgl. S.144). **A:** Ein neuer weiblicher Luer-Adapter wurde auf den konischen Luer Ansatz der Spritze aufgesteckt und führt zu einer dichten Verbindung. Durch häufigen Gebrauch dehnte sich der Kunststoff minimal aus und der Adapter musste immer weiter auf den Luer Ansatz aufgeschoben werden. In **B** ist der Kunststoff bereits so stark gedehnt, dass er an der Erweiterung der Glasspritze anstößt. Dadurch ist die Steckverbindung nicht mehr verlässlich dicht. Eine Lösung des Problems war, den Anschluss mit Parafilm zu umwickeln, was zu einer dauerhaft dichten Verbindung führte.

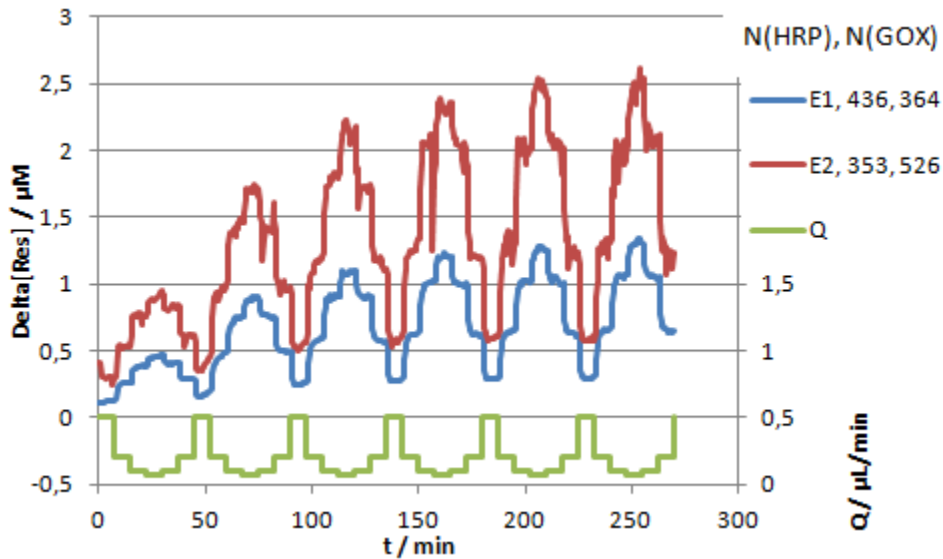


Abbildung 97: Negativkontrolle der gekoppelten Kinetik mit GOX- und HRP-funktionalisierten Partikeln in der Mikrofluidik mit konstanten $100 \mu\text{M}$ Amplex Red in Abwesenheit von Glukose, vergleiche Abschnitt 2.7.3.2. In der Legende sind zu jedem Experiment (E1, E2) die Partikelzahlen (N) der beiden Fritten angegeben. Im unteren Bereich ist die Flussrate Q auf der linken y-Achse aufgetragen. Es handelt sich um die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Resorufinkonzentration nahm, wie auch in Abschnitt 2.5.3.3 diskutiert, beim Passieren der HRP-Fritte zu. Während vor der Fritte keine signifikante Konzentration messbar war ($<0,04 \mu\text{M}$, Daten nicht gezeigt), ließ sich eine Resorufinkonzentration von bis zu $2,6 \mu\text{M}$ hinter der HRP-Fritte nachweisen. Die Signale waren dabei flussratenabhängig. Geringere Flussraten führten zu längeren Kontaktzeiten, die wiederum lieferten höhere Resorufinkonzentrationen. Die Umsetzung erfolgte also lokalisiert an der HRP-beladenen Fritte. Im Verlauf des Experiments nahmen die Signale, wie auch in Abschnitt 2.5.3.3 beschrieben, zu.

