



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.

Entwicklung enzymatischer Screeningverfahren

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der MARTIN - LUTHER - UNIVERSITÄT HALLE – WITTENBERG**

von Claudia Korb

geboren am 09. November 1974 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

- 1.) Prof. Dr. René Csuk
- 2.) Prof. Dr. Markus Pietzsch
- 3.) Prof. Dr. Bärbel Schulze

Halle (Saale), den 18. Dezember 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006814

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006814>]

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Zusammenarbeit und die stets gewährte freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem verehrten Doktorvater Herrn Prof. Dr. René Csuk für die Überlassung des interessanten und motivierenden Themas. Seine fortwährende freundschaftliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft machten die Erarbeitung der vorliegenden Arbeit erst möglich.

Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. Csuk für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Schäfer für die außergewöhnlich gute und intensive Zusammenarbeit und Ihre vielfältige Unterstützung bei meiner Promotion bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Kraus und Frau Quell für die HS-GC-MS Messungen sowie Frau Dr. Mohr und Frau Ziehn für die HPLC-Untersuchungen. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Kluge für die Durchführung der LC-MS Messungen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Spiske, der für alle fachlichen, technischen und privaten Probleme jederzeit ein offenes Ohr hatte. Seine stets gewährte Hilfsbereitschaft machte ihn nicht nur einmal zum Feuerwehrmann in Computerfragen.

Allen Institutsangehörigen und Studenten der Organischen Chemie in Halle, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden, sei mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet hat.

Inhaltsverzeichnis

1	THEORETISCHER TEIL	1
1.1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.2	Chiralität und ihre pharmazeutische Relevanz	2
1.3	Gewinnung von Enantiomeren	4
1.4	Enzyme	5
1.5	Stereochemische Bedeutung und Anwendung von Enzymen	6
1.6	Enzyminhibierung	7
2	METHODEN UND ERGEBNISSE	8
2.1	High Throughput Screening mit alkoholbasierendem Detektionssystem	8
2.1.1	Entwicklung des Assays	8
2.1.1.1	Enzymatische Detektion von Alkohol	8
2.1.2	High Throughput Screening	12
2.1.2.1	Auswertung der Mikrotiterplatten	14
2.1.3	Untersuchungen am pH-Stat	15
2.1.4	Anwendung des Messsystems auf die Hydrolyse von Estern langkettiger, primärer, unverzweigter Alkohole	17
2.2	Assay zur quantitativen Bestimmung von Blutalkohol	20
2.2.1	Endpunktmessung zur quantitativen Bestimmung von Blutalkohol	21
2.2.2	Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie e. V.	24
2.3	High Throughput Screening mit Detektion von Acetat	26
2.3.1	Entwicklung des Assays	26
2.3.1.1	Enzymatische Detektion von Acetat	26
2.3.2	Screening acetylierter Aminosäuren	29
2.3.3	Auswertung der Screening-Versuche	31
2.3.4	Dünnschichtchromatographie DC	34
2.3.5	Untersuchungen am pH-Stat	35

2.4	Glucosidaseassay	36
2.4.1	LC-MS-Messungen	39
2.4.2	Mikrotiterplattenassay	41
2.5	Ureaseassay	45
2.5.1	Allgemeines	45
2.5.2	Entwicklung des Assays	45
3	ZUSAMMENFASSUNG	48
4	EXPERIMENTELLER TEIL	51
4.1	Geräte und Zubehör	51
4.2	Enzyme	53
4.2.1	Hydrolasen	53
4.2.2	Weitere Enzyme	55
4.3	Chemikalien	56
4.4	Methoden	58
4.4.1	High Throughput Screening mit alkoholbasiertem Detektionssystem	58
4.4.1.1	Assay	58
4.4.1.2	HPLC	59
4.4.1.3	Titrimo pH-Stat	60
4.4.2	Assay zur quantitativen Bestimmung des Blutalkohols	61
4.4.2.1	Assay-Bedingungen	61
4.4.2.2	HS-GC-MS Messungen	62
4.4.3	High Throughput Screening mit Detektion von Acetat	63
4.4.3.1	Acetylierung von Aminosäuren	63
4.4.3.2	Assay	65
4.4.3.3	Umsetzungen am Titrimo unter pH-Stat-Bedingungen	66
4.4.3.4	Dünnschichtchromatographie	67
4.4.4	Glucosidaseassay	68
4.4.4.1	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	68
4.4.4.2	LC-MS Messungen	68

4.4.4.3	Assay	68
4.4.5	Ureaseassay	70
5	LITERATURVERZEICHNIS	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
BAK	Blutalkoholkonzentration
ber.	berechnet
bzw.	beziehungsweise
CD	Cirkular-Dichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
DGKC	Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie
E	Enzym
ee	Enantiomerenüberschuss
EP	Enzym-Produkt-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
gef.	gefunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS-GC	Headspace – Gaschromatographie
HS-GC-MS	Headspace – Gaschromatographie – Massenspektrometrie
HTS – System	High – Throughput – Screening System
IR	Infrarot Spektroskopie
K _m	Michaelis-Menten Konstante
λ	Wellenlänge
LC-MS	Liquid Chromatography – Massenspektrometrie
Lsg.	Lösung
lt.	laut
m/z	Massenzahl (Masse / Ionenladung)
min	Minuten
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	optische Dichte
P	Produkt
Ph	Phenylrest
PIPES - Puffer	Piperazin-N,N'-bis [ethansulfonsäure]

R	organischer Rest
R^2	Bestimmtheitsmaß bei der linearen Regression
s	siehe
S; [S]	Substrat; Substratkonzentration
Std.	Standard
UV	Ultraviolett Spektroskopie
UV – Vis	Spektroskopie mit ultraviolettem und sichtbarem Licht
z. B.	zum Beispiel

1 Theoretischer Teil

1.1 Einleitung und Zielsetzung

Biokatalysatoren, insbesondere hydrolytische Enzyme, sind ein geeignetes Synthesewerkzeug zur Darstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe. Insbesondere Lipasen und Esterasen finden aufgrund ihrer breiten Substratazeptanz und ihrer Stereoselektivität in der kinetischen Racematspaltung oder der asymmetrischen Synthese neuerdings breite Anwendung.

Ein dabei auftretendes Problem besteht darin, aus der Vielzahl der bekannten Enzyme ein Geeignetes zu finden. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass ähnlich strukturierte Substrate von den gleichen Enzymen angegriffen werden, aber schon kleine Strukturänderungen können bewirken, dass Substrat und Enzym nicht mehr hinreichend wechselwirken (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Das bedeutet, dass für jede (synthetisch) hergestellte Substanz, die auf diese Weise umgesetzt werden soll, erst ein geeignetes Enzym gefunden werden muss. Eine gebräuchliche Methode ist dabei die Durchführung von Hydrolysen bei konstant gehaltenem pH-Wert (pH-Stat - Bedingungen). Um den Substratumsatz zu verfolgen, wird der kinetische Reaktionsverlauf gemessen. Aber aufgrund oftmals langer Reaktionszeiten und eines größeren Chemikalienverbrauchs ist diese Methode für Reaktionen weniger geeignet, für die ein substratspezifisches Enzym erst gesucht werden muss.

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren verschiedene Testsysteme ^[1 - 11] zum Screening enzymkatalysierter, enantioselektiver Reaktionen in Mikrotiterplatten entwickelt. Einige Methoden basieren dabei auf der Verwendung von chromophoren ^[1] oder fluorophoren ^[2, 4] Substraten, andere auf dem Einsatz von 4-Nitrophenol ^[5, 6] oder Bromthymolblau ^[7, 8] als pH-Indikator zur Identifizierung aktiver Enzyme.

Andere Verfahren verwenden IR-Thermographie ^[9] oder eine Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an isotope markierten Substraten ^[10] zur Detektion enzymkatalysierter, enantioselektiver Reaktionen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Screeningsystemen, die es ermöglichen, für synthetische Anwendungen schnell aus einer Vielzahl von Enzymen die für ein spezielles Problem Geeignetes herauszufinden. Da in vielen Synthesen Ester als Zwischen- oder Endprodukte entstehen, nutzten wir Hydrolasen, welche oft mit hoher Enantioselektivität zum gewünschten Produkt führen.

Prinzipiell kann dabei sowohl die Alkoholkomponente als auch die Säurekomponente der chirale Baustein sein. Um den Arbeitsaufwand zu minimieren, sollte ein enzymatisches Screeningverfahren für Mikrotiterplatten entwickelt werden, welches das schnelle Auffinden geeigneter Enzyme in kurzer Zeit bei gleichzeitig minimalem Materialaufwand ermöglicht. Bei beiden Methoden sollte jeweils der nichtchirale Bestandteil des Esters zum Detektionsnachweis der abgelaufenen enzymatischen Reaktion genutzt werden. Da über gekoppelte enzymatische Reaktionen die Reaktionskinetik von Hydrolysen verfolgt werden kann, sollten damit ebenso Aussagen zur Arbeitsweise der untersuchten Enzyme getroffen werden können. Anhand der aus dem Screening gewonnenen Ergebnisse sollte es dann auch leicht möglich sein, Enzyme mit den gewünschten Eigenschaften auszuwählen und die gewonnenen Erkenntnisse auf Untersuchungen unter pH-Stat Bedingungen zu übertragen sowie Reaktionen im größeren Maßstab durchzuführen ("up-scaling").

1.2 Chiralität und ihre pharmazeutische Relevanz

Chiralität oder auch Händigkeit (abgeleitet aus dem griech. cheir = Hand) besagt, dass sich Moleküle, welche auch als Enantiomere (griech. enantion = Gegenteil) bezeichnet werden, zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten. Am häufigsten tritt Chiralität infolge asymmetrisch substituierter Kohlenstoffatome auf. Sie kann aber auch durch das Vorhandensein von Chiralitätsachsen (axiale Chiralität) oder Chiralitätsebenen (planare Chiralität) verursacht werden. Neben Kohlenstoff können auch andere Atome wie Schwefel, Phosphor und Stickstoff stereogene Zentren (zentrale Chiralität) aufweisen.

Enantiomere einer Verbindung haben aufgrund gleicher Molekülgestalt identische chemische und physikalische Eigenschaften, wie z. B. Schmelzpunkt, Dichte, IR- und UV-Spektren. Der einzige Unterschied besteht darin, dass sie die Schwingungsebene linear polarisierten Lichtes zwar um den gleichen Betrag, aber in entgegengesetzter Richtung drehen. Diese Eigenschaft chiraler Moleküle bezeichnet man als optische Aktivität. Demzufolge kann man Enantiomere nur in chiraler Umgebung voneinander unterscheiden.^[12]

Diastereomere (griech. dia = auseinander) treten auf, wenn in einem Molekül mehrere chirale Zentren vorhanden sind. Dabei werden nur die Paare von Molekülen, die sich in einem chiralen Zentrum unterscheiden und sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten, als Diastereomere bezeichnet. Sie unterscheiden sich im Gegensatz zu den Enantiomeren deutlich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften.

Optisch aktive Substanzen kommen in der Natur meist, jedoch nicht ausschließlich, enantiomerenrein vor; dies sind in lebenden Organismen fast ausschließlich L-Aminosäuren bzw. D-Zucker. Dagegen entstehen bei den üblichen klassischen Synthesen chiraler Verbindungen gewöhnlich racemische Gemische der jeweiligen Enantiomeren im Verhältnis 1:1. Annähernd 2000 Wirkstoffe werden derzeit in unterschiedlichsten Formulierungen und Kombinationen als Medikamente eingesetzt. Mehr als die Hälfte der organischen Arzneistoffe, welche die European Pharmacopocia 1997 enthielt, waren chirale Substanzen.^[13]

Die Eigenschaft der Chiralität ist für natürliche Prozesse von großer Bedeutung, weil auch Rezeptor-, Akzeptoren- und Transporterproteine chiral sind. Eine Substanz muss, um eine biologische Wirkung zu erzielen, mit dem Zielprotein entsprechende Wechselwirkungen eingehen können. Dies erklärt, weshalb Enantiomere einer Verbindung unterschiedliche pharmakologische Wirkungen zeigen können (s. Tabelle 1). Dabei wird das pharmakologisch wirksamere Enantiomer Eutomer und das weniger aktive Isomer Distomer genannt. Das Distomer kann nicht nur weniger wirksam bzw. unwirksam, sondern auch für schwerwiegende Nebenwirkungen verantwortlich sein. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Thalidomid, welcher 1956 als Arzneimittel Contergan auf den Markt gebracht wurde. Dieses als Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzte Medikament war besonders wirksam gegen die morgendliche Übelkeit schwangerer Frauen. Die Folgeschäden, verursacht durch das (*S*)-Isomer, äußerten sich in Wachstumsstörungen an Gliedmaßen ansonsten gesunder Kinder. Heute ist der Mechanismus der Schädigung bekannt: Das Distomer hemmt ein Enzym, welches an der Knorpelbildung beteiligt ist.^[14] Aus diesem Grunde ist man bestrebt bzw. gesetzlich gezwungen enantiomerenreine Wirkstoffe einzusetzen.

chirale Substanz	Stereoisomer	Effekt
Aspartam	(<i>R,R</i>)-Isomer	süßer Geschmack
	(<i>S,R</i>)-Isomer	bitterer Geschmack
Barbiturate	(<i>S</i>)-Isomer	Sedativum
	(<i>R</i>)-Isomer	krampflösend
Limonen	(<i>S</i>)-Isomer	Lemonengeruch
	(<i>R</i>)-Isomer	Orangengeruch
Opiate	(<i>R,S</i>)-Isomer	Narkotika (Abhängigkeit!)
	(<i>S,R</i>)-Isomer	Hustenmittel
Penicillamin	(<i>D</i>)-Isomer	Antiarthritikum
	(<i>L</i>)-Isomer	toxisch
Thalidomid	(<i>S</i>)-Isomer	fruchtschädigend
	(<i>R</i>)-Isomer	schlaffördernd

Tabelle 1: Beispiele für chirale Substanzen und ihre biologischen Effekte nach White und Subramanian ^[15]

1.3 Gewinnung von Enantiomeren

Das Wissen um die differenziellen Wirkungen chiraler Substanzen führte zu einer intensiven Erforschung der Möglichkeiten zur Gewinnung von Enantiomeren.

Um enantiomerenreine Wirkstoffe herzustellen, existieren zwei prinzipielle Verfahren: Zum einen ist dies die enantioselektive Synthese des gewünschten Eutomers und zum anderen die Racematspaltung. Beide Verfahren sind oftmals mit dem Einsatz teurer chiraler Hilfsstoffe bzw. aufwendiger Schutzgruppenstrategien oder mit Reinigungsschritten verbunden. ^[12]

Viele Methoden ein Racemat zu trennen sind besonders in neuerer Zeit entwickelt worden. Erwähnenswert erscheint allerdings die klassische Racematspaltung durch Louis Pasteur, welcher 1848 die Salze der Weinsäure untersuchte. Er trennte nach Rekristallisation von Natriumammoniumtartrat zwei Formen spiegelbildlich gleicher Kristalle, deren Lösungen die Ebene polarisierten Lichtes gegensätzlich drehten ^[16]; heute würde dieser Versuch als die Spaltung eines racemischen Gemisches in Form eines Konglomerates angesehen werden.

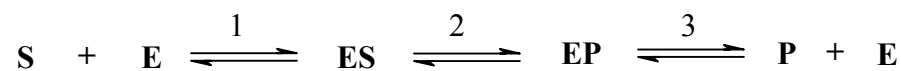
Eine besondere Stellung nehmen enzymkatalysierte Reaktionen ein, die sowohl bei der chemoenzymatischen Enantiomerentrennung als auch bei der enantioselektiven Synthese eingesetzt werden können.

1.4 Enzyme

Enzyme sind meist globuläre Proteine, die von einer oder mehreren Polypeptidketten gebildet werden und aus mehreren gleichen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein können. Sie sind Katalysatoren, d.h., sie beeinflussen nicht die Lage des Reaktionsgleichgewichtes, sondern beschleunigen nur die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erniedrigung der Aktivierungsenergie des Übergangszustandes, ohne dabei selbst verbraucht zu werden.

Enzyme besitzen darüber hinaus einen weiteren Vorteil: Sie beschleunigen Reaktionen unter milden Bedingungen (pH-Bereich und Temperatur) und die Umsetzung erfolgt oft in einem einzigen Schritt.

Im Allgemeinen unterscheidet man folgende Teilschritte bei der Umwandlung eines Substrats (S) in ein Produkt (P) in Gegenwart eines Enzyms (E):



1. Zuerst erfolgt die Bindung von S an E unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES).
2. Darauf folgt der katalytische Prozess, der in die Aktivierung dieses Komplexes durch Umlagerung seiner Struktur und die Umwandlung des Substrats in das Produkt unterteilt werden kann.
3. Die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes (EP) unter Regenerierung des biologischen Katalysators beendet die Katalyse.

Entscheidend für eine enzymatische Katalyse ist das aktive Zentrum, eine Enzymtasche, in der die Reaktion abläuft.

Bei einem Großteil der Enzyme ist die katalytische Aktivität an das Vorhandensein von Coenzymen (komplexe organische oder metallorganische Moleküle) geknüpft. Ungefähr ein Drittel aller Enzyme benötigen Cofaktoren (Metallionen, z.B. Co^{2+} , Zn^{2+} und Mg^{2+}) um ihre optimale Aktivität zu entfalten. Coenzym bzw. Cofaktor können dabei auch als prosthetische Gruppe in Erscheinung treten. Die katalytisch aktive Verbindung von Protein und prosthetischer Gruppe bezeichnet man als Holoenzym.

Die große Anzahl von Enzymen wurde durch Klassifizierung übersichtlich eingeteilt. Dabei wird in sechs Hauptklassen (s. Tabelle 2) unterschieden, denen jeweils weitere Klassen untergeordnet sind, welche auf dem jeweils katalysierten Reaktionstyp basieren. Außerdem wird jedem Enzym zur eindeutigen Identifizierung eine vierstellige Klassifizierungsnummer (E.C.-Nummer) und ein systematischer Name, der die katalysierte Reaktion kennzeichnet, zugewiesen.^[17]

Nr.	Enzymklasse	Wirkungsweise
1	Oxidoreduktasen	Redoxreaktionen katalysierend, zugehörig sind unter anderem Dehydrogenasen, Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Reduktasen.
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen (z.B. Acyltransferasen)
3	Hydrolasen	Katalysieren die hydrolytische Spaltung von Molekülen (z.B. Lipasen)
4	Lyasen	Katalysieren Additionen an Doppelbindungen (z.B. Decarboxylasen)
5	Isomerasen	Intramolekulare Umlagerung (z.B. Alanin-Racemase)
6	Ligasen	Verknüpfen von Molekülen unter Verbrauch von ATP (z.B. Argininsuccinat-Synthetase)

Tabelle 2: Internationale Klassifizierung von Enzymen

1.5 Stereochemische Bedeutung und Anwendung von Enzymen

Enzyme weisen meist eine hohe Substratspezifität auf, eine Eigenschaft, die E. Fischer 1894 zu seinem bekannten Schlüssel-Schloss-Vergleich veranlasste.

Daher können Enzyme zur Herstellung möglichst enantiomerenreiner Verbindungen eingesetzt werden.

Auf dem Gebiet der asymmetrischen Synthese wurden Esterasen, Lipasen und Proteasen sehr erfolgreich zur Differenzierung enantiotroper Alkoxy-carbonyl-, Acyloxy- und Hydroxygruppen eingesetzt. Vor allem Lipasen, wie z. B. Lipasen aus Schweinepankreas, *Candida cylindracea* und *Pseudomonas fluorescens*, werden für die asymmetrische Synthese mit großem Erfolg verwendet.^[18, 19, 20, 21, 22]

Auch enzymkatalysierte Racematspaltungen werden bereits im industriellen Maßstab betrieben. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Racematspaltung an N-Acylaminosäuren mithilfe von Acylasen, wobei mit hoher Enantioselektivität racemische N-Acyl-D, L-Aminosäuren zu L-Aminosäuren und N-Acyl-D-Aminosäuren hydrolysiert werden.^[23, 24, 25]

Enzymreaktionen werden aufgrund ihrer hohen Spezifität auch in der Analytik verwendet.

Vor allem in der Lebensmittelanalytik findet eine Reihe enzymatischer Methoden Anwendung, z. B. die enzymatische Bestimmung von Säuren (Essigsäure oder L-Äpfelsäure) in Lebensmitteln und Getränken.^[26, 27]

Auch im Bereich der klinischen Diagnostik wird das Selektivitätspotenzial enzymatischer Reaktionen gerne genutzt. Ein Beispiel dafür ist die Aktivitätsbestimmung von Urease, deren Auftreten als Nachweis einer *Helicobacter-pylori*-Infektion herangezogen wird (Ureaseschnelltest).^[28]

1.6 Enzyminhibierung

Enzyme katalysieren nahezu alle zellulären Prozesse. Daher ist man interessiert, Enzyme gezielt hemmen zu können. Die meisten auf dem Markt befindlichen Pharmazeutika (z. B. auch das altbekannte Aspirin) sind Enzyminhibitoren.

An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick (s. Abb. 1) über die wichtigsten Hemmmechanismen gegeben werden. Bei einer Inhibierung wird die Enzymaktivität durch Substanzen (= Inhibitoren oder Hemmstoffe) negativ beeinflusst. Die Art der Bindung eines Hemmstoffes bestimmt den Hemmtyp. Man unterscheidet dabei reversible (das heißt der Inhibitor kann wieder vom Enzym abgelöst werden) und irreversible Hemmung; in letzterem Fall bleibt der Inhibitor fest an das Enzym gebunden. Bei der reversiblen Inhibierung kann man zwischen einer partiellen und einer vollständigen Hemmung unterscheiden. Im ersten Fall wird die katalytische Aktivität des Enzyms durch den Hemmstoff nur beeinflusst. Im zweiten Fall bilden Enzym und Inhibitor einen inaktiven Komplex.

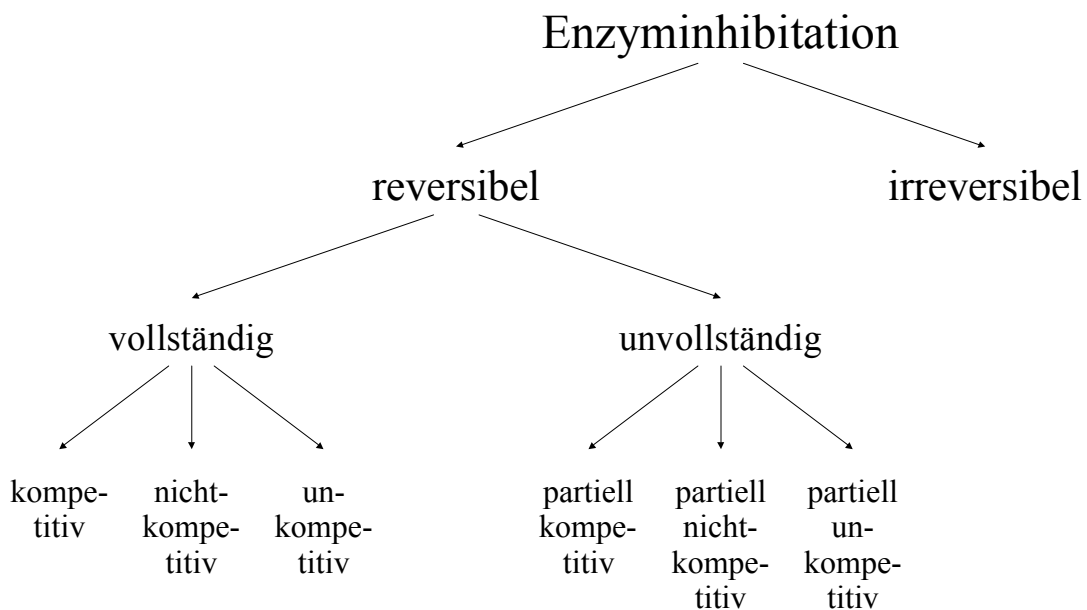


Abb. 1: Übersicht über die wichtigsten Hemmtypen ^[29]

2 Methoden und Ergebnisse

2.1 High Throughput Screening mit alkoholbasierendem Detektionssystem

Das hier entwickelte High Throughput Screening - System (HTS-System) ist ein vielseitig einsetzbarer Absorptionsassay für Mikrotiterplatten mit 96 bzw. 384 Kavitäten, der nicht nur ein schnelles Screening verschiedener Hydrolasen hinsichtlich ihrer Substratspezifität zulässt, sondern auch eine schnelle Optimierung der Hydrolysebedingungen (pH-Wert, Konzentration, Temperatur usw.) ermöglicht.

2.1.1 Entwicklung des Assays

Der Einsatz des Assays wurde anhand der Hydrolyse des Esters (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenyl-cyclopropanocarboxylat (**1**) getestet. Über eine gekoppelte enzymatische Reaktion konnte die Reaktionskinetik der Hydrolyse von **1** verfolgt werden. Anschließende HPLC-Untersuchungen charakterisierten das enantioselektive Verhalten der einzelnen Enzyme. Zur Bestimmung von ee-Werten waren größere Ansätze notwendig. Daher wurde die Hydrolyse des Esters mit geeigneten Enzymen ebenfalls unter pH-Stat-Bedingungen durchgeführt.

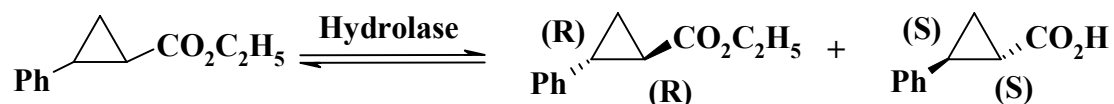


Abb. 2: Reaktionsschema einer chemoenzymatischen Esterhydrolyse

2.1.1.1 Enzymatische Detektion von Alkohol

Die enzymatische Esterhydrolyse wurde mit einem Detektionsassay gekoppelt, welcher auf der bekannten Reaktion^[30] von Alkohol- und Aldehyddehydrogenase beruht (s. Abb. 3).

Dabei wird der als Nebenprodukt frei werdende Alkohol entsprechend nachfolgender Gleichungen mittels des Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) zur Carbonsäure oxidiert. Das durch diese Reaktion entstehende NADH (reduzierte Form von NAD^+) kann bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ photometrisch erfasst werden.

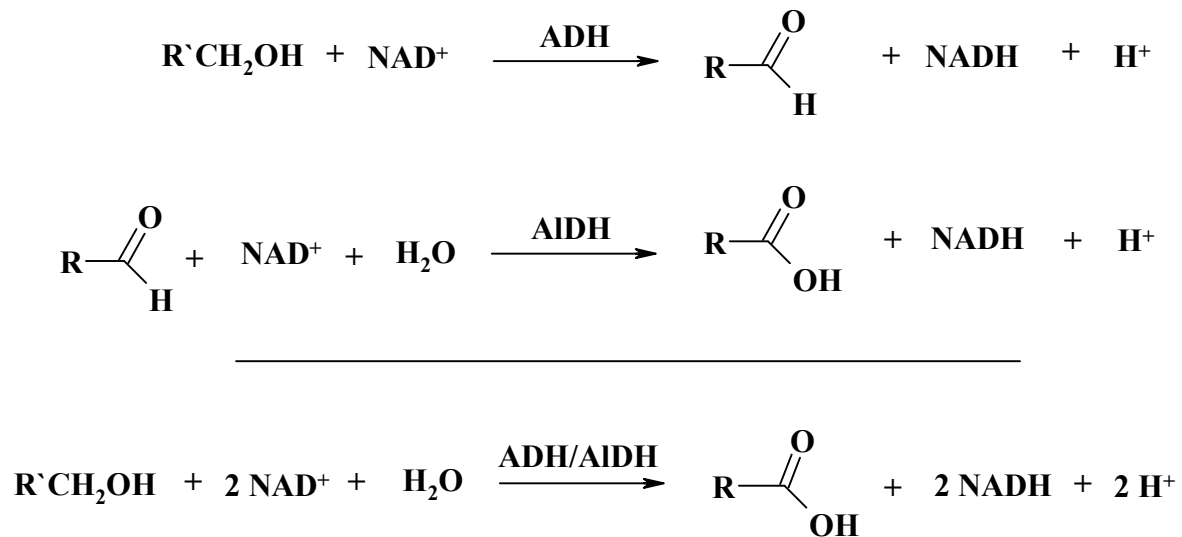


Abb. 3: Schema des Detektionsassays (ADH ⇒ Alkoholdehydrogenase; AIDH ⇒ Aldehyddehydrogenase)

Mit der verwendeten Alkoholdehydrogenase können neben Ethanol auch höhere primäre, unverzweigte Alkohole nachgewiesen werden. Die Verwendung der Aldehyddehydrogenase verhindert durch die Bildung der entsprechenden Carbonsäure eine Rückreaktion des Aldehyds zum Alkohol. Erst durch diese irreversible Entfernung des Alkohols wird eine vollständige Umsetzung zur Carbonsäure ermöglicht. Dies ist eine zwingende Voraussetzung für das Funktionieren einer gekoppelten enzymatischen Reaktion zur quantitativen Bestimmung einer Verbindung.

Vorausgehende Messungen mit Ethanol als Substrat hatten ergeben, dass Umsetzungen mit einer äquimolaren Menge an ADH und einem Überschuss (ca. die doppelte Menge) an AIDH reproduzierbar gute und quantitative Ethanolbestimmungen ermöglichen.

Begonnen wurde dabei mit Voruntersuchungen zur Auswahl eines optimalen Puffersystems, um eine hinreichende Stabilität von NADH zu gewährleisten.

Phosphatpuffer sind bei enzymatischen Reaktionen gebräuchliche Puffersysteme. Deshalb wurden bei verschiedenen NADH-Konzentrationen sowohl in Natriumpyrophosphatpuffer (vgl.) als auch in Kaliumhydrogenphosphatpuffer im SPECTRA Fluor Plus bei verschiedenen pH-Werten und Molaritäten entsprechende Messungen vorgenommen.

Analoge Untersuchungen erfolgten mit dem Piperazin-N,N'-bis [ethansulfonsäure]-Puffer (PIPES).^[31]

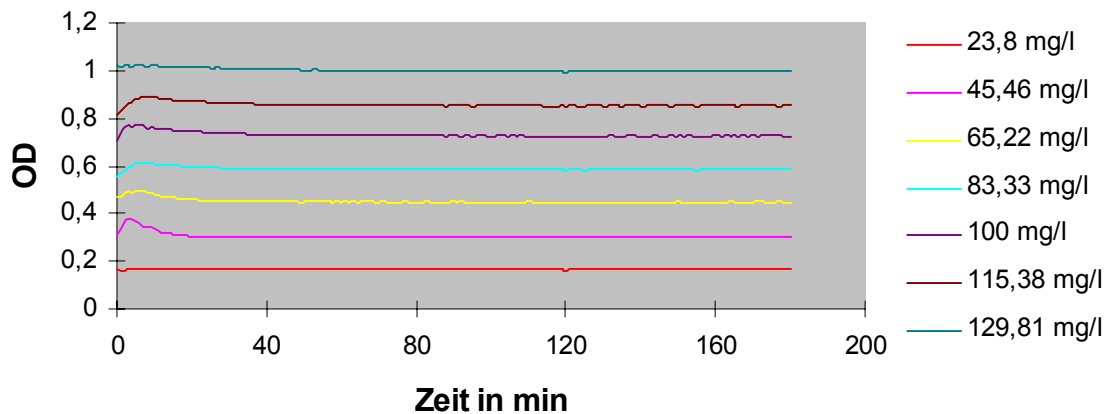


Abb. 4: Absorption von NADH bei $\lambda = 340$ nm in Natriumpyrophosphatpuffer (pH 8,7 und 75 mM) unter Variation der Konzentration des NADH

NADH zeigte sich stabil in beiden Phosphatpuffersystemen, allerdings stieg die Zersetzungsrate von NADH bei Zugabe von Lipase candida rugosa (L39) an, wie nachfolgende Abbildung zeigt. Innerhalb von 4 h wird eine Zersetzung von NADH in Natriumpyrophosphatpuffer (pH = 7,5 und 75 mM) von 18 % und in Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH = 7,5 und 75 mM) von 14 % beobachtet.

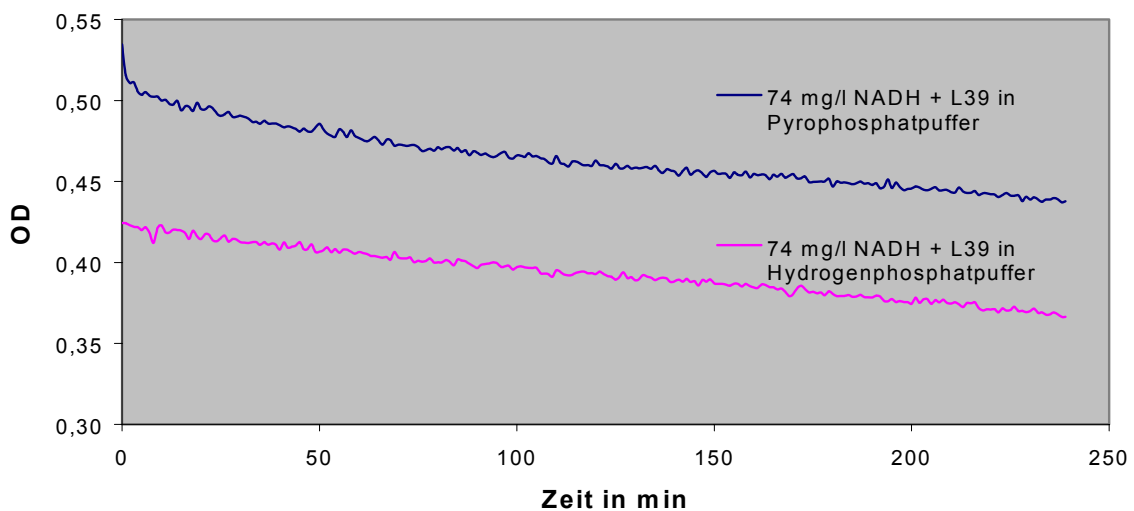


Abb. 5: Absorption von NADH in Natriumpyrophosphatpuffer (pH 7,5 und 75 mM) und in Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 7,5 und 75 mM) bei gleichzeitigem Zusatz von L39

Ein möglicher Grund für die Abnahme der Absorption bei $\lambda = 340$ nm liegt wahrscheinlich in der Bildung eines Addukts zwischen dem Pyridinring des NADH und dem Phosphat des Puffersystems, wodurch das Phosphat die Zersetzung der reduzierten Form des Cofaktors katalysiert. [31, 32]

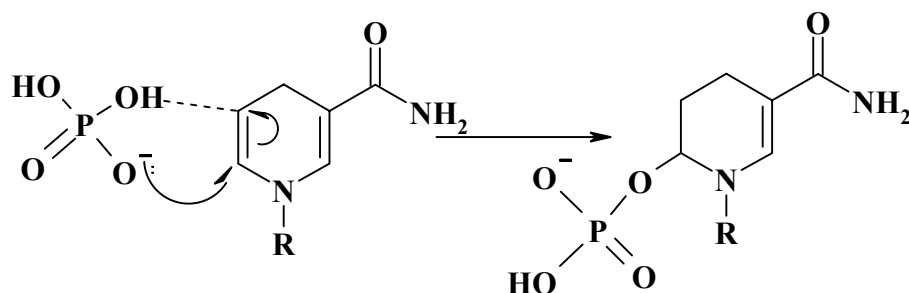


Abb. 6: Möglicher Mechanismus der Zersetzung von NADH

Dagegen ergeben Untersuchungen unter Verwendung von PIPES-Puffer nur geringe Zersetzungsraten für NADH.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die prozentuale Zersetzungsraten bei Verwendung eines Phosphatpuffersystems in Abhängigkeit von der Temperatur (25° bzw. 30 °C) und dem pH-Wert zwischen 14 und 18 % liegt. Untersuchungen mit einem PIPES-Puffersystem zeigten dagegen nur prozentuale Zersetzungsraten zwischen 0 und 7%.

Wählt man deshalb 0,1 M PIPES-Puffer bei pH 7,0 und 25°C als Reaktionstemperatur, so ist bei hinreichend kurzen Messzeiten eine Zersetzung des NADH nicht signifikant (s. Abb. 7).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **1** und zur Erzielung einer höheren Aktivität der Hydrolasen musste die Temperatur jedoch auf 37°C erhöht werden. Daher wurde auf jeder Mikrotiterplatte eine simultane NADH-Referenzbestimmung durchgeführt. Die beobachtete Zersetzung von NADH in PIPES-Puffer bei 37 °C innerhalb von 4 h liegt bei 9 %.

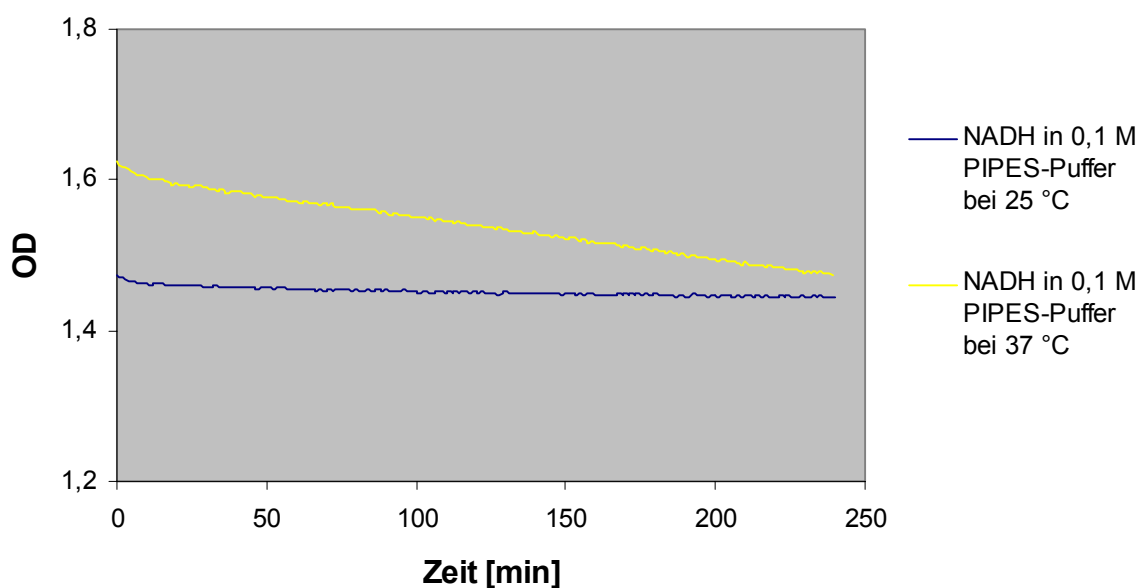


Abb. 7: Vergleich der Absorption von NADH in PIPES-Puffer (0,1 M; pH = 7,0) zwischen 25 °C und 37 °C

2.1.2 High Throughput Screening

Die Umsetzung von **1** wurde mit den in Tabelle 3 aufgeführten Enzymen durchgeführt. Die mit einem * gekennzeichneten Enzyme wurden nach der Auswertung des Screenings auch unter pH-Stat-Bedingungen weiter untersucht.

Anschließend wurde mithilfe der HPLC ermittelt, in welchem Verhältnis (+)-(S, S)-Säure und (-)-(R, R)-Säure erhalten wurden bzw. unumgesetzter (+)-(S, S)-Ester und (-)-(R, R)-Ester im Reaktionsansatz vorlagen.

Lipolase 100 fest*	Lipase A Amano aspergillus niger
Lipolase 100 flüssig (neu)*	Lipasi M Amano mucor javanicus
Lipase OF*	Lipase AY Amano
Lipase rhizopus arrhizus	Lipase PS Amano*
Lipase rhizopus niveus	Lipase P Amano pseudomonas. fluorescens*
Lipase rhizopus oryzae	Lipase pseudomonas sp. Typ XIII*
Lipase rhizopus delemar	Lipase pseudomonas fluorescens
Lipase F-AP15 rhizopus javanicus	Lipase candida rugosa
Lipase rhizomucor miehei	Lipase candida antarctica
Lipase aspergillus niger	Lipase candida antarctica Form B*
Novozym 435 (immobilisiert, candida antarctica B)*	Lipase candida antarctica Form A*

Tabelle 3: untersuchte Enzyme (* kennzeichnet zusätzliche Untersuchungen unter pH-Stat-Bedingungen)

Im Assay wurde **1** mit den Enzymen bei 37 °C im SPECTRA Fluor Plus auf der Mikrotiterplatte inkubiert.

Die erste Messung dauerte 20 Stunden und die Reaktionskinetik ließ erkennen, dass bereits nach 12 Stunden der max. Umsatz erreicht wurde (s. Abb. 8). Um dies zu bestätigen, wurden Proben nach jeweils 12, 24 und 48 Stunden aufgearbeitet und mittels HPLC die jeweilige Zusammensetzung des Produktgemisches bestimmt.

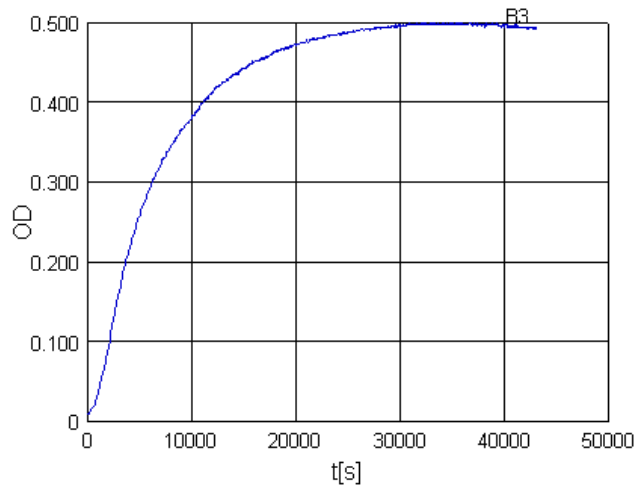


Abb. 8: Kinetikmesswerte der Umsetzung von 1 mit der Lipase aus Pseudomonas sp. Typ XIII

Die Gesamthydrolyse des Esters setzt sich aus der enzymatischen Hydrolyse und einem nicht-enzymatischen Anteil zusammen. Zur Bestimmung des Anteils der nicht-enzymatischen Hydrolyse im Vergleich zur Gesamthydrolyse wurde deshalb stets eine Referenzmessung durchgeführt. Aus diesen Messdaten konnten die Werte für die enzymatische Hydrolyse berechnet werden.

In weiteren Messungen wurde zusätzlich der Lösungsvermittler Triton zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Allerdings konnte damit die Umsetzung des Esters nicht weiter verbessert werden.

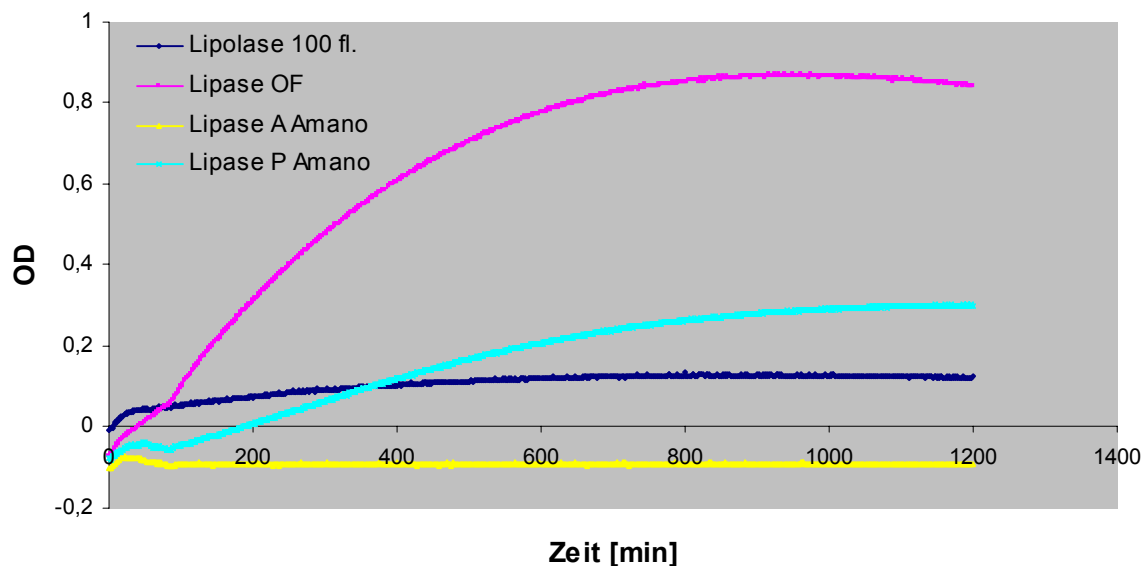


Abb. 9: Enzymatische Hydrolyse von 1 unter Verwendung verschiedener Enzyme (Gesamthydrolyse abzüglich des Anteils an nicht-enzymatischer Hydrolyse)

2.1.2.1 Auswertung der Mikrotiterplatten

Nach Durchführung der Kinetikmessungen ließen sich die hier untersuchten Enzyme in drei Typen einteilen.

Als Kriterium diente dabei der Kurvenverlauf (s. Abb. 9), der den Umsetzungsgrad des Esters aufzeigt. Ein "mittlerer" Umsetzungsgrad deutet häufig auf eine Stereoselektivität der eingesetzten Enzyme hin. Dies wurde mit HPLC-Messungen überprüft.

Enzyme mit geringem Umsetzungsgrad (Typ I)	Enzyme mit mittlerem Umsetzungsgrad (Typ II)	Enzyme mit hohem Umsetzungsgrad (Typ III)
Lipase A Amano	Lipolase 100 fest	Novozym 435
Lipase r. delemar	Lipolase 100 flüssig (neu)	Lipase OF
Lipase a. niger	Lipase P Amano	Lipase c. antarctica B
Lipase r. javanicus	Lipase PS Amano	Lipase pseudo. sp.
Lipase AY Amano	Lipase M Amano	
Lipase porc. panc.	Lipase p. fluorescens	
Lipase c. antarctica		
Lipase c. rugosa		
Lipase r. niveus		
Lipase r. arrhizus		
Lipase r. miehei		
Lipase r. oryzae		
Lipase c. antarctica A		

Tabelle 4: Einteilung der verwendeten Enzyme nach ihrer Substratspezifität

HPLC-Messungen jener Umsetzungen, bei denen (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenylcyclopropanocarboxylat ohne zusätzliches Enzym enthalten war, ergaben, dass der Anteil der nicht-enzymatischen Hydrolyse mit weit weniger als 0,5 % in Erscheinung tritt, und deshalb aus praktischen Erwägungen zu vernachlässigen ist. Dabei wurden (+)- als auch (-)-Säure in gleichen Mengen gefunden.

Wie erwartet zeigten die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen für jene Enzyme (Typ III), deren Messkurven einen hohen Umsatz vermuten ließen, keine besondere Selektivität

hinsichtlich der Hydrolyse des (+)- Esters. Für die Enzyme (Typ I), deren Messkurven (s. Abb. 9) sich an der Basislinie bewegten, konnten nur geringe Mengen an Produkt ermittelt werden. Am meisten interessierten deshalb jene Messkurven, deren Verlauf im mittleren Bereich, zwischen sehr geringer und relativ hoher Aktivität (Enzyme Typ II), beobachtet wurde, da hier eine entsprechende Enantioselektivität erwartet werden konnte. HPLC-Untersuchungen konnten dies bestätigen, wobei jedoch kein Enzym mit einer 100-%-igen Enantioselektivität gefunden werden konnte.

2.1.3 Untersuchungen am pH-Stat

Die Bestimmung von ee-Werten mittels HPLC unter direkter Verwendung der Inhalte der wells war leider nicht hinreichend exakt. Daher war es notwendig, unter pH-STAT-Bedingungen größere Ansätze durchzuführen.

Kontrolluntersuchungen zeigten, dass es möglich ist, durch Auswertung der HTS-Assays eine entsprechende Vorauswahl über geeignete Enzyme zu treffen, und somit den Umfang der Hydrolysen unter pH-Stat-Bedingungen einzuschränken. Es wurden deshalb ausgewählte Enzyme (Tabelle 3, mit * gekennzeichnet) in größeren Ansätzen (1,58 mmol an (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenyl-cyclopropanocarboxylat) eingesetzt.

Die aufgearbeiteten Reaktionsgemische wurden in gleicher Weise durch HPLC analysiert. Dabei konnte eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Umsetzungen unter pH-Stat-Bedingungen mit jenen Befunden festgestellt werden, die bereits beim HTS-Assay erzielt worden waren. Die Enzyme, die auf der Mikrotiterplatte keine Reaktion erkennen ließen, ergaben auch unter pH-Stat-Bedingungen keine Reaktionsprodukte. Für die Enzyme vom Typ III ergaben auch die Auswertungen der Umsetzungen unter pH-Stat-Bedingungen nur geringe Stereoselektivität. Für Enzyme vom Typ II konnte ein bevorzugter Angriff an der (+)-Form gefunden werden.

	Enzym	Verbrauch NaOH in ml	Zeit in h	ee (-)-Esters 2 in %	ee (+)-Säure 3 in %
PCE1	Lipolase 100 (120 mg)	15.884 (0,04 N)	277.8	*	90.2
PCE2	Lipolase 100 (150 µl)	38.094 (0.02 N)	138.3	93.4	87.4
PCE3	Lipase OF (20 mg)	40.616 (0.02 N)	167.7	93.6	73.0
PCE4	Lipase PS Amano (300 mg)	40.900 (0.04 N)	120.9	-36.1	5.9
PCE5	Lipase Novozym 435 (200 mg)	68.464 (0.02 N)	64.9	*	0
PCE6	Lipase B Candida antarctica (1 mg)	66.560 (0.02 N)	144.0	*	4.2
PCE9	Lipase A Candida antarctica (1 mg)	1.73 (0.02 N)	136.9	4.0	*
PCE10	Lipase TypXIII, Pseudomonas sp. (2 mg)	26.782 (0.04 N)	206.3	-5.3	58.8
PCE12	Lipase P Pseudomonas fluorescens (20 mg)	40.348 (0.02 N)	150.5	*	86.0
PCE13	Lipase F-AP15 Rhizopus javanicus (20 mg)	4.89 (0,02 N)	188,6	2.6	66.5

Tabelle 5: Ergebnisse der Umsetzungen unter pH-Stat Bedingungen

* Die Auswertung wurde in diesen Fällen nicht durchgeführt, weil eine exakte Zuordnung der relevanten Signale nicht möglich war.

2.1.4 Anwendung des Messsystems auf die Hydrolyse von Estern langkettiger, primärer, unverzweigter Alkohole

Der Nachweis, dass auch Ester langkettiger, primärer, unverzweigter Alkohole eingesetzt werden können, wurde anhand der Hydrolyse verschiedener Ester der (\pm)-(1 *RS*, 4 *SR*)-4-Acetamido-cyclopent-2-en-1-carbonsäure (s. Abb. 10) mit der Lipase aus *Candida rugosa* (L39) geführt.

Diese Ester waren bereits früher unter pH-Stat-Bedingungen hydrolysiert worden und standen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.^[33] Daher war ein anschließender Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit in der Mikrotiterplatte mit den Messungen am pH-Staten möglich.

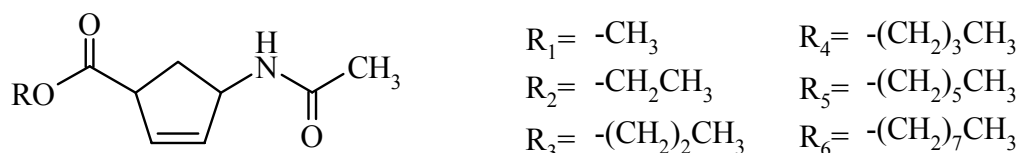


Abb. 10: (\pm)-(1 *RS*, 4 *SR*)-4 –Acetamido-cyclopent-2-en-1-carbonsäureester (2)

Die prinzipiellen Reaktionsbedingungen der pH-Stat-Experimente wurden für den HTS-Assay übernommen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die enzymatische Hydrolyse der Ester.

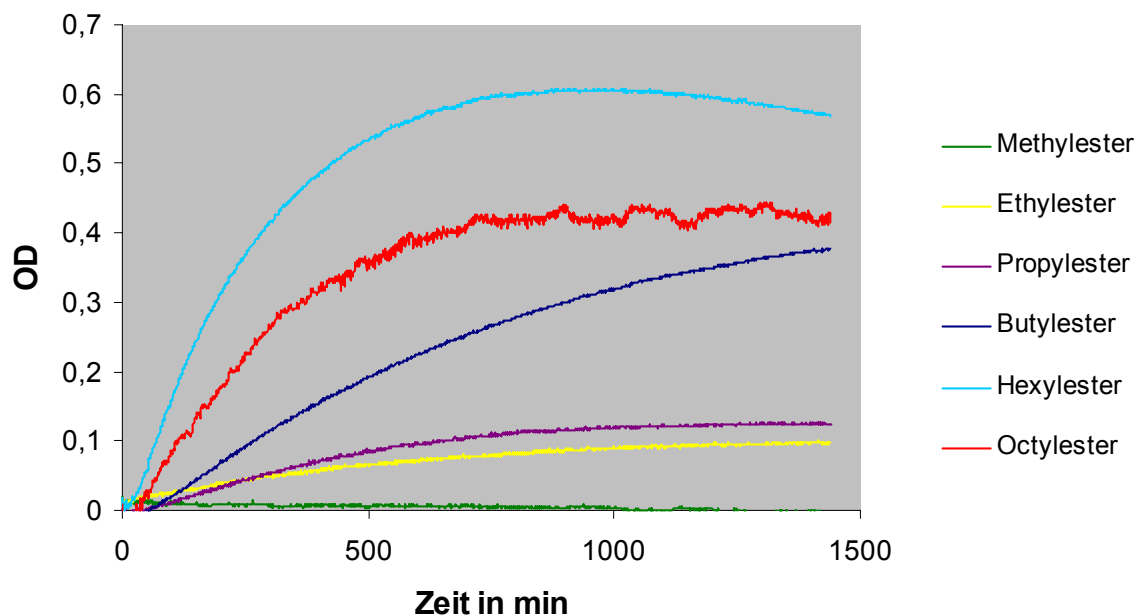


Abb. 11: Reaktionskinetiken der Umsetzungen verschiedener Ester der Verbindung 2

Dabei zeigt sich, dass die Hydrolyse des Methylesters im HTS-System nicht nachweisbar ist. Die Ursache liegt dabei im Katalysemechanismus der ADH begründet:

ADH enthält ein an eine S⁻-Gruppe gebundenes Zn²⁺-Ion, welches den Adenin-Teil des NAD⁺-Moleküls bindet. Der Nicotinsäureamid-Teil wird wegen seiner positiven Ladung an eine weitere S⁻-Gruppe des Enzyms sterisch fixiert. Der Alkohol koordiniert mit seinem Sauerstoffsubstituenten an das Zn²⁺-Ion und mit dem Wasserstoff des OH-Restes an die Aminogruppe des Adenins. Die lipophile terminale Methylgruppe des jeweiligen Alkohols ist über van-der-Waals-Kräfte an unpolare Reste des Enzyms gebunden. Diese Fixierung des Alkoholmoleküls bewirkt eine enge Nachbarschaft des mit dem Sauerstoffatom verbundenen Kohlenstoffatoms zum positiv geladenen Nicotinsäureamidrest des NAD⁺. Erst dadurch wird der Übergang eines Hydrid-Ions zum NAD⁺-Molekül ermöglicht.^[34]

Die Hydrolysegeschwindigkeit der untersuchten Ester nimmt zunächst mit steigender Kettenlänge zu, erreicht ein Maximum beim Hexylester und nimmt danach wieder ab.

Die erhaltenen Ergebnisse (s. Tabelle 6) stimmen mit den Literaturwerten ^[33, 35] gut überein.

	Anstieg enzymatischer Hydrolyse Mikrotiterplatte	prozentualer Anteil relativ zu Hexylester Mikrotiterplatte	Anfangsaktivität in mmol/s·mg pH-Stat	prozentualer Anteil relativ zu Hexylester pH-Stat
Methylester	---	---	0,081	2
Ethylester	0,0001	6,6	0,260	8
Propylester	0,0002	13,3	0,386	11
Butylester	0,0005	33,3	1,353	40
Hexylester	0,0015	100	3,363	100
Octylester	0,0010	66,7	0,778	23

Tabelle 6: Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse der untersuchten Ester beim HTS-Assay und der Umsetzungen unter pH-Stat-Bedingungen

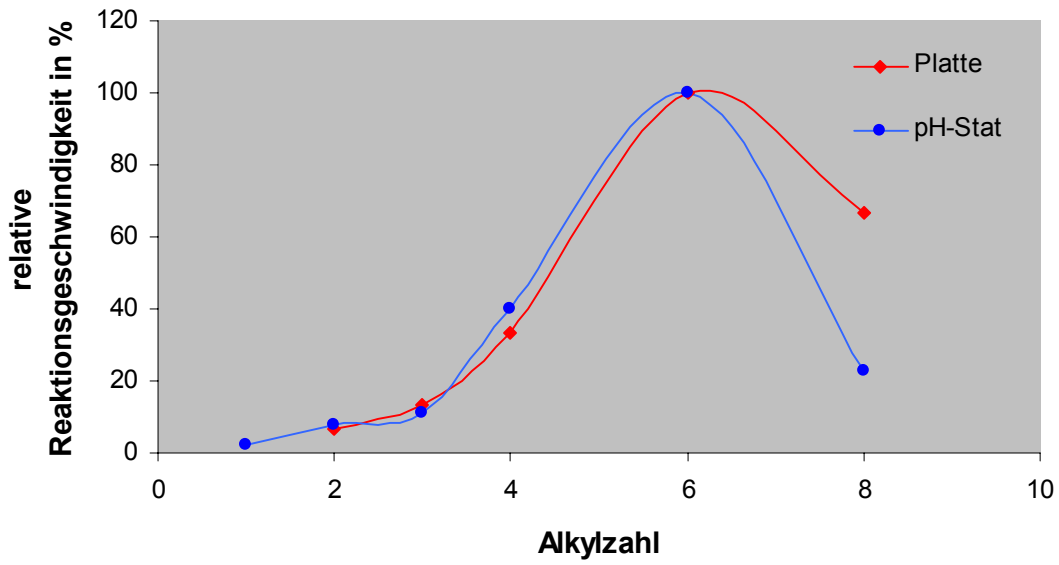


Abb. 12: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkylkettenlänge der Alkoholkomponente

2.2 Assay zur quantitativen Bestimmung von Blutalkohol

Die quantitative Bestimmung von Ethanol ist in verschiedenen Bereichen von großem Interesse. Nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes ist die Bestimmung von Ethanol für verschiedene Erzeugnisse (z. B. für Bier mit geringem Alkoholgehalt, Wein, Spirituosen, Honig u. a.) vorgeschrieben.^[26, 27] In medizinischen Bereichen, vor allem in der Rechtsmedizin, ist die Bestimmung des Blutalkohols von großer Bedeutung. Das analytische Vorgehen bei der Blutalkoholbestimmung regeln die "Richtlinien für die Blutalkoholbestimmung für forensische Zwecke" des Bundesgesundheitsamtes aus dem Jahr 1966. Danach sind prinzipiell vier Einzelmessungen mit zwei unterschiedlichen Messverfahren durchzuführen, deren Mittelwert die Blutalkoholkonzentration (BAK) ergibt. Dabei darf die maximale Abweichung zwischen diesen 4 Einzelwerten höchstens 10 % des Mittelwertes betragen.

Gebäuchliche Messverfahren zur Blutalkoholbestimmung sind das Widmark-Verfahren, die Gaschromatographie und das ADH-Verfahren.^[36]

- Das Widmark-Verfahren, welches bereits seit 1932 angewendet wird, beruht auf einer Redoxreaktion, welche mit einer Farbänderung verbunden ist. Dabei wird das intensiv gelb gefärbte Cr^{VI} zum wenig farbintensiven grünen Cr^{III} reduziert, wobei der Alkohol zum Acetaldehyd oxidiert wird.
- Die Dampfraum-Gaschromatografie, die 1962 von Machata eingeführt wurde, ist eine physikalische Bestimmungsmethode, die auf Adsorptions-/Desorptions-Vorgängen in einer Trennsäule beruht.
- Das ADH-Verfahren, welchem der von Leithoff 1963 eingeführte Auto-Analyzer zum Durchbruch verhalf, ist ein enzymatisches Verfahren, bei dem der biologische Alkoholabbau in der Leber nachgeahmt wird. Dabei bewirkt ADH die Oxidation des Alkohols zum Aldehyd und die Hydrierung des Coenzym NAD^+ zu NADH, dessen spezifische Lichtabsorption bei $\lambda = 340 - 366 \text{ nm}$ gemessen wird. Die Verwendung der ADH zur Ethanolbestimmung geht auf Bücher und Redetzki zurück.^[37] Beutler und Michal verbesserten die enzymatische Ethanolbestimmung, indem sie den gebildeten Acetaldehyd in einer weiteren enzymatischen Reaktion mit ALDH zu Essigsäure umsetzten ("gekoppelte enzymatische Reaktion").^[38] Inzwischen gibt es mehrere Methodenbeschreibungen zum ADH-Verfahren.^[39, 40]

2.2.1 Endpunktmessung zur quantitativen Bestimmung von Blutalkohol

Zur quantitativen Bestimmung von Alkohol wurde das bereits als Detektionssystem genutzte ADH/AIDH-System (Abb. 3) verwendet.

Der Alkohol sollte nicht nur in wässrigen Lösungen sondern auch in Serumproben bestimmt werden. Dazu ist es notwendig, das Serum einer Vorbehandlung mit Perchlorsäure zu unterziehen, um die Proteine zu entfernen.

Weil das pH-Optimum der ADH bei pH 8,8 und das der AIDH bei pH 8 liegt, musste sichergestellt werden, dass der verwendete Puffer in der Lage war, den pH-Wert in dem gewünschten Bereich von 9,0 bis 8,5 konstant zu halten; dafür schien der Kaliumpyrophosphatpuffer geeignet. Um die Reaktionszeit bis zur vollständigen Umsetzung einer bestimmten Alkoholmenge in der Mikrotiterplatte zu bestimmen, musste zuerst eine entsprechende Kinetikmessung durchgeführt werden.

Abb. 13 kann man entnehmen, dass die Umsetzung einer 3,0 ‰ Alkohol-Standardlösung nach 17 min vollständig beendet war. Das bedeutet, dass eine Inkubierung der Mikrotiterplatte von 20 min vor der Endpunktmessung notwendig ist, um einen konstanten Absorptionswert für NADH zu erhalten.

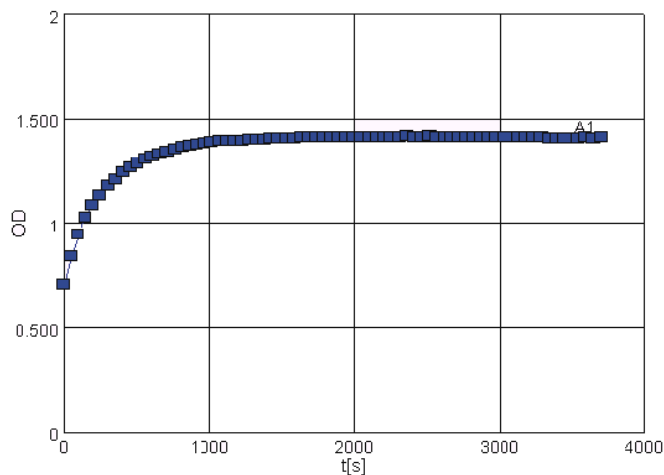


Abb. 13: Absorption von NADH bei $\lambda = 340$ nm bei der Umsetzung der 3,0 ‰ Alkohol-Standardlösung in Kaliumpyrophosphatpuffer

In einer anschließenden Endpunktmessung war die Umsetzung der 3,0 ‰ Alkohol-Standardlösung allerdings nicht nach 20 min, sondern erst nach 35 min beendet. Daher wurde versucht, die Bedingungen (Temperaturkonstanz und Schüttelmodus) während der Inkubationszeit denen der Kinetikmessung im SPECTRA Fluor Plus anzupassen. Zu diesem Zweck wurde die Platte während der Inkubation im Thermomixer temperiert und geschüttelt. Unter diesen Bedingungen war die Reaktion der 3,0 ‰ Alkohol-Standardlösung bereits nach 15 min vollständig beendet. Aus diesen Messungen wurde die Vorgehensweise für die

weiteren Untersuchungen abgeleitet: Endpunktmessung nach 20 min Inkubierung im Thermomixer.

Unter diesen Messbedingungen zeigten die Alkohol-Standardlösungen von Merck (0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 mg Ethanol pro ml Lösung) ein lineares Absorptionsverhalten (s. Abb. 14). Mittels linearer Regression wurde mit den gemessenen OD-Werten der NADH-Absorption der Standardlösungen eine Ausgleichsgerade ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ($0 \leq R^2 \leq 1$) spiegelt die Güte der ermittelten Regressionsgeraden wieder. Für den Idealfall $R^2 = 1$ gilt, dass alle Punkte auf einer Geraden liegen.

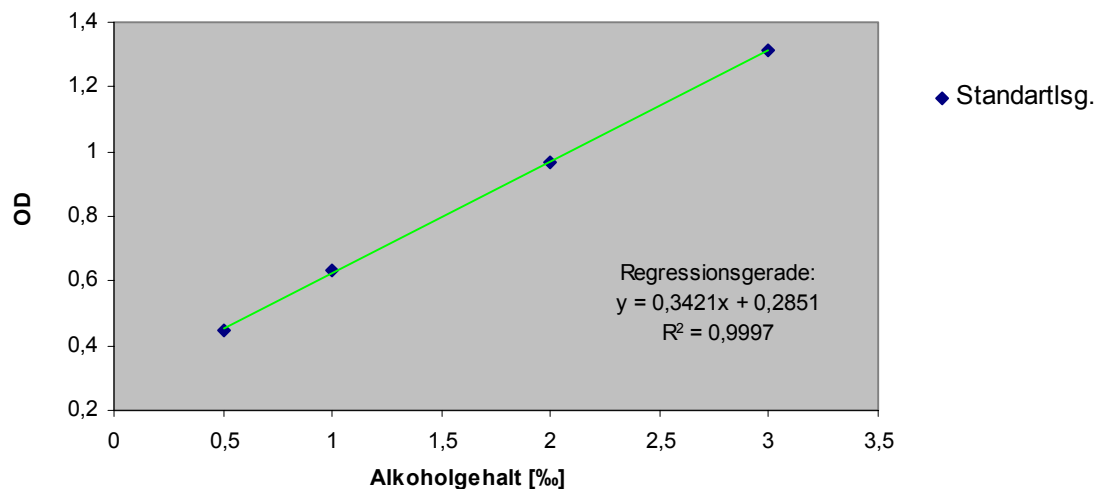


Abb. 14: Endpunktmessung der NADH-Absorption der Alkohol-Standardlösungen (0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 mg Ethanol pro ml Lösung)

Unter Verwendung der linearen Regressionsgeraden lässt sich der Alkoholgehalt der Probelösung berechnen. Dieser mathematische Bezug auf einen externen Standard ist für die quantitativen Bestimmungen von Alkohol in Mikrotiterplatten notwendig. Im Gegensatz zu Messungen in Küvetten ist das Lambert-Beersche Gesetz auf Messungen in Mikrotiterplatten nicht anwendbar, da sich in den engen wells ein Meniskus ausbildet. Die daraus resultierenden Reflexions- und Streueffekte machen eine exakte Bestimmung der Schichtdicke unmöglich. Um selbst minimalen Schwankungen in den OD-Werten (aufgrund veränderter Enzymkonzentration oder veränderter Beschaffenheit der Trägerplatten) vorzubeugen, wurden die Alkohol-Standardlösungen zur Bildung der Regressionsgerade auf jeder Mikrotiterplatte neu bestimmt.

Bereits in Ringversuchen geprüfte humane Serumproben der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie mit einem Alkoholgehalt von 0,5 ‰; 0,88 ‰; 1,21 ‰ und 1,35 ‰ wurden nach dieser Methode vermessen. Zur Ermittlung der Regressionsgeraden wurden auf einer Mikrotiterplatte sowohl die wässrigen Alkohol-Standardlösungen von Merck als auch Alkohol-Standardlösungen von Medichem (0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 mg Ethanol pro ml Serum) eingesetzt. Die Regressionsgeraden in Abb. 15 zeigen deutlich, dass kaum ein Unterschied zwischen der Alkoholmessung in Wasser und Serum besteht.

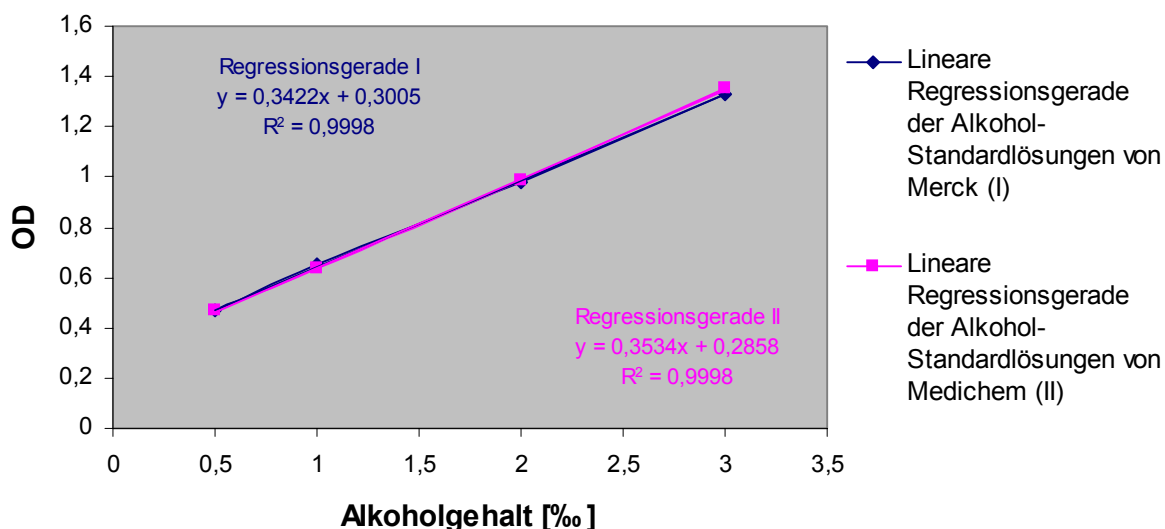


Abb. 15: Vergleich zwischen der Bestimmung der Alkohol-Standardlösungen aus Wasser und Serum durch Bildung der linearen Regressionsgeraden

Unter Verwendung der berechneten Regressionsgeraden (I) und (II) wurde aus den gemessenen OD-Mittelwerten (8 Einzelmessungen) der Serumproben der Alkoholgehalt berechnet (s. Tabelle 7). Die prozentuale Abweichung des berechneten Alkoholgehalts vom Sollwert lag unter 5 %.

Alkohol-Sollwert der Serumprobe in ‰	gemessener OD-Wert der Serumprobe	Berechnung des Alkoholgehaltes unter Verwendung der Regressionsgeraden (I) in ‰	Abweichung vom Sollwert in %	Berechnung des Alkoholgehaltes unter Verwendung der Regressionsgeraden (II) in ‰	Abweichung vom Sollwert in %
0,50	0,468	0,49	2,10	0,52	3,11
0,88	0,609	0,90	2,45	0,91	3,93
1,21	0,714	1,21	0,14	1,21	0,14
1,35	0,771	1,37	1,85	1,37	1,70

Tabelle 7: Berechnung des Alkoholgehalts der Serumproben unter Verwendung der Regressionsgeraden (I) und (II)

2.2.2 Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie e. V.

Die Teilnahme am Ringversuch für Ethanolbestimmung der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie e. V. (DGKC) diente zur externen Überprüfung dieser Methode.

Die Bestimmung des Alkoholgehalts von Blutproben ist grundsätzlich mit zwei voneinander unabhängigen Analysemethoden durchzuführen. Daher wurde zusätzlich zur ADH-Methode eine Bestimmung des Blutalkohols mit der Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) durchgeführt. Für die Kalibrierung der HS-GC-MS wurde jede Konzentrationsstufe der Alkohol-Standardlösungen von Merck fünffach gemessen (s. Abb. 16).

Die Bewertungsgrenzen des Ringversuches zur Bestimmung von Ethanol basieren auf den Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin und sind wie folgt festgelegt:

- Zielwert oberhalb 1 g/l: $\pm 5 \%$
- Zielwert unterhalb 1 g/l: $\pm 0,05 \text{ g/l}$

Für den klinischen Bereich legt die DGKC großzügigere Bewertungsgrenzen fest, die aus den analytischen Streuungen früherer Ringversuche resultieren:

- Zielwert oberhalb 1 g/l: $\pm 8 \%$
- Zielwert unterhalb 1 g/l: $\pm 0,08 \text{ g/l}$

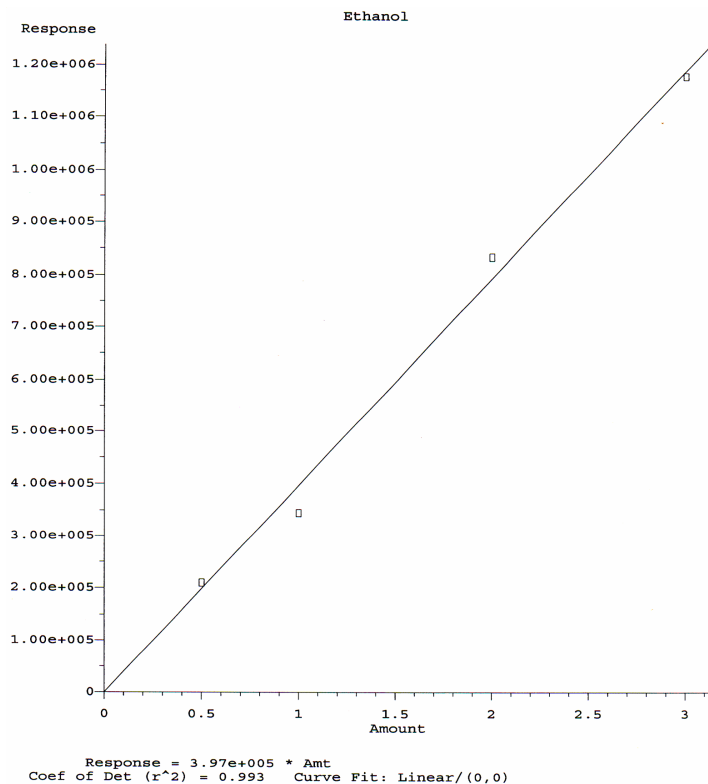


Abb. 16: Kalibriergerade der HS-GC-MS mit den Alkohol-Standardlösungen von Merck (0,5 ‰, 1,0 ‰, 2,0 ‰, 3,0 ‰)

Die Bestimmung von Ethanol aus Serum erfolgte an zwei Ringversuchsproben (A und B) sowohl mit der ADH-Methode als auch mit der HS-GC-MS.

Die Ergebnisse der Alkoholbestimmung sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Der Messwert weicht höchstens ein Prozent vom Zielwert ab, damit lagen die Ergebnisse innerhalb der Bewertungsgrenze für Untersuchungen für forensische Zwecke. Die klinischen bzw. rechtsmedizinischen Anforderungen des Ringversuches für die angegebenen Methoden wurden erfüllt. Die erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch für Ethanolbestimmungen im Serum wurde von der DGKC zertifiziert.

	Probe A	Probe B
Alkoholgehalt [%] Bestimmung über ADH-Methode	1,37	1,22
Alkoholgehalt [%] Bestimmung über HS-GC-MS	1,36	1,21
Zielwert [%] lt. Auswertung des Ringversuchs	1,35	1,21

Tabelle 8: Ergebnisse der Alkoholbestimmung der Ringversuchsproben

2.3 High Throughput Screening mit Detektion von Acetat

In Kapitel 2.1 wurde bereits ein HTS-System beschrieben, das zur Detektion die Alkoholkomponente eines Esters nutzt. Bei dem hier beschriebenen Absorptionsassay soll dagegen die Säurekomponente eines Esters bzw. Amids detektiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den enzymatischen Nachweis von Acetat gelegt. Der Nachweis einer anderen Carbonsäure ist prinzipiell möglich, benötigt aber ein entsprechend angepasstes Enzymsystem.

2.3.1 Entwicklung des Assays

2.3.1.1 Enzymatische Detektion von Acetat

Verschiedene Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von Acetat sind bekannt. Bei der Bestimmung nach Rose wird Acetat durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) phosphoryliert und mittels Hydroxamsäure in Acetylhydroxamsäure überführt. Diese kann als Eisen (III)-Komplex in saurer Lösung photometrisch bestimmt werden.^[41]

In der von Lundquist, Fugmann und Rasmussen beschriebenen Methode wird Acetat mit ATP und Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Dieses reagiert in Gegenwart von Arylamin-Acetyltransferase mit Sulfanilamid zu Acetylsulfanilamid. Der Verbrauch an Sulfanilamid kann photometrisch bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ erfasst werden.^[42]

Die hier verwendete Methode von Bergmeyer und Möllering zum Nachweis von Acetat bzw. Essigsäure beruht auf einer gekoppelten enzymatischen Reaktion mit vorgeschalteter Indikatorreaktion (s. Abb. 17).^[30, 43]

Acetat wird in Gegenwart von Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) mittels CoA und ATP in Acetyl-CoA umgewandelt. Das entstandene Acetyl-CoA reagiert mit Oxalacetat in Anwesenheit von Citratsynthetase zu Citrat; dabei wird CoA wieder freigesetzt. Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion aus L-Malat und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert, welches bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ photometrisch erfasst werden kann. Da bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion ein Gleichgewicht vorliegt, besteht keine direkte lineare Proportionalität zwischen der umgesetzten Acetatmenge und der Absorptionszunahme von NADH.^[44]

Trotzdem kann dieses enzymatische Verfahren als Endpunktmessung auch zur Bestimmung von Essigsäure bzw. Acetat in Lebensmitteln angewendet werden.^[26, 27, 45]

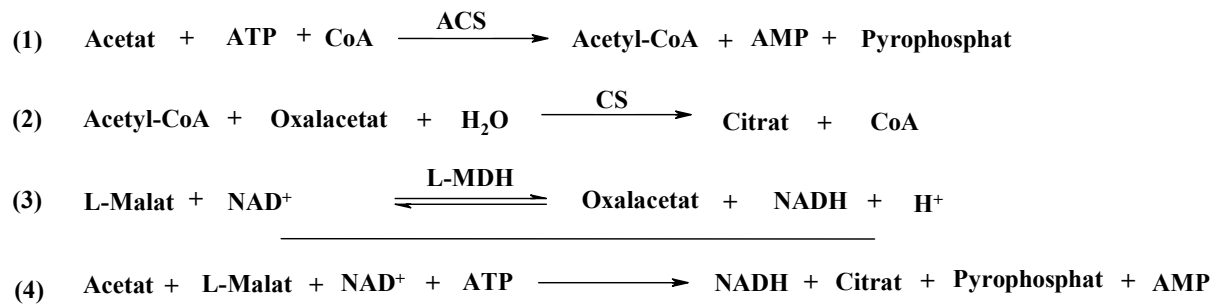


Abb. 17: Schema des Detektionsassays zur Bestimmung von Acetat

Die Wahl des Puffersystems orientierte sich an einschlägigen Literaturstellen.^[27, 41-43] Die Stabilität von NADH in Triethanolaminpuffer über 24 h wurde geprüft (s. Abb. 18). Die prozentuale Zersetzungsrate von NADH in Triethanolaminpuffer über einen Zeitraum von 24 h lag bei 2 % und ist somit hinreichend vernachlässigbar gering.

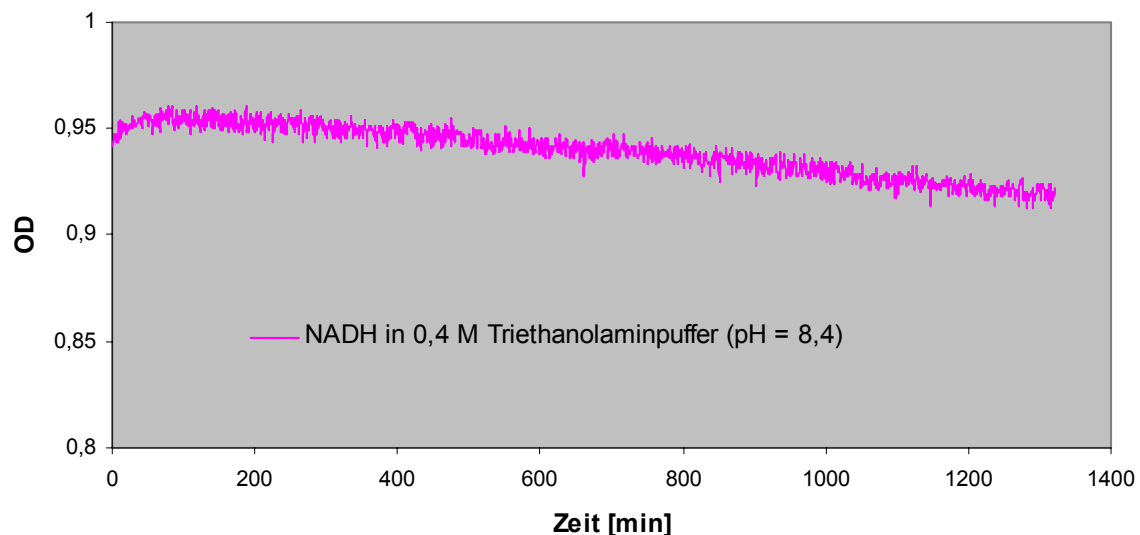


Abb. 18: Absorption von NADH in 0,4 M Triethanolaminpuffer

Das Enzymsystem nach Bergmeyer wurde hinsichtlich einer Nutzung für kinetische Untersuchungen in Mikrotiterplatten untersucht. Erste Kinetikmessungen wurden mit wasserfreiem Natriumacetat durchgeführt; dabei konnten Enzym- und Substratkonzentrationen optimiert werden.

Nachfolgende Abbildung zeigt den kinetischen Verlauf der verschiedenen Reaktionen bei der Bestimmung von Natriumacetat in der Mikrotiterplatte.

Kurve 1: Kinetikmesswerte der Reaktion aller Reagenzien ohne die Enzyme L-MDH, CS und ACS \Rightarrow keine Bildung von NADH möglich

Kurve 2: kinetischer Verlauf der Reaktion nach Zugabe von L-MDH und CS \Rightarrow entspricht der vorgeschalteten Indikatorreaktion (s. Abb. 17 Gleichung 3)

Kurve 3: Kinetikmesswerte der Umsetzung von Acetat durch Zugabe von ACS \Rightarrow schnelle Umsetzung des vorhandenen Acetats (s. Abb. 17 Gleichung 4)

Aufgrund der steigenden Absorption von NADH bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion (Kurve 2) wurden diese Messwerte als „Leerwert“ angenommen und von den Kinetikmesswerten der Acetatumsatzung (Kurve 3) subtrahiert.

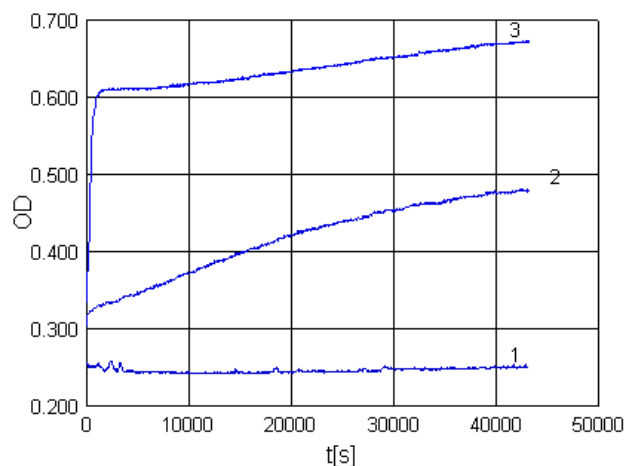


Abb. 19: Kinetikmesswerte der einzelnen Reaktionen bei der Bestimmung von Natriumacetat

Die im well vorhandenen Mengen an Äpfelsäure und ATP limitieren bei überschüssigem Acetat die Reaktion zu Citrat und somit auch die Bildung von NADH. Bei Konzentrationen größer als 2 mM Acetat pro Kavität erhöht sich der OD-Wert nicht mehr, d.h., eine weitere Umsetzung von Acetat findet nicht mehr statt.

In weiteren Testreihen wurde festgestellt, dass der gemessene OD-Wert durch die Eigenabsorption der Enzyme beeinflusst wird. Die Veränderung des OD-Wertes ist enzyspezifisch. Deshalb wurden in weiteren Messungen die Leerwerte unter Zugabe der jeweils eingesetzten Hydrolase ermittelt.

Für die qualitative Bestimmung der Acetatumsatzung ist die Differenzbetrachtung zwischen den Kurvenverläufen der Umsetzung und des Leerwerts relevant.

2.3.2 Screening acetylierter Aminosäuren

Nach der Entwicklung des Detektionssystems zum Nachweis von Acetat wurde der Einsatz des Assay am Beispiel der enzymatischen Hydrolyse acetylierter Aminosäuren getestet (s. Abb. 20). Eingesetzt wurden sowohl Derivate von natürlich vorkommenden als auch synthetischen Aminosäuren (s. Tabelle 9). Nicht kommerziell verfügbare Säureamide wurden synthetisiert (s. Kapitel 4.4.3).

Nach dem Screening wurde die Umsetzung zur freien Aminosäure durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf kieselgelbeschichteten Aluminiumplatten bestätigt.

Anschließend wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Chiralplatten Aussagen zur Enantiomerenreinheit der Aminosäuren getroffen.

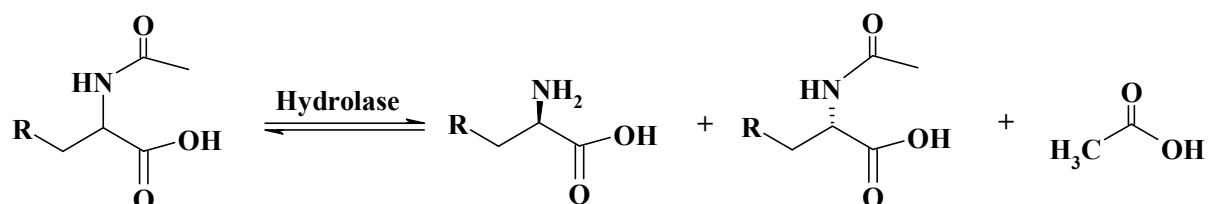


Abb. 20: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von acetylierten Aminosäuren

Derivate von synthetischen Aminosäuren	Derivate von natürlich vorkommenden Aminosäuren
N-Acetyl-D,L-4-brom-phenylalanin (3)	N-Acetyl-D,L-arginin (5)
N-Acetyl-D,L-4-chlor-phenylalanin (4)	N-Acetyl-D,L-leucin (7)
N-Acetyl-D,L-diphenylalanin (6)	N-Acetyl-D,L-phenylalanin (9)
N-Acetyl-D,L-β-2-naphthylalanin (8)	N-Acetyl-D,L-prolin (10)
	N-Acetyl-D,L-serin (11)
	N-Acetyl-D,L-tryptophan (12)
	N-Acetyl-D,L-valin (13)

Tabelle 9: verwendete acetylierte Aminosäuren

Das Screening für die Umsetzung der Verbindungen (**5 - 13**) wurde mit den verfügbaren Hydrolasen (Acylasen, Lipasen und Esterasen) bei 30 °C im SPECTRA Fluor Plus durchgeführt.

Die ersten Messungen dauerten 24 h. Anhand der Reaktionskinetik kann man bereits nach wenigen Stunden erkennen, ob ein Enzym das Substrat hydrolysiert. Bei den meisten Enzymen war der maximale Umsatz bereits nach 20 h erreicht, weshalb die Messdauer zunächst auf 22 h und später sogar auf 20 h verkürzt wurde.

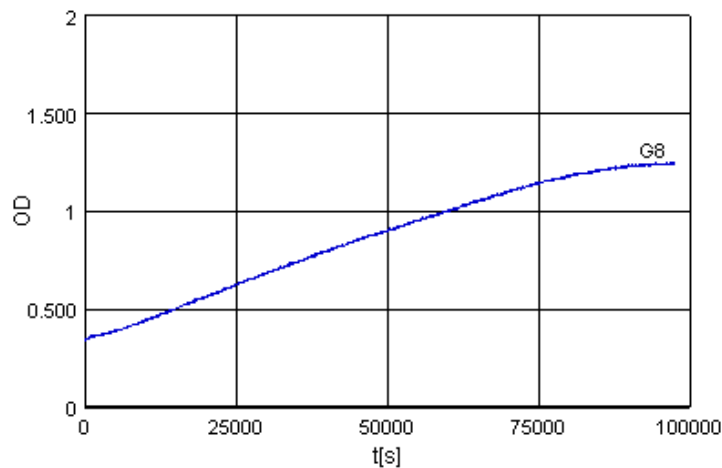


Abb. 21: Kinetikmesswerte der Umsetzung von N-Acetyl-D,L-phenylalanin mit L57

Bei allen acetylierten Aminosäuren wurde neben der enzymatischen Hydrolyse auch eine Referenzmessung der nicht-enzymatischen Hydrolyse vorgenommen. Allerdings war unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei keiner Verbindung eine nicht-enzymatische Hydrolyse messbar.

Aufgrund der Bildung von NADH bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion (s. Gleichung 3 in Abb. 17) lief diese Reaktion auch im Leerwert ab und die Messwerte wurden von der enzymatischen Hydrolyse subtrahiert.

Nachfolgende Abbildung zeigt die enzymatische Hydrolyse von N-Acetyl-D,L-phenylalanin abzüglich der Messwerte des Leerwerts.

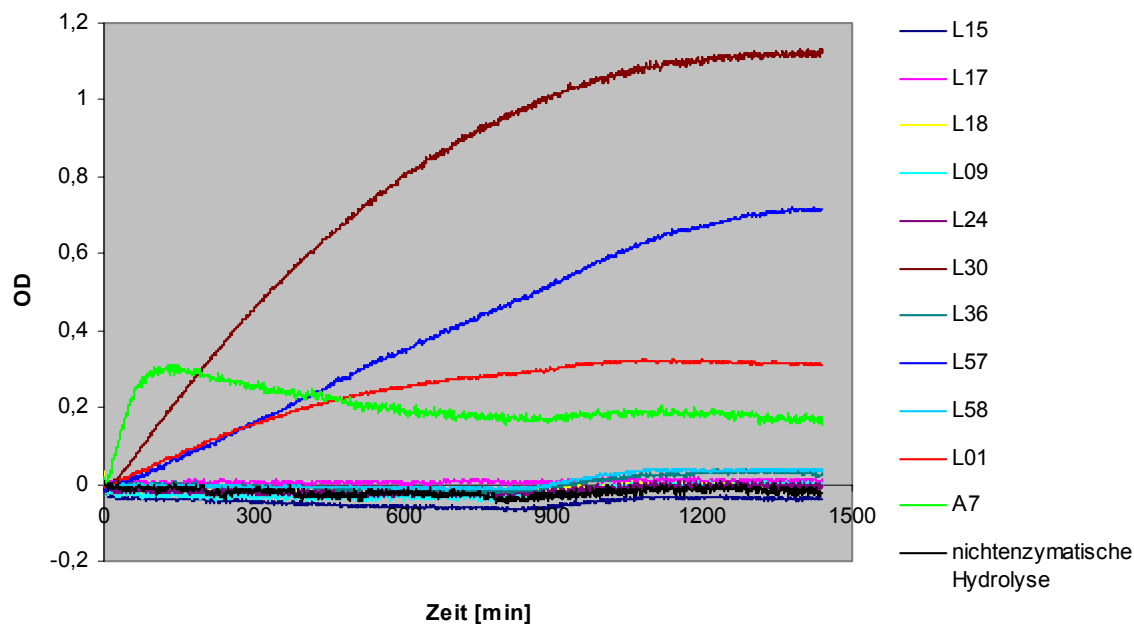


Abb. 22: Enzymatische Hydrolyse von N-Acetyl-D,L-phenylalanin (9) unter Verwendung verschiedener Enzyme

2.3.3 Auswertung der Screening-Versuche

Nach Durchführung der Kinetikmessungen wurden die Enzyme, bei denen ein Umsatz erkennbar war, in drei Typen eingeteilt. Der Kurvenverlauf, der den Umsetzungsgrad des Esters aufzeigt (s. Abb. 22), diente dabei als Kriterium. Es wurde in Enzyme mit geringem (Typ I), Enzyme mit mittlerem (Typ II) und Enzyme mit hohem (Typ III) Umsetzungsgrad unterschieden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Enzyme mit hohem Umsetzungsgrad wahrscheinlich unspezifisch beide Enantiomere einer Verbindung hydrolysieren. Ein mittlerer Umsetzungsgrad sollte in einer spezifischen Wirkung des Enzyms begründet liegen.

Reaktionen mit geringem Umsetzungsgrad könnten durchaus spezifisch ablaufen, sind aber aufgrund des geringen Substratumsatzes schlecht auswertbar und für eine spätere präparative Anwendung ungeeignet.

In Tabelle 10 wurden alle Ergebnisse zusammengefasst. Eine Vielzahl der verwendeten Enzyme zeigte keinen Umsatz mit den acetylierten Verbindungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet, sie einzeln für die jeweilige Verbindung aufzuzählen.

	Typ I	Typ II	Typ III
N-Acetyl-D,L-4-brom-phenylalanin (3)	A2 L15 L57	A7 L25 L30	A5 A8 E03
N-Acetyl-D,L-arginin (5)	A2 LPS L25	A3 E03 L18 L25 L30	A5 A8
N-Acetyl-D,L-phenylalanin (9)	A2 A3 A7 E03 LPS	L25 L30	A8
N-Acetyl-D,L-diphenylalanin (6)	A7 L02 L24 L43 L44 L56 LPS PLE		
N-Acetyl-D,L-4-chlor-phenylalanin (4)	A6 A7 L12 L15 L18	L01 L25 L43 L57	A5 A8 L30
N-Acetyl-D,L-tryptophan (12)	A3 A6 L01 L09 L12 L15 L25 L43	A5 A7 L57	A8 L30

N-Acetyl-D,L-valin (13)	A4	L09	A3
	A6	L30	A5
	A7	L43	A8
	L12		
	L17		
	L54		
N-Acetyl-D,L-leucin (7)	L20	L03	L34
	L61	L17	L43
			L51
N-Acetyl-D,L-prolin (10)	A7		
	L01		
	LStd.		
N-Acetyl-D,L-serin (11)	A7	A3	A5
	L01	L03	A8
	L15	L30	L34
	L17		L43
	L25		L51
	LStd.		
N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin (8)	A7	A5	L30
	L01	A8	
		L25	

Tabelle 10: Einteilung der Enzyme nach Umsatzgrad mit den einzelnen Verbindungen

Die Ergebnisse in Tabelle 10 zeigen, dass vor allem die Acylasen bei den verschiedenen Substraten gleiche Umsatzgrade aufweisen. Zum Beispiel A8-Acylase aus porcine liver zeigt einen hohen Umsatzgrad bei den meisten Substraten.

Auch bei den Lipasen kristallisierten sich einige Enzyme (L25-Lipase aus *Aspergillus niger* und L30-Lipase aus *Penicillium roqueforti*) heraus, die besonders gut geeignet waren, die N-Acetylgruppe von Aminosäuren mit mittleren Umsatzraten abzuspalten.

Bei den Verbindungen **6** und **10** hingegen konnte kein Enzym mit einem geeigneten Umsatzgrad gefunden werden.

2.3.4 Dünnschichtchromatographie DC

Zur Feststellung, ob ein Enzym in der Lage ist, Acetylgruppen selektiv abzuspalten, wurden DC auf Chiralplatten angefertigt. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Trennung von D- und L-Aminosäuren in Form ihrer chiralen Kupferkomplexe (Ligandenaustauschchromatographie).

Um eine exakte Aussage zur Enantiomerenreinheit der Aminosäuren mittels der chiralen Dünnschichtchromatographie treffen zu können, wurden verschiedene Mischungen von L- und D-Naphthylalanin aufgetragen. Dabei waren L- und D-Naphthylalanin bis zu einem Verhältnis von 99,5 : 0,5 deutlich nachweisbar. Durch diese interne Validierung kann eine Enantiomerenreinheit von ee > 99 % verlässlich nachgewiesen werden.

An ausgewählten Beispielen wurde überprüft, ob der vermutete Zusammenhang zwischen Umsetzungsgrad und Stereoselektivität besteht. Anhand der Kurvenverläufe wurden interessante Enzyme ausgewählt und die Reaktionslösungen wurden mittels chiraler DC untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Enzyme vom Typ II tatsächlich selektiv arbeiten, während Typ III Enzyme unspezifisch wirkten. Eine Ausnahme hiervon bildete L30, welches immer selektiv arbeitete, obwohl es bei einigen Substraten wie zum Beispiel N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin (s. Abb. 23) einen hohen Umsetzungsgrad in der Mikrotiterplatte aufwies.

- 1 Umsetzung mit A7
- 2 Umsetzung mit A5
- 3 Umsetzung mit A8
- 4 β -2-Naphthyl-D,L-alanin
- 5 N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin
- 6 Umsetzung mit L30
- 7 Umsetzung mit L25
- 8 Umsetzung mit L01
- 9 2-Naphthyl-L-alanin
- 10 2-Naphthyl-D, L-alanin

Laufmittel:

Methanol : Wasser : Acetonitril \rightarrow

1 : 1 : 4

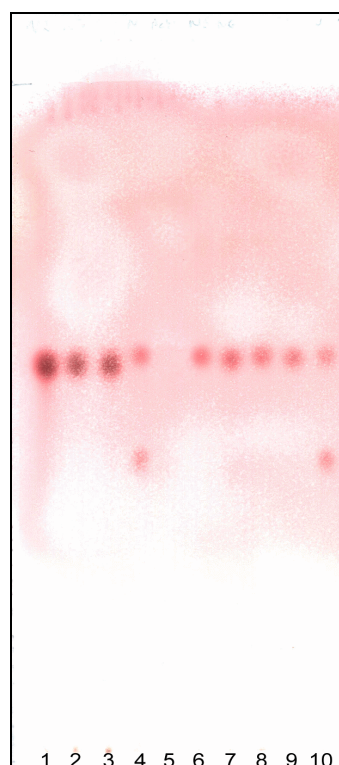


Abb. 23: chirale DC von N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin nach Umsetzung mit verschiedenen Enzymen und Referenzsubstanzen

2.3.5 Untersuchungen am pH-Stat

Um die Auswertung mittels chiraler DC zu untermauern, wurden an einigen ausgewählten Beispielen, u. a. von N-Acetyl-D,L-(2)-naphthylalanin (s. Tabelle 11), unter pH-Stat-Bedingungen einige größere Ansätze durchgeführt.

	Ansatz [mg]	Enzym	Versuchsdauer
N-Acetyl-D,L-naphthylalanin	514	A7	15 h
N-Acetyl-D,L-4-brom-phenylalanin	286	L30	92 h
N-Acetyl-D,L-4-chlor-phenylalanin	968	A2	39 h

Tabelle 11: Umsetzung der N-Acetyl-D,L-Aminosäuren unter pH-Stat-Bedingungen

Diese Umsetzungen wurden entsprechend aufgearbeitet und dabei konnten sowohl die D- als auch L-Aminosäuren isoliert werden. Die optischen Drehwerte stimmten mit den in der Literatur ^[46, 47, 48] Beschriebenen gut überein.

Aminosäure	Drehwert
D-Naphtylalanin	$[\alpha]^{589} = 11,23$ ($c = 0,605$, 0,3 N HCl)
L-Naphtylalanin	$[\alpha]^{589} = - 12,21$ ($c = 0,602$, 0,3 N HCl)
L-4-Brom-phenylalanin	$[\alpha]^{589} = - 25,35$ ($c = 0,505$, Wasser)
D-4-Chlor-phenylalanin	$[\alpha]^{589} = 2,5$ ($c = 0,685$, 1 N HCl)
L-4-Chlor-phenylalanin	$[\alpha]^{589} = - 5,88$ ($c = 0,0,660$, 1 N HCl)

Tabelle 12: optische Drehwerte der isolierten D- und L-Verbindungen

Für die Umsetzung von N-Acetyl-D,L-tryptophan und N-Acetyl-D,L-phenylalanin sind ebenfalls Batch-Versuche in Bearbeitung.

2.4 Glucosidaseassay

Der Entwicklung dieses Testsystems lag eine andere Intention zugrunde.

Mittels der bekannten Reaktion der β -Glucosidase mit 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (s. Abb. 24) sollte die Inhibitorwirkung bestimmter Pflanzenextrakte schnell bestimmt werden.

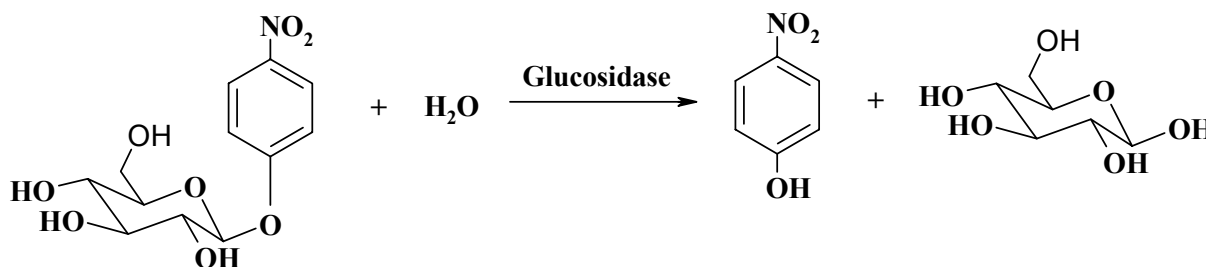


Abb. 24: Reaktion der β -Glucosidase mit 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid

Bereits 1988 wurden Iminozucker von Tepfer und Goldmann^[49, 50] in Convolvulaceen (*Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis*) und Solanaceen (*Atropa belladonna*) gefunden. Die Substanzklasse der Calystegine wurde in einer Vielzahl von Solanaceen^[51, 52, 53, 54] nachgewiesen und diese Verbindungen wurden vorwiegend aus Wurzeln oder Schalen isoliert. Besonders gründlich wurden die als Nahrungsmittel verwendeten Solanaceen, wie Kartoffeln, Paprika und Auberginen untersucht. Auch in Wurzeln und Blättern von Moraceae^[55, 56] wurden Calystegine gefunden.

Calystegin A3 ist ein Inhibitor der β -Glucosidase ($K_i = 4.3 \times 10^{-5} \text{M}$) und ein etwas weniger starker α -Galactosidaseinhibitor ($K_i = 1.9 \times 10^{-4} \text{M}$), B1 und B2 sind stärkere Inhibitoren der β -Glucosidase ($K_i = 3 \times 10^{-6} \text{M}$) und der α -Galactosidase ($K_i = 7 \times 10^{-6} \text{M}$).^[51] Diese Effekte wurden vielfach bestätigt.^[57]

Da β -Glucosidasen auch im menschlichen Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, wurden alle essbaren Früchte und Gemüse der Solanaceen (*Capsicum annum*, *C. frutescens*, *Solanum tuberosum*, *S. melongena*, *Lycopersicon esculentum*, *Physalis a.*, *Ipomoea batatas*, *Morus alba*) mithilfe der GC-MS auf Calysteginvorkommen untersucht.^[51, 52, 53, 54, 58] Calystegine als Glucosidaseinhibitoren könnten interessant für therapeutische Anwendungen sein. So wurde bereits für B2 ein antihyperglykämischer Effekt nachgewiesen.^[59]

Von Dräger^[60, 61, 62, 63, 64] und anderen Arbeitsgruppen^[65] wurden vor allem *Calystegia sepium* und *Solanum tuberosum* auf das Vorhandensein von Calysteginen in Wurzeln, Schalen und Sprossen, auch in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Vegetationsdauer, untersucht.

Unser Interesse galt besonders den Wildformen der als Nahrungsmittel kultivierten Pflanzen aus der Familie der Solanaceae (s. Tabelle 13). Zur Überprüfung der Methode wurden auch Extrakte von Pflanzenmaterial untersucht, welche bereits aus der Literatur als calysteginhaltig bekannt waren (s. Tabelle 14).

Sorte Wildformen		
AB7	LYC 476/79 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Costa Rica)	Blätter
AB8	T 1249/92 - <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill. (Peru)	Blätter
AB9	T 1254/92 - <i>Lycopersicon</i> sp. (Peru) hohe conc.	Blätter
CRBM	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Costarika blau)	Blätter
RT12	T 1261/94 - <i>Lycopersicon</i> sp. (Peru)	Blätter
WKBS	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Peru)	Blätter
Sorte Kulturformen		
AB10/ AB12	LYC 1/86 - <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill. var. <i>pimpinellifolium</i> (unbekannt)	Blätter
AB11	LYC 3/88 - <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Mill. (unbekannt)	Blätter
AB5/ AB14	T 576/85 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Koreanische DVR)	Blätter
AB6	LYC 5/82 - <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill. var. <i>Ribesoides</i> (A. Voss) Lehm. (unbekannt)	Blätter
BBS	<i>Brugmansia</i> (Deutschland)	Blätter
CE1	<i>Nicandra physaloides</i> (Deutschland)	Blätter
CE2	<i>Nicandra physaloides</i> (Deutschland)	unreife Früchte
CE3	<i>Lycium barbarum</i> (Deutschland)	Blätter
RT10	T 567/79 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Georgien)	Blätter
RT11	T 630/81 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Ägypten)	Blätter
RT14	T 1056/88 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Kuba)	Blätter

RT5	T 1056/88 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Kuba)	Blätter
RT6	T 66/79 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Sudan)	Blätter
RT7	T 980/88 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Libyen)	Blätter
RT8	T 928/86 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Mongolei)	Blätter
RT9	LYC 13/81 - <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Convar. Parvibaccatum Lehm. Var. cerasiforme (Dun.) Alef. (Deutschland)	Blätter
TBM	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Harzfeuer, Deutschland)	Blätter
TBN	<i>Physalis philadelphica</i> (Tomatillo)	Blätter

Tabelle 13: auf Calysteginvorkommen untersuchtes Pflanzenmaterial von Wildformen und Kulturpflanzen

AB1	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Rosara, Deutschland)	Keime
AB4	<i>Solanum tuberosum</i> (S. chacoense)	Früchte
KARBS	<i>Solanum tuberosum</i> (Karida, Deutschland)	Blätter
KBN	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Rosara, Deutschland)	Blätter
RT13	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Rosara, Deutschland)	Wurzeln
RT2	<i>Solanum tuberosum</i> (Astarte, Deutschland)	Keime
RT3	<i>Solanum tuberosum</i> (S. chacoense)	Keime
RT4	<i>Solanum tuberosum</i> (S. Juzepczukii)	Früchte
SJBN	<i>Solanum tuberosum</i> (S. Juzepczukii)	Blätter
SJUS	<i>Solanum tuberosum</i> (S. Juzepczukii)	Blüten
SpFN	<i>Solanum tuberosum</i> (S. sparsipilum)	Früchte
SSM	<i>Solanum tuberosum</i> (S. sparsipilum)	Blätter
WKBCS	<i>Solanum tuberosum</i> (S. chacoense)	Blätter
WKFM	<i>Solanum tuberosum</i> (S. vernei)	Früchte

Tabelle 14: zur Kontrolle untersuchtes Pflanzenmaterial, welches lt. Literatur Calystegine enthält

2.4.1 LC-MS-Messungen

Um die große Anzahl von Proben (s. Tabelle 13 und Tabelle 14) schnell auf das Vorhandensein von Calysteginen zu untersuchen, wurden sowohl LC-MS-Untersuchungen als auch ein High-throughput Mikrotiterplattenassay verwendet.

Als Grundlage zur Gewinnung der Extrakte dienten die Arbeiten von Asano et al.^[51, 58]

Dabei wurde aus dem vorliegenden Pflanzenmaterial jeweils ein wässriger Extrakt hergestellt, der über Ionenaustauschersäulen entsprechend gereinigt wurde. Dabei entspricht 1 ml der Probenlösung 1 g des eingesetzten Pflanzenmaterials, wodurch ein Vergleich der unterschiedlichen Extrakte sehr gut möglich wurde.

Aufgrund der guten Löslichkeit der Calystegine in Wasser und Methanol eignet sich die Elektrospray-Massenspektroskopie für deren Nachweis. Zur Entwicklung der Methode wurden deshalb die Calystegine A3, B2, C1, sowie eine Mischung aus diesen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In Tabelle 15 sind die Retentionszeiten für die LC-MS an einer Merck-Säule Superspher[®] 100 RP-18 unter den optimierten Bedingungen angegeben.

	Molare Masse	Retentionszeit [min]
Calystegin A3	160	8,97 - 9,26
Calystegin B2	176,2	4,83 - 4,94
Calystegin C1	192	3,7 - 4,2

Tabelle 15: Retentionszeiten der Calystegine an einer Merck-Säule Superspher[®] 100 RP-18 unter optimierten Bedingungen

Die Calystegine konnten anhand ihrer *m/z*-Signale eindeutig identifiziert werden. Mit dieser Methode lässt sich jedoch nicht die genaue prozentuale Zusammensetzung ermitteln, jedoch ist eine Abschätzung der Gehalte durchaus möglich (s. Tabelle 16).

Probe	mg isolierter Feststoff /ml	CalysteginA	CalysteginB	CalysteginC
AB7	0,396	++	+	-
AB8	0,438	++	+	Spuren
AB9	0,331	+	+	Spuren
CRBM	0,537	+	++	Spuren

RT12	0,584	Spuren	+	Spuren
WKBS	0,124	+	++	-
AB1	0,250	+	+	Spuren
AB10/AB12	0,052; 0,353	++	+	Spuren
AB11	0,283	++	++	-
AB4	0,080	-	(+)	-
AB5/AB14	0,125; 0,187	(+)	+	-
AB6	0,062	-	+	+
CE1	0,170	-	(+)	-
CE2*	0,648	-	Spuren	Spuren
CE3	4,160	-	++	-
EW	9,983	-	++	-
KARBS	0,097	-	++	-
KBM	-	+	+	-
RT10	0,169	+	+	Spuren
RT11	0,211	Spuren	+	Spuren
RT13	0,569	Spuren	Spuren	-
RT14	0,231	(+)	+	-
RT2	0,800	+	++	-
RT3	0,747	+	+	-
RT4	0,173	-	+	-
RT5	0,250	+	+	Spuren
RT6	0,271	-	+	Spuren
RT7	0,217	+	+	-
RT8	1,883	(+)	+	Spuren
RT9	0,152	-	+	Spuren
SJBN	0,718	-	+	-

SJUS	0,948	-	+	-
SpFN	0,771	-	+	-
SSM	0,064	-	+	-
TBM	1,954	++	(+)	-
WKBCS*	0,130	-	-	-
WKFM	0,547	(+)	-	-

Tabelle 16: Auswertung der LC-MS-Spektren (*Dehydratisierungsprodukte gefunden)

Einige Proben, deren Massenspektren interessante Calystegingehalte erwarten ließen, wurden in Folge zur Quantifizierung im Glucosidaseassay eingesetzt.

2.4.2 Mikrotiterplattenassay

Seit langem ist bekannt, dass β -Glucosidase nicht nur natürliche Zuckerderivate spaltet.^[66, 67, 68] Um die enzymatische Aktivität photometrisch bestimmen zu können, werden Substrate verwendet, deren Aglycon im UV oder im sichtbaren Licht detektierbar ist.

Das bei der enzymatischen Hydrolyse von 4-Nitrophenyl-glycosiden mit Glucosidasen entstehende p-Nitrophenol zeigt eine Gelbfärbung und kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 400 - 415 \text{ nm}$ gut vermessen werden. Diese einfache Reaktion lässt sich nicht nur nutzen, um die Aktivität von β -Glucosidase^[66, 69] zu bestimmen, sondern auch um die inhibitorischen Eigenschaften verschiedener Substanzen gegenüber diesem Enzym zu untersuchen.^[57, 70, 71]

Bei dem hier entwickelten Assay wurde die enzymatische Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid mit β -Glucosidase in Natriumacetatpuffer bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ gemessen. Experimentell wird dabei der Reaktionsverlauf bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen vermessen. Gemäß Angaben in der Literatur^[66, 69] ist die hydrolytische Aktivität der β -Glucosidase in einem pH-Bereich von 5 bis 6 optimal. Daher erfolgte eine Bestimmung der Extinktionsmaxima von 4-Nitrophenol bei pH 5 und 6 in Natriumacetatpuffer (s. Abb. 25); bei pH = 6 besitzt 4-Nitrophenol ein zusätzliches Extinktionsmaximum (bei $\lambda = 410 \text{ nm}$).

Weil sowohl 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid als auch das Aglycon im UV-Bereich absorbieren, kann die Hydrolyse des Glycosids nur im sichtbaren Bereich analytisch verfolgt werden.

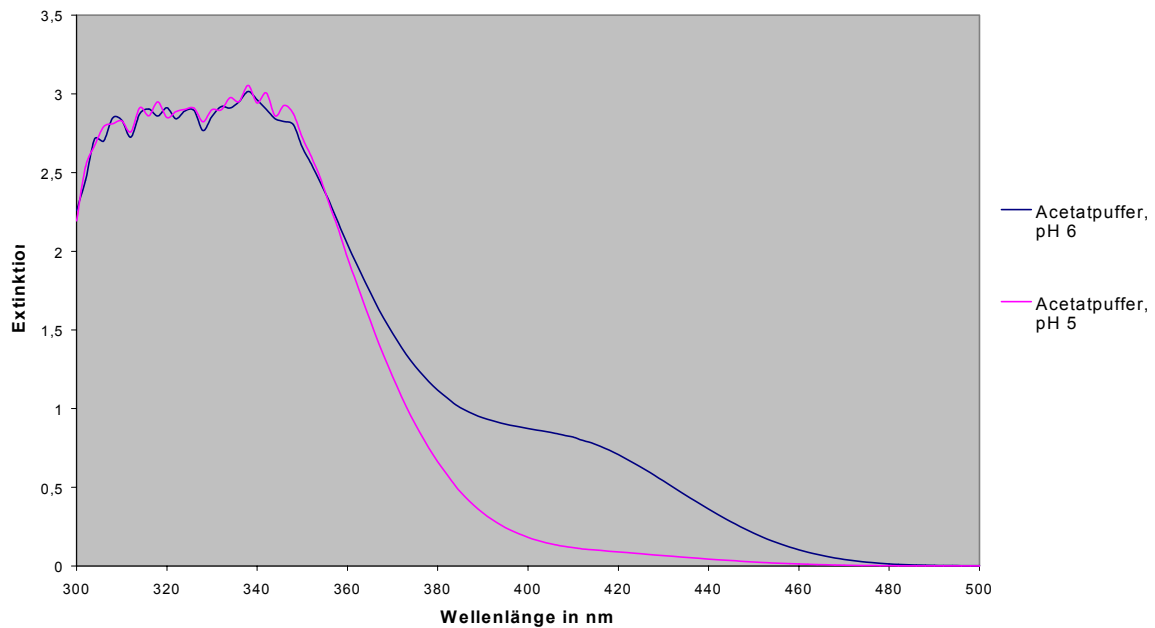


Abb. 25: Extinktionsbestimmung von p-Nitrophenol in Natriumacetat bei unterschiedlichem pH-Wert

Aus den berechneten Anstiegen der Kinetikkurven konnte die Reaktionsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Substratkonzentrationen berechnet werden. Über das Lineweaver-Burk-Diagramm wurde aus 9 Messungen ein mittlerer K_m -Wert von 3,2 mM für die β -Glucosidase ermittelt.

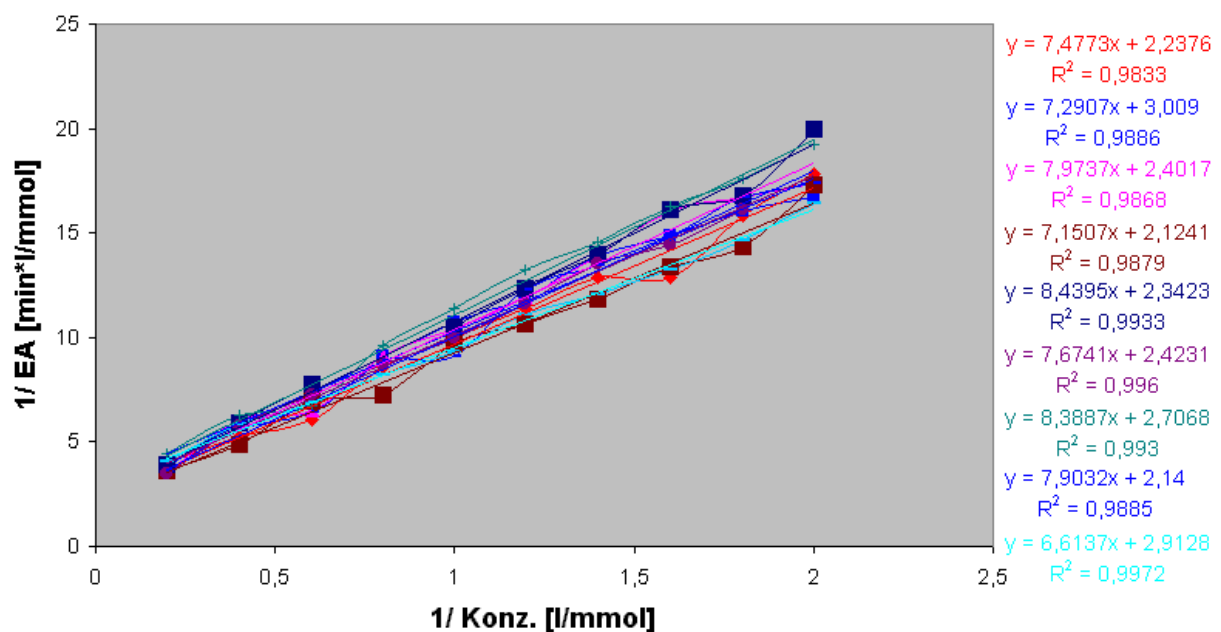


Abb. 26: Lineweaver-Burk-Auftragung von 9 Kinetikmessungen ohne Inhibitor unter gleichzeitiger Berechnung der jeweiligen linearen Regressionsgeraden

Bei der Zugabe eines Inhibitors verlaufen die charakteristischen Messkurven flacher. Zur Überprüfung der Methode wurde Calystegin B2 (kommerzielle Probe von MolecularNature) vermessen. Bereits eine Konzentration von 0,006 mM (0,001mg/ml) pro Kavität hemmt die Substratumsetzung um 48 %.

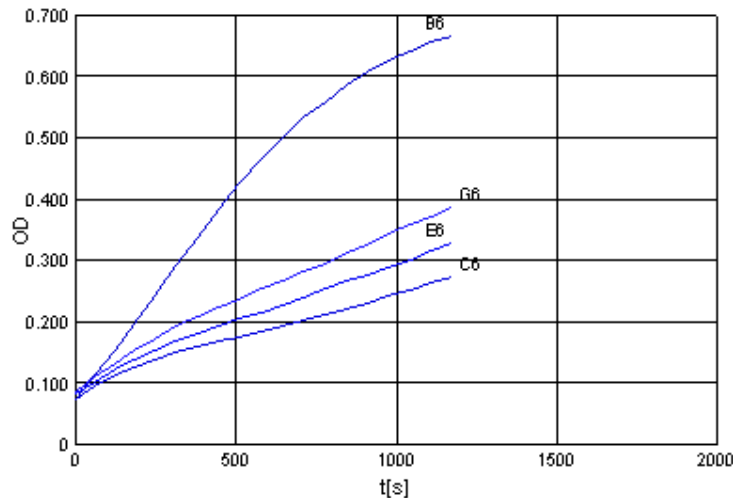


Abb. 27: Messkurven bei einer Substratkonzentration von [S]=1 mM

B6: [I]=0

C6: [I]=0,009 mM

E6: [I]=0,007 mM

G6: [I]=0,006 mM

Dieses Verhalten lässt eine schnelle Aussage zur inhibitorischen Wirksamkeit von Pflanzenextrakten zu. In Tabelle 17 sind die untersuchten Pflanzenextrakte aufgeführt. Dabei wurde die prozentuale Hemmung bei einer Substratkonzentration von [S] = 1 mM bezogen auf den Grundassay ohne Inhibitor berechnet. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Proben durchführen zu können, wurde die prozentuale Hemmung auf die eingesetzte Inhibitorkonzentration pro Kavität umgerechnet. Der so berechnete Faktor Q* (Hemmstärke) ist ein Maß für die Stärke einer Inhibierung durch Inhaltsstoffe des eingesetzten Pflanzenmaterials. Aus diesem Faktor lassen sich mehrere Schlüsse ziehen: Hohe Werte stehen für Stoffe, die auch in kleinen Mengen starke Hemmungen hervorrufen. Kleine Werte erhält man bei Extrakten, die nur schwach bis gar nicht inhibieren.

Eine besonders hohe inhibitorische Wirkung zeigten in diesem Assay die Proben SJUS, SSM, WKBCS und RT3 (siehe Tabelle 14) aus der Familie *Solanum tuberosum*. Bei den Tomaten enthielt die Familie *Lycopersicon pimpinellifolium* (AB6 und AB8) höhere Inhibitorkonzentrationen als *Lycopersicon esculentum*.

Probe	mg/ml isolierter Feststoff pro Kavität	prozentuale Hemmung bei [S] = 1 mM	Q*= Hemmstärke bezogen auf eingesetzte Konzentration	inhibitorische Wirksamkeit
AB11	0,007	8 %	11	gering
AB12	0,009	10 %	11	gering
AB6	0,003	31 %	103	groß
AB7	0,02	22 %	11	gering
AB8	0,011	26 %	24	mittel
AB9	0,008	kaum sichtbar	0	-
B2	0,001	48 %	480	sehr groß
BBS	0,009	60 %	67	groß
BBS	n. b.	50 %		groß
CRBM	0,013	11 %	9	mittel
EW	0,06	51 %	9	mittel
KARBS	0,002	kaum sichtbar	0	-
RT11	0,005	kaum sichtbar	0	-
RT12	0,015	7 %	5	gering
RT3	0,019	63 %	33	groß
RT8	0,024	24 %	10	gering
SJUS	0,008	44 %	55	groß
SpFN	0,019	40 %	21	groß
SSM	0,002	13 %	65	groß
TBBN	n. b.	-	-	-
TBM	0,049	11 %	2	gering
WKBCS*	0,007	45 %	64	groß
WKBS	0,006	11 %	18	mittel
WKFM	0,003	kaum sichtbar	0	-

Tabelle 17: Auswertung der mittels Glucosidaseassay untersuchten Pflanzenextrakte

Vergleiche mit den LC-MS-Untersuchungen zeigten, dass Pflanzenextrakte, die hauptsächlich Calystegin B2 enthalten, die deutlich stärkere inhibitorische Wirkung zeigen.

2.5 Ureaseassay

2.5.1 Allgemeines

1926 wurde das Enzym Urease von Sumner aus Sojabohnenmehl als erstes Enzym in reiner kristalliner Form dargestellt.^[17]

Urease, welche hauptsächlich in Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen vorkommt, spaltet Harnstoff hydrolytisch in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid. Die biologische Bedeutung dieses Vorgangs liegt darin, dass der im Verlauf des tierischen Stoffwechsels im Harnstoff gebundene Stickstoff in anorganische, von Pflanzen verwertbare Stickstoffverbindungen zurückgeführt wird. Damit spielt die Urease im Stickstoffkreislauf eine bedeutende Rolle.

Auch medizinisch gesehen ist die Urease von großer Bedeutung:

Das Bakterium *Helicobacter pylori*, welches für viele schwere Krankheiten wie Verdauungsstörungen, Magen- und Darmgeschwüre, sowie Magenkrebs verantwortlich gemacht wird, nutzt ebenfalls die Urease-Reaktion. Die massenhafte Freisetzung von Ammoniak puffert die Magensäure ab und erlaubt es dem Bakterium, unser Magenmilieu verstärkt zu kolonisieren.^[28]

2.5.2 Entwicklung des Assays

Zur Bestimmung der Ureaseaktivität bzw. zum Nachweis von Harnstoff und Ammoniak wurden bereits früher colorimetrische Urease-Schnelltests, potentiometrische und enzymatische Verfahren entwickelt.^[30]

Unser besonderes Interesse fand ein enzymatisches Nachweisverfahren. Dabei wird in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion (s. Abb. 28) die Harnstoffhydrolyse anhand der Abnahme der NADH-Extinktion bestimmt.^[72]

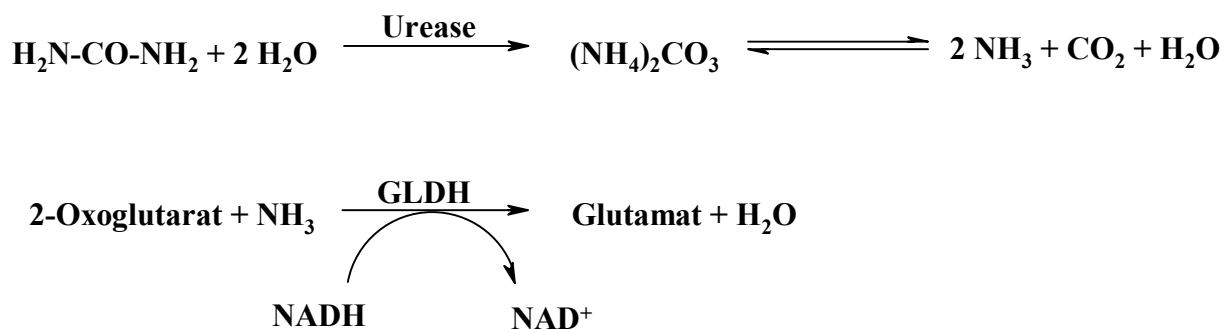


Abb. 28: Reaktionsschema des Ureaseassays nach Kaltwasser und Schlegel^[72]

Dieses Enzymsystem wird bereits als Küvettentest zur quantitativen Bestimmung von Harnstoff verwendet. Hierbei erfolgt eine Endpunktmessung im Spektrophotometer bei $\lambda = 340 \text{ nm}$.^[27, 73] In der Literatur wurden für diesen Enzymtest verschiedene Puffersysteme beschrieben, sowohl Kaliumphosphat-^[73] als auch Triethanolaminpuffer^[27, 72]. Für diesen Assay wurde der Triethanolaminpuffer eingesetzt, weil bereits die Stabilität von NADH in diesem Puffer untersucht wurde (s. Kapitel 2.3.1).

Zunächst wurde die enzymatische Hydrolyse von Harnstoff in der Küvette bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ gemessen (s. Abb. 29). Die Reaktion war bei einer Substratkonzentration von $0,2 \mu\text{mol}$ bereits nach 7 min beendet.

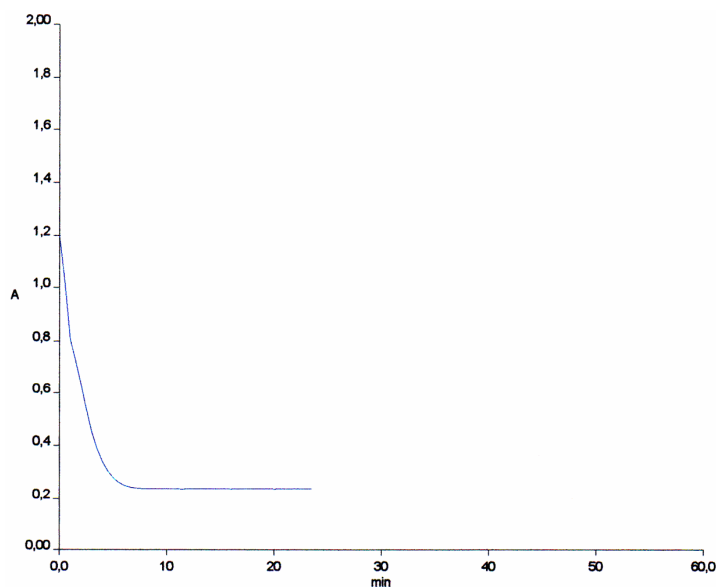


Abb. 29: Messung der Absorptionsabnahme von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ in der Küvette

In der Mikrotiterplatte wurde der Reaktionsverlauf bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen (s. Abb. 30). Mit zunehmender Harnstoffkonzentration steigt die Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Urease-Aktivität wurde in weiteren Tests mit einem bereits in der Literatur^[74] beschriebenen Inhibitor gehemmt. Thioharnstoff zeigt in den geringen Konzentrationen ($0,025$ und $0,051 \text{ M}$) kaum eine inhibierende Wirkung. Erst ab einer Konzentration von $0,125 \text{ M}$ ist eine deutliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit nachweisbar (s. Abb. 31).

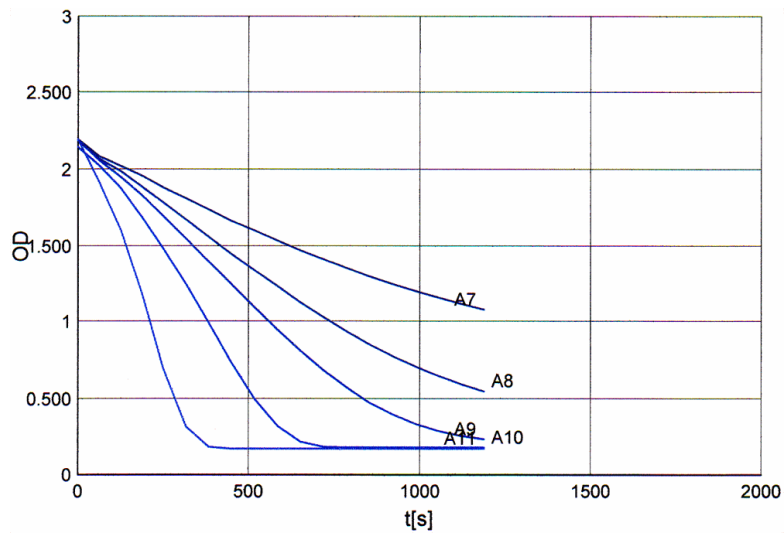


Abb. 30: Messung der Absorptionsabnahme von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$

A7: [S] = 0,21 mM
 A8: [S] = 0,31 mM
 A9: [S] = 0,42 mM
 A10: [S] = 0,63 mM
 A11: [S] = 1,26 mM

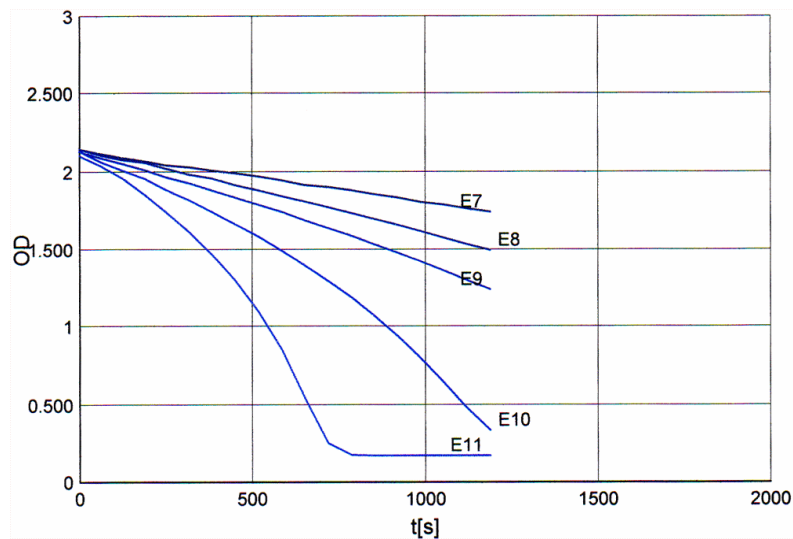


Abb. 31: Messung der Absorptionsabnahme von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ mit Inhibitor [I] = 0,125 M

E7: [S] = 0,21 mM
 E8: [S] = 0,31 mM
 E9: [S] = 0,42 mM
 E10: [S] = 0,63 mM
 E11: [S] = 1,26 mM

Ein Vergleich der beiden Reaktionskinetiken mit und ohne Inhibitor zeigt, dass man die Ureaseaktivität in der Mikrotiterplatte bestimmen kann.¹

¹ Die Bestimmungen weiterer Urease-Inhibitoren sind derzeit in Arbeit.

3 Zusammenfassung

Es wurden substrat-, zeit- und somit kostensparende Absorptionsassays mit Detektion von Alkohol bzw. Acetat entwickelt, die ein Screening verschiedener Hydrolasen hinsichtlich ihrer Substratspezifität zulassen. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Möglichkeit einer schnellen Untersuchung vieler Enzyme; dies führt effizient zu Kriterien zur Auswahl geeigneter Enzyme. Aus den Kinetikkurven des Assays lassen sich Aussagen über die Wirkungsweise der Enzyme ableiten; die dabei gefundenen Ergebnisse konnten durch Batch-Versuche erfolgreich bestätigt und untermauert werden. Somit kann die Durchführung zeitaufwendiger Messungen unter pH-Stat-Bedingungen auf die jeweils als interessant erkannten Enzyme beschränkt werden. Neben dem Screening von Enzymen ist der entwickelte Assay auch für die Optimierung von Reaktionsbedingungen einsetzbar.

Im Fall des HTS-Systems mit Detektion des Alkohols wurde in allen Versuchen grundsätzlich bei einem pH-Wert von 7.0 gearbeitet, um eine nicht-enzymatische Hydrolyse der Ester weitestgehend zu unterbinden. Durch den eingesetzten PIPES-Puffer konnte eine ausreichende Stabilität des Coenzym NADH gewährleistet werden.

Die enzymatische Hydrolyse des Esters (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenylcyclopropanocarboxylat (**1**) wurde mit 22 Enzymen untersucht. Über eine gekoppelte enzymatische Reaktion konnte die Reaktionskinetik der Hydrolyse von **1** verfolgt werden. Anhand des Kurvenverlaufes, der den Umsetzungsgrad des Esters aufzeigt, konnten Aussagen zur Stereoselektivität der eingesetzten Enzyme getroffen werden. Anschließende HPLC-Untersuchungen konnten die getroffenen Aussagen bestätigen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur Ethanol, sondern auch höhere, unverzweigte Alkohole mit diesem System detektierbar sind. Die dabei erhaltenen Kinetiken unter Verwendung verschiedener (\pm)-(1 *RS*, 4 *SR*)-4-Acetamido-cyclopent-2-en-1-carbonsäureester sind mit den Umsetzungen unter pH-STAT-Bedingungen bestens vergleichbar.

Es konnte nachgewiesen werden, dass selbst eine exakte Bestimmung von Blutalkohol mittels Endpunktmessung in Mikrotiterplatten möglich ist. Der hierfür verwendete Kaliumpyrophosphatpuffer war in der Lage, den pH Wert in dem gewünschten Bereich nach Zusatz von Perchlorsäure konstant zu halten. Damit wurde sichergestellt, dass die Enzymaktivität auf gleich bleibendem Niveau gehalten werden konnte. Auch die Stabilität von NADH war in diesem Puffersystem gewährleistet (s. Abb. 4 und Abb. 13).

Die Ermittlung des Alkoholgehaltes erfolgte über die Errechnung einer linearen Regressionsgeraden aus den gemessenen OD-Werten der Alkohol-Standardlösungen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das verwendete Messverfahren unabhängig von der jeweils verwendeten Trägerlösung anwendbar ist (s. Abb. 15). So ergeben sich in Wasser und Serum praktisch identische Regressionsgeraden.

Die Zuverlässigkeit der von uns entwickelten Methode konnte in einem Ringversuch der DGKC bestätigt werden. Die dabei ermittelten Messwerte liegen deutlich innerhalb der vorgegebenen Toleranzen. Die Methode wurde deshalb für den klinischen und forensischen Bereich von der DGKC zertifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine qualitative Bestimmung von Acetat in Mikrotiterplatten möglich ist. Aus kinetischen Untersuchungen konnten selektiv wirkende Hydrolasen für die enzymatische Racematspaltung an N-Acetyl-D,L-Aminosäuren ermittelt werden. Durch Kombination mit Dünnschichtchromatographie unter Verwendung chiral-impregnierter Platten konnten die relevanten Enzyme sehr schnell und zuverlässig gefunden werden. Batch-Versuche unter pH-Stat-Bedingungen bestätigten die Screening-Versuche; die entsprechenden D- und L- Aminosäuren konnten isoliert werden.

Im Fall des Glucosidaseassays konnte gezeigt werden, dass eine Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Pflanzenextrakten in der Mikrotiterplatte möglich ist. Damit kann in kurzer Zeit eine Aussage über die Stärke der Inhibierung einer Vielzahl von Proben getroffen werden. In Kombination mit LC-MS Untersuchungen lassen sich damit sehr konkrete Aussagen erhalten. Die LC-MS Methode bestimmt dabei qualitativ, welche Calystegine in der Probe vorliegen, während der neu entwickelte Assay die Stärke einer Enzymhemmung erfasst. Somit lässt sich nach Anwendung beider Methoden eine relevante Aussage zum Calystegingehalt des jeweiligen Pflanzenextraktes ableiten.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Entwicklung eines Ureaseassay zeigten, dass sowohl die Aktivität des isolierten Enzyms als auch die inhibitorische Wirksamkeit von zugesetzten Substanzen mittels Reaktionskinetik bestimmt werden kann. Auch ist dieser Test geeignet, aus einer Reihe möglicher Urease-Inhibitoren rasch die Wirksamsten zu identifizieren.

Die Verwendung enzymatischer Reaktionen in Mikrotiterplattensystemen eignet sich sowohl zur Suche nach geeigneten Enzymen für synthetische Substrate, als auch für Untersuchungen an Substanzen hinsichtlich ihres Einsatzes als mögliche Inhibitoren.

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte und Zubehör

Zum Messen der Mikrotiterplatten wurde der Multifunktionsreader "SPECTRA Fluor Plus" der Firma Tecan verwendet. Mit diesem vollautomatischen, computergesteuerten Reader lassen sich sowohl Absorptions- als auch Fluoreszenz- sowie Bio- bzw. Glow-Lumineszenz-Messungen durchführen. Für den Absorptionsmodus standen zwei Filter (340 nm und 415 nm) zur Verfügung. Die Definition der Plattenparameter und die individuelle Optimierung der Messparameter erfolgte über die Software "easy win kinetics".

Es wurden Mikrotiterplatten aus Polystyrol von Nunc mit 96 Kavitäten (wells) und Flachboden verwendet. Zur Herstellung der Lösungen und Pipettieren der Lösungen in die wells standen verschiedene fixe (1µl; 25µl; 50µl; 250µl; 500µl; 1000µl) und variable (2-20µl; 10-100µl; 100-1000µl) Einkanalpipetten sowie manuelle (0,5-10µl; 5-50µl; 25-200µl) und elektronische (0,5 -10µl; 5-100µl, 20-300µl, 50-1200µl) Mehrkanalpipetten der Firma Eppendorf zur Verfügung. Zusätzlich wurde für den Glucosidaseassay die Finnpipe[®] Multistepper von Labsystems benutzt, eine 8-Kanalpipette, welche die aufgenommene Lösung in mehreren Schritten (24 x 50 µl, 12 x 100 µl, 8 x 150 µl, 6 x 200 µl, 5 x 250 µl) wieder abgeben kann.

Die pH-Stat-Untersuchungen wurden an einem Titrino 718 von Methrom durchgeführt.

Die CD-Spektren wurden an dem Spektropolarimeter J 710 von Jasco aufgenommen.

Die Aufnahme der ¹H und ¹³C Spektren erfolgte an den Geräten Varian Gemini 200 und Varian VXR 400. Durch folgende Symbole wurden die Signalmultiplizitäten gekennzeichnet: s (Singulett), d (Dublett), dd (dublettisches Dublett), t (Triplett), q (Quadruplett) und m (Multipllett).

Die UV-Vis Spektren wurden mit dem Lambda 14 von Perkin Elmer aufgenommen und die Elementaranalysen wurden mit dem LECO CHNS-932 durchgeführt.

Die Schmelzpunkte (unkorrigiert) wurden mit einem Boetius-Heiztischmikroskop bestimmt.

Für die LC-MS Messungen wurde eine Merck-Hitachi LC Pumpe 7100 und eine Merck-Säule Superspher[®] 100 RP-18 (125x2 mm) direkt mit der API-Quelle eines Finnigan LCQ ESI Massenspektrometers verbunden.

Die HPLC-Untersuchungen erfolgten an einem Merck Hitachi LaChrom-System. Detektiert wurde mit einem DAD L-7450 bei $\lambda = 235$ nm und dem Chiralyzer von IBZ Messtechnik.

Die HS-GC-MS Messungen wurden an einem HP 7694 Headspace Sampler in Verbindung mit einem HP 6890 GC System und einem HP 5373 Mass Selective Detector durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie erfolgte an kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄) von Merck oder an Chiraplate Dünnschichtplatten (für die Enantiomerentrennung) von Aldrich bzw. Macherey-Nagel. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm oder durch Anfärben mit einer 1% Ninhydrinlösung und anschließender Erwärmung.

4.2 Enzyme

4.2.1 Hydrolasen

Acylasen (E.C. 3.5.1.14; *E.C. 3.4.13.-)

A6	Acylase I <i>Aspergillus mellus</i>	Fluka	1,6 U/mg
A7	Acylase I <i>Aspergillus sp.</i>	Sigma	
A8	Acylase I Hog kidney	Fluka	14,2 U/mg
A5	Acylase I Porcine kidney	Serva	15 U/mg
A1	Acylase I porcine kidney	Sigma	2,04 U/mg
A2	Amano Acylase <i>Aspergillus mellus</i>	Aldrich	30 U/mg
A3	Acylase <i>Streptomyces toyocaensis</i>	Fluka	46 U/g
A4*	Acetamidocinnamat Acylase <i>Brevibacterium sp.</i>	Fluka	5,2 U/ml

Esterasen (E.C. 3.1.1.1)

E01	Esterase <i>Bacillus sp.</i>	Fluka	0,15 U/mg
E02	Esterase <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Fluka	0,41U/mg
E03	Esterase <i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	Fluka	0,14 / 0,082 U/mg
E10	Esterase <i>Candida lipolytica</i>	Fluka	0,1 U/mg
E09	Esterase Hog liver = PLE	B&M	128 U/mg
E16	Esterase Horse liver	Fluka	0,74 U/mg
E04	Esterase <i>Mucor miehei</i>	Fluka	2,2 U/mg
E15	Esterase Porcine liver	Sigma	230 U/mg
E14	Esterase Rabbit liver	Sigma	90 / 100 U/mg
E08	Esterase EL 9, <i>Rhizopus arrhiszus</i>	ASA	600 U/g
E18	Esterase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fluka	2,55 U/g
E07	Esterase <i>Thermoanaerobium brockii</i>	Fluka	1,7 U/mg

Lipasen (E.C. 3.1.1.3)

L55	Lipase <i>Achromobactor</i>	Applichem	20 U/g
L56	Lipase <i>Alcaligenes</i>	Applichem	100 U/g
L25	Lipase <i>Aspergillus niger</i>	Fluka	3,41 U/g
L01	Lipase A <i>Aspergillus Niger</i>	Amano	n.b.
L51	Lipase <i>Aspergillus oryzae</i>	Fluka	58 U/mg
L28	Lipase <i>Candida antarctica</i>	Fluka	3,3 U/mg

Experimenteller Teil

L52	Lipase NOVOZYM 868 <i>Candida antarctica</i>	Novo Nordisk	ca. 5 U/mg
L54	Lipase NOVOZYM 525 <i>Candida antarctica</i>	Novo Nordisk	ca.5 U/mg
L57	Lipase <i>Candida antarctica</i> Form A	Fluka	2,2 U/mg
L58	Lipase <i>Candida antarctica</i> Form B	Fluka	9,15 U/mg
L41	Lipase <i>Candida cylindracea</i>	Sigma	60 U/mg
L06	Lipase <i>Candida cylindracea</i>	Fluka	2,3 / 2,06 U/mg
L35 / L04	Lipase <i>Candida cylindracea</i> Typ VII	Sigma	943 U/mg
L11	Lipase LE 11 <i>Candida cylindracea</i>	ASA	18,2 U/mg
L22 / L27	Lipase <i>Candida lipolytica</i>	Fluka	1 U/mg
L39	Lipase <i>Candida rugosa</i>	Fluka	37 U/mg
L08	Lipase <i>Candida rugosa</i>	Sigma	756 U/mg
L09	Lipase AY <i>Candida rugosa</i>	Amano	n.b.
L47	Lipase <i>Candida utilis</i>	Fluka	0,1 U/mg
L36	Lipase <i>Chromobacterium viscosum</i> Typ XII	Sigma	3,58 U/mg
L45	Lipase Hog pancreas	Fluka	2,55 U/mg
L31	Lipase <i>Mucor javanicus</i>	Fluka	5 U/g
L18	Lipase M <i>Mucor javanicus</i>	Amano	n.b.
L24 / L20	Lipase <i>Mucor miehei</i>	Fluka	1,3 U/mg
L30 / L32	Lipase <i>Penicillium roquefort</i>	Fluka	1,8 U/g 1,9 U/g
L05	Lipase Porcine Pancreas, Typ II, crude	Sigma	41 U/mg
L42	Lipase Porcine Pancreas, Typ VI-S	Sigma	56000 U/mg
L44	Lipase <i>Pseudomonas cepicia</i>	Fluka	609 U/mg
L21 / L23	Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fluka	31,5 U/mg 42,5 U/mg
L17	Lipase P <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano	n.b.
L40	Lipase <i>Pseudomonas</i> species, Typ XIII	Sigma	36 u/mg
L61	Lipase <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Fluka	5 U/mg
L50	Lipase <i>Rhizomucor miehei</i>	Fluka	0,48 U/mg
L38 / L33	Lipase <i>Rhizopus arrhizus</i>	Fluka	2,7 U/mg 1,5 U/mg

L43	Lipase Rhizopus arrhizus, Typ XI	Sigma	985.900 U/mg
L29	Lipase Rhizopus delemar	Fluka	45,6 U/mg
L60	Lipase Rhizopus delemar	Fluka	0,44 U/mg
L03	Lipase F-AP15 Rhizopus javanicus	Amano	n.b.
L53	Lipase NOVOZYM 388 Rhizopus miehei	Novo Nordisk	ca. 20 U/mg
L26	Lipase Rhizopus niveus	Fluka	2,6 U/mg
L10	Lipase LE 9 Rhizopus niveus	ASA	0,230 U/mg
L02	Lipase N-conc. Rhizopus niveus	Amano	n.b.
L59	Lipase Rhizopus oryzae	Fluka	5 U/g
L46	Lipase Thermus aquaticus	Fluka	3,4 U/g
L48	Lipase Thermus flavus	Fluka	0,69 U/g
L49	Lipase Thermus thermophilus	Fluka	0,64 U/g
L16	Lipase Wheat germ	Fluka	0,1 u/mg
L34	Lipase Wheat germ, Typ I	Sigma	7,6 U/mg
L14	Lipolase	Altbestand	4193 U/mg
L13	Lipolase 100 L = L12 100 L EX, Thermomyces (gentechnisch veränderter Aspergillus Stamm)	Novo Nordisk	100 U/mg
L12	Lipolase 100 L EX = L 13 100 L	Novo Nordisk	100 U/mg

4.2.2 Weitere Enzyme

Dehydrogenasen

ADH	Alkoholdehydrogenase (E.C. 1.1.1.1) yeast	Rochè	300 U/mg
ALDH	Aldehyddehydrogenase (E.C. 1.2.1.5) yeast	Rochè	20 U/mg
GIDH	Glutamatdehydrogenase bovine liver (E.C. 1.4.1.3)	Fluka	45 U/mg
MDH	L-Maleatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)	Rochè	1200 U/mg

Sonstige Enzyme

ACS	Acetyl-CoA Synthetase yeast (E.C. 6.2.1.1)	Rochè	3 U/mg
CS	Citrat Synthase pig heart (E.C. 4.1.3.7)	Rochè	110 U/mg
	β -Glucosidase almonds (E.C. 3.2.1.21)	Fluka	~ 14 U/mg
	Urease jack beans (E.C. 3.5.1.5)	Fluka	35 U/mg

Coenzyme

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat Dinatriumsalz	Rochè	100%
CoA	CoenzymA	Rochè	85 %
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid	Rochè	ca. 100%
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid Dinatriumsalz	Rochè	ca. 100%

Rochè: früher Boehringer Mannheim

4.3 Chemikalien

Chemikalien für den Assay zur Bestimmung von Alkohol

- (1) (±)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenyl-cyclopropancarboxylat synthetisiert
- (2) (±)-(1 *RS*, 4 *SR*)-4 -Acetamido-cyclopent-2-en-1-carbonsäureester Laborbestand
- Piperazin-N,N'-bis [ethansulfonsäure] = PIPES Roth

Chemikalien für den Assay zur Bestimmung des Blutalkohols

Alkohol-Standardlösung (0,5 mg/ml)	Merck
Alkohol-Standardlösung (1,0 mg/ml)	Merck
Alkohol-Standardlösung (2,0 mg/ml)	Merck
Alkohol-Standardlösung (3,0 mg/ml)	Merck
Medidrug [®] Ethanol S (0,5 mg/ml)	Medichem
Medidrug [®] Ethanol S (1,0 mg/ml)	Medichem
Medidrug [®] Ethanol S (2,0 mg/ml)	Medichem
Medidrug [®] Ethanol S (3,0 mg/ml)	Medichem
Kaliumpyrophosphat (wasserfrei)	MaTeck

Chemikalien für den Assay zur Bestimmung von Acetat

- (3) N-Acetyl-D,L-4-brom-phenylalanin synthetisiert
- (4) N-Acetyl-D,L-4-chlor-phenylalanin synthetisiert
- (5) N-Acetyl-D,L-arginin synthetisiert
- (6) N-Acetyl-D,L-diphenylalanin synthetisiert
- (7) N-Acetyl-D,L-leucin Sigma
- (8) N-Acetyl-D,L-β-2-naphthylalanin synthetisiert
- (9) N-Acetyl-D,L-phenylalanin synthetisiert
- (10) N-Acetyl-D,L-prolin Sigma

Experimenteller Teil

(11)	N-Acetyl-D,L-serin	Sigma
(12)	N-Acetyl-D,L-tryptophan	Merck
(13)	N-Acetyl-D,L-valin	Merck
	L(-)-Äpfelsäure	Fluka
	Magnesiumchlorid hexahydrat	Fluka
	N-Acetyl-L-arginin	Merck
	Triethanolaminhydrochlorid	Fluka

Chemikalien für den Glucosidaseassay

Natriumacetat	Fluka
p-Nitrophenol (Spectrophotometric Grade)	Sigma
p-Nitrophenol- β -D-glycopyranosid	Fluka
Calystegin B2	Molecularnature

Chemikalien für den Ureaseassay

Triethanolaminpuffer	Fluka
Harnstoff	Fluka
Natrium-2-oxo-glutarat	Fluka
Thioharnstoff	Laborbestand

Sonstige Chemikalien

β , β -DL-Diphenylalanin	Bachem
DL-4-Brom-phenylalanin	Bachem
DL-4-Chlor-phenylalanin	Acros
DL-Arginin	Acros
DL-Argininhydrochlorid	Lancaster
DL-Phenylalanin	Merck
β -(2-Naphthyl)-D-Alanin	Bachem
β -(2-Naphthyl)-DL-Alanin	Bachem
β -(2-Naphthyl)-L-Alanin	Bachem
(\pm)- (1 <i>RS</i> , 2 <i>RS</i>)- <i>trans</i> -2-Phenyl- cyclopropancarbonsäure	Fluka

4.4 Methoden

Zur Herstellung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

4.4.1 High Throughput Screening mit alkoholbasiertem Detektionssystem

Der Ester (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-2-phenyl-cyclopropanocarboxylat (**1**) wurde aus der korrespondierenden Säure nach Literaturvorschrift hergestellt.^[75]

(\pm)- (1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-2-Phenyl-cyclopropanocarbonsäure (2,38 g, 14,7 mmol) wurden mit absolutem Ethanol in Chloroform durch azeotrope Destillation umgesetzt.

Ausbeute: 2,3 g (82,25%)

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[75]

C₁₂H₁₄O₂ (190,24): ber. C 75,76, H 7,42; gef. C 75,29, H 7,33

4.4.1.1 Assay

Alle Substanzen wurden in einem 0,1 M Piperazin-N,N'-bis[ethansulfonsäure] Puffer (pH 7,0) gelöst.

Die Konzentration des Esters betrug erst 12,12 mg/ ml (63,7 mmol/l) und wurde später auf 24,24 mg/ ml (127,4 mmol/l) erhöht.

Die jeweilige Hydrolase wurde entsprechend ihrer Aktivität verdünnt. In der Regel wurden 1 bis 10 mg des Enzyms in 3 ml Puffer gelöst.

Die Konzentration der NADH-Lösung betrug 0,33 g/l (0,47 mM).

Die Ethanollösung hatte eine Konzentration von 0,5 mg /l (10,87 mmol/l) oder 1,0 mg/l (21,74 mmol/l)

Lösung 1: Ester	7 μ l pro Kavität
Lösung 2: Hydrolase	13 μ l pro Kavität
Lösung 3: 50 mg NAD ⁺ und 10 mg ALDH in 25 ml PIPES-Puffer	200 μ l pro Kavität
Lösung 4: 50 μ l ADH in 2,95 ml PIPES-Puffer	3 μ l pro Kavität
Lösung 5: NADH	223 μ l pro Kavität
Lösung 6: Ethanol	7 μ l pro Kavität

Experimenteller Teil

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A: Kontrolle	Puffer 7 µl Enzym 1 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 2 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 3 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 4 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 5 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 6 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 7 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 8 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 9 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Enzym 10 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Puffer 7 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl
B	Ester 7 µl Enzym 1 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Ester 7 µl Enzym 2 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl										Lsg. 6 7 µl Puffer 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	
C			Ester 7 µl Enzym 3 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Ester 7 µl Enzym 4 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl								Lsg. 6 7 µl Puffer 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	
D					Ester 7 µl Enzym 5 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Ester 7 µl Enzym 6 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl						Lsg. 6 7 µl Puffer 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	
E						Ester 7 µl Enzym 7 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Ester 7 µl Enzym 8 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl					Ester 7 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	
F							Ester 7 µl Enzym 9 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	Ester 7 µl Enzym 10 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl				Lsg. 6 7 µl Puffer 13 µl Lsg. 3 200 µl Lsg. 4 3 µl	
G												NADH 223 µl	
H												NADH 223 µl	

Abb. 32: Beispiel für eine Mikrotiterplattenbelegung

Die Mikrotiterplatte wurde mit Klebefolie (Nunc) abgedichtet und bei 37°C im SPECTRA Fluor Plus gemessen und die Zunahme des OD-Wertes bei $\lambda = 340$ nm registriert. Die Messdauer betrug 12 bzw. 20 h und das Messintervall jeweils 1 min. Zwischen den Messungen wurde die Platte 3 Sekunden (Intensität: mittel) geschüttelt.

4.4.1.2 HPLC

Die Reaktionsmischungen aus 2 Kavitäten einer Doppelbestimmung wurden in einem Kolben mit 50 µl 1 N Salzsäure versetzt und im Vakuum bei einer Badtemperatur von <30 °C zur Trockne eingengt.

Die chromatographische Auftrennung erfolgte an einer (R, R)-Whelk-01 Säule mit Pentan/2-Propanol/Essigsäure 98/2/0,5, Flussrate 1.0 ml/min, Druck 24 bar, UV-Detektion bei $\lambda = 235$ nm und Chiralzyzer.

Folgende Retentionszeiten wurden gemessen:

$t_{R(+)}(1 S, 2 S)\text{-trans-Ethyl-2-phenyl-cyclopropanocarboxylat} = 4,87$ min.

$t_{R(-)}(1 R, 2 R)\text{-trans-Ethyl-2-phenyl-cyclopropanocarboxylat} = 5,39$ min.

$t_{R(+)}(1 S, 2 S)\text{-trans-2-Phenyl-cyclopropanocarbonsäure} = 13,47$ min.

$t_{R(+)}(1 R, 2 R)\text{-trans-2-Phenyl-cyclopropanocarbonsäure} = 15,8$ min.

4.4.1.3 Titrino pH-Stat

Zu einer Suspension von (\pm)-(1 *RS*, 2 *RS*)-*trans*-Ethyl-phenyl-cyclopropylcarboxylat (300 mg, 1,58 mmol) in Wasser (40 ml) wurde bei 37 °C eine entsprechende Enzymmenge zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde im Titrino unter pH-Stat-Bedingungen durch Zugabe von 0,02 N Natronlauge bei einem pH von 7,0 hydrolysiert. Zur Aufarbeitung wurde mit 50 ml Dichlormethan versetzt und mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase 4x mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden getrocknet (Na_2SO_4) und i. V. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde ohne weitere Auftrennung zur HPLC eingesetzt.

4.4.2 Assay zur quantitativen Bestimmung des Blutalkohols

4.4.2.1 Assay-Bedingungen

Für diesen Assay wurde ein 0,1 M Kaliumpyrophosphatpuffer (pH 9) verwendet.

Zum Ausfällen der Proteine wurden 225 µl Serum mit 1500 µl 3,3% iger Perchlorsäure versetzt und 10 min bei 8400 g zentrifugiert. Die abdekantierte Lösung wurde unverdünnt im Assay eingesetzt. Die Alkohol-Standardlösungen wurden gleich behandelt.

Verwendete Standards waren sowohl die Alkohol-Standardlösungen von Merck (0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 mg Ethanol pro ml Lösung) als auch die Alkohol-Standardlösungen von Medichem (0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 mg Ethanol pro ml Serum). Getestet wurden humane Serumproben der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.

- Lösung 1: Serum 5 µl pro Kavität
- Lösung 2: 2 mg ALDH, 33,32 mg NAD⁺, 203 µl ADH in 200 µl pro Kavität
25 ml Puffer
- Lösung 3: Ethanol-Standardlösung (0,5 ‰, 1,0 ‰, 2,0 ‰, 3,0 ‰) 5 µl pro Kavität

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Puffer 5 µl Lsg.2 200 µl	Standard 0,5% Lsg.2 200 µl	Standard 1,0% Lsg.2 200 µl	Standard 2,0% Lsg.2 200 µl	Standard 3,0% Lsg.2 200 µl							
C						Serum 1 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 2 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 3 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 4 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 5 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 6 5 µl Lsg.2 200 µl	Serum 7 5 µl Lsg.2 200 µl
D												
E												
F												
G												
H												

Abb. 33: Mikrotiterplattenbelegung für Blutalkoholnachweis

Die Mikrotiterplatte wurde mit Klebefolie luftdicht verschlossen und 20 min im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert (Stufe 7; 35°C).

Die anschließende Endpunktmessung wurde bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ und 35 °C durchgeführt. Die Platte wurde vor der Messung 3 s (Intensität: mittel) geschüttelt.

4.4.2.2 HS-GC-MS Messungen

Die Probenaufarbeitung des Serums und der Standardlösungen mit Perchlorsäure erfolgte analog zum Assay. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes in die HS-Vials überführt. Nach Abdeckung mit Parafilm wurden die Vials mit Septum und Kappe mittels Crimperzange verschlossen. Jede Probe bzw. Standardkonzentration wurde 5-fach gemessen.

Arbeitsbedingungen des Headspace Sampler:

carrier gas	Helium
pressure	12,8 psi
Oventemp.	70 °C
transfer-line	90 °C
loop	80 °C
GC-cyclus time	25 min
injection time	0,30 min
loop equalibr.	0,02 min
loop til time	0,15 min
pressure time	0,13 min
vial equalibr. time	25 min

Arbeitsbedingungen des GC-Systems und des MS-Detektors:

carrier gas	Helium, 80,4 kPa
Injector	50 °C; total flow 11,5 ml split (7,5 ml/min), split ratio 5:1
Oven	37 °C-4 min Postrun 180 °C-6 min (zum Ausheizen der Säule)
Column	HP-5MS (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) 30 m x 0,25 mm ID x 0,25µm film thickness 1,5 ml carrier gas flow = 44 cm/sec average velocity
MS	transfer-line 240 °C full scan 25 - 50 amu (27,78 scans/sec) solvent delay 1,08 min

4.4.3 High Throughput Screening mit Detektion von Acetat

4.4.3.1 Acetylierung von Aminosäuren

Allgemeine Vorschrift

Zu einer Mischung aus 0,1 mol Aminosäure, 200 ml Wasser und 0,81 mol Natriumhydroxid wurde 0,12 mol Acetanhydrid langsam zugetropft. Nach 10 min Rühren wurde mit Salzsäure angesäuert. Die Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingengt. Anschließend wurde aus heißem Wasser umkristallisiert.^[76, 77]

N-Acetyl-D,L-4-brom-phenylalanin (3)

Aus D,L-4-Brom-phenylalanin (0,0082 mol, 2,0 g) wurde nach dem Umkristallisieren **3** (1,64 g, 70,1%) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton):

δ = 7,44-7,19 (m, 4 H, Aromat); 4,66-4,71 (m, 1 H, CHN); 3,12-3,17 (q, 2 H, $J = 6$ Hz); 2,99-2,86 (q, 2 H, $J = 8$ Hz); 1,86 (s, 3 H, COCH₃)

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton):

δ = 171,87 (COOH); 169,14 (COCH₃); 136,87, 131,35, 131,14, 119,97 (Aromat); 53,18, 53,09 (CHN); 36,74 (CH₂); 21,86 (COCH₃)

Schmelzpunkt: 192°C (Literaturwert: 186-197 °C Datenblatt von Bachem)

C₁₁H₁₂NO₃Br (286,125): ber. C 46,18, H 4,23, N 4,90; gef. C 45,94, H 4,15, N 4,86.

N-Acetyl-D,L-4-chlor-phenylalanin (4)

Aus D,L-4-Chlor-phenylalanin (0,014 mol, 2,8 g) wurde von **4** (2,340 g, 69,2%) erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[78]

Schmelzpunkt: 176°C (Literaturwert: 180-183 °C^[78])

C₁₁H₁₂NO₃Cl (241,674): ber. C 54,70, H 5,00, N 5,80; gef. C 54,75, H 5,08, N 5,75.

N-Acetyl-D,L-diphenylalanin (6)

Nach der allgemeinen Vorschrift wurde D,L-Diphenylalanin (0,008 mol, 2,0 g) umgesetzt und **6** (1,5 g, 66,2 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

$\delta = 7,31-7,17$ (m, 10 H, Aromat); $5,37-5,33$ (m, 1 H, $J = 10,62$ Hz); $4,53-4,51$ (d, 1 H, $\underline{\text{CH}}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$); $1,87$ (s, 3 H, COCH_3)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 173,61$ (COOH); $170,83$ ($\underline{\text{COCH}}_3$); $139,76$, $139,29$, $128,87$, $128,62$, $128,45$, $128,10$, $127,39$, $127,17$ (Aromat); $55,46$ ($\underline{\text{CH}}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$); $52,53$ (CHN); $23,09$ (COCH_3)

Schmelzpunkt: 167°C (Literaturwert: 164°C ^[79])

$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (283,327): ber. C 72,07, H 6,04, N 4,94; gef. C 71,09, H 5,81, N 4,88.

N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin (8)

Aus D,L-Naphthylalanin (0,042 mol, 9,0 g) wurde **8** (6,58 g, 60,9%) synthetisiert.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76, 77]

Schmelzpunkt: 173°C (Literaturwert: $170-173^\circ\text{C}$ ^[80])

$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (257,289): ber. C 70,02, H 5,88, N 5,41; gef. C 69,84, H 5,88, N 4,42.

N-Acetyl-D,L-phenylalanin (9)

Aus D,L-Phenylalanin (0,1 mol, 16,520 g) wurde **9** (16,821 g, 81,17%) erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[81]

Schmelzpunkt: 139°C (Literaturwerte: $140-142^\circ\text{C}$ ^[82] und $152-154^\circ\text{C}$ ^[83])

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ (207,23): ber. C 63,76, H 6,32, N 6,76; gef. C 63,66, H 6,59, N 7,37.

N-Acetyl-D,L-arginin (5)

Die Herstellung dieser Acetylverbindung unterscheidet sich von der allgemeinen Vorgehensweise. In Anlehnung an die Synthese von M. D. Lloyd et al.^[84] wurde D,L-Arginin (0,012 mol, 2,0 g) in Wasser gelöst. Nach der Zugabe von NaHCO_3 (0,012 mol, 1,01g) und Acetanhydrid (0,015 mol, 1,42 ml) in kleinen Mengen wurde die Lösung 30 min im Eisbad gerührt. Danach wurde Na_2CO_3 (0,01 mol, 0,80 g) zugegeben und 3 h im Eisbad stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol wurde **5** (1,466 g, 56,49%) erhalten.

Die analytischen Werte stimmen mit der Literatur überein.^[84, 85]

Schmelzpunkt: $268-270^\circ\text{C}$ (Literaturwerte: $265-268^\circ\text{C}$ ^[85])

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ (216,24): ber. C 44,44, H 7,46, N 25,91; gef. C 44,43, H 7,56, N 25,28.

4.4.3.2 Assay

Zur Herstellung aller Lösungen wurde ein 0,4 M Triethanolaminpuffer (pH 8,4) verwendet.

Die Konzentration der Substratlösung (N-acetylierte Aminosäuren) betrug 0,23 mmol.

Für die Enzymlösungen wurden 1 bis 10 mg der verwendeten Hydrolasen (entsprechend ihrer Aktivität) in 3 ml Puffer gelöst. Bei allen Acylasen wurde Cobalt(II)chlorid als Cofaktor zugesetzt.

Die Standardkonzentration (NADH) betrug 0,3 mg/ml bzw. 0,42 mM.

Lösung 1: Substrat	5 µl pro Kavität
Lösung 2: Hydrolasen	5 µl pro Kavität
Lösung 3: 15 mg L(-)-Äpfelsäure, 16 mg MgCl ₂ , 9 mg NAD ⁺ , 2 mg CoA und 21 mg ATP in 10 ml Puffer	100 µl pro Kavität
Lösung 4: 22 µl CS und 22 µl MDH in 1 ml Puffer	5 µl pro Kavität
Lösung 5: 2 mg Acetyl-CoA Synthetase in 1 ml Puffer	5 µl pro Kavität
Lösung 6: NADH	120 µl pro Kavität

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A: Kontrolle	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	
	Enzym 1	5 µl	Enzym 2	5 µl	Enzym 3	5 µl	Enzym 4	5 µl	Enzym 5	5 µl	Enzym 6	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
B	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	
	Enzym 1	5 µl	Enzym 2	5 µl	Enzym 3	5 µl	Enzym 4	5 µl	Enzym 5	5 µl	Enzym 6	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
C	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	
	Enzym 1	5 µl	Enzym 2	5 µl	Enzym 3	5 µl	Enzym 4	5 µl	Enzym 5	5 µl	Enzym 6	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
D	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	
	Enzym 1	5 µl	Enzym 2	5 µl	Enzym 3	5 µl	Enzym 4	5 µl	Enzym 5	5 µl	Enzym 6	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
E: Kontrolle	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	Puffer	5 µl	
	Enzym 13	5 µl	Enzym 14	5 µl	Enzym 15	5 µl	Enzym 16	5 µl	Enzym 17	5 µl	Enzym 18	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
F	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	
	Enzym 13	5 µl	Enzym 14	5 µl	Enzym 15	5 µl	Enzym 16	5 µl	Enzym 17	5 µl	Enzym 18	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
G	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	Substrat	5 µl	
	Enzym 13	5 µl	Enzym 14	5 µl	Enzym 15	5 µl	Enzym 16	5 µl	Enzym 17	5 µl	Enzym 18	5 µl	
	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	Lsg. 