Ursachen waren die regelmäßige Belichtung, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder Amplex Red Radikalen führen konnte.^[134] Bei Abwesenheit von H_2O_2 war auch das Wachstum von Bakterien begünstigt. Diese konnten wiederum ebenfalls bei Belichtung H_2O_2 bilden.^[137]

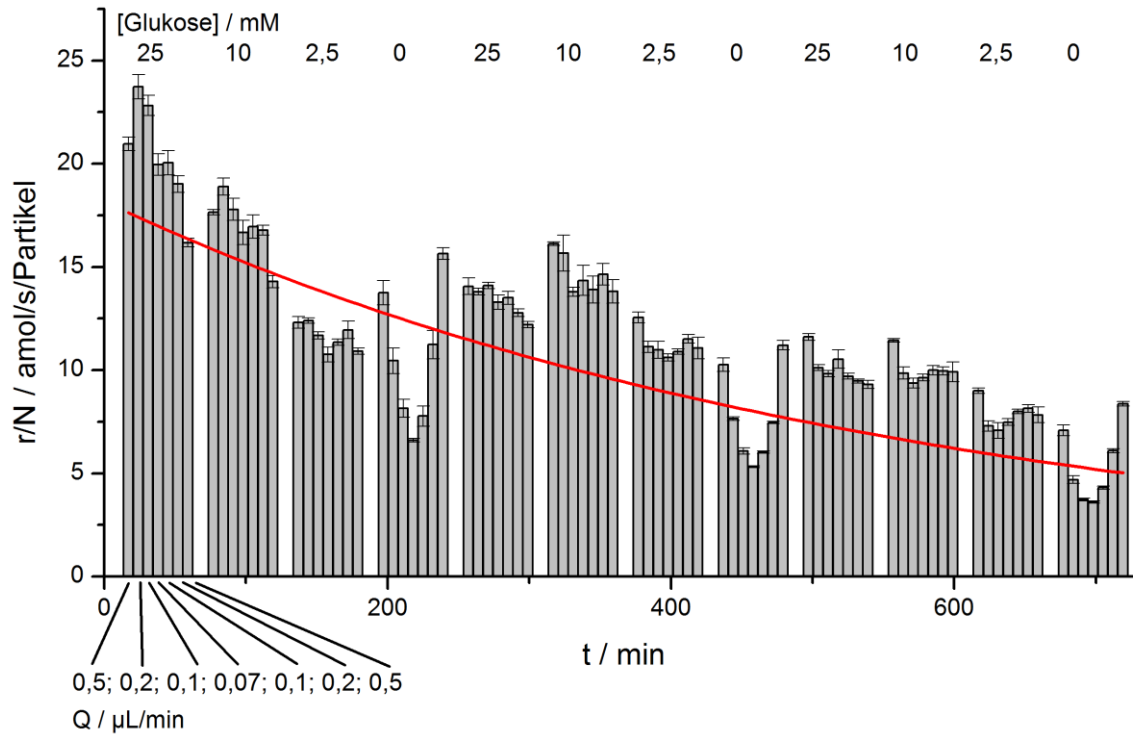


Abbildung 98: Auftragung der auf die HRP-Partikelzahl normierten Reaktionsraten r/N am Beispiel von E1 der Mikrofluidik mit GOX- und HRP-beladenen Fritten mit $100 \mu\text{M}$ Amplex Red, variabler Glukosekonzentration und variabler Flussrate Q , vergleiche Abschnitt 2.7.3.2. Oben sind die entsprechenden Glukosekonzentrationen für jeden Zyklus angegeben, unten sind für den ersten Zyklus beispielhaft die zugehörigen Flussraten angegeben. Wegen der variablen Glukosekonzentrationen wiederholen sich die Reaktionsbedingungen gleicher Konzentration und gleicher Flussrate erst alle 240 min, so dass der exponentielle Fit nach Gleichung (25) hier nicht nach Flussraten getrennt durchgeführt wurde. Der nichtlineare Kurvenfit mit Origin 8 ergab $t_{1/2} = 387 \pm 39$ min und $r_0/N = 18 \pm 1$ amol/s/Partikel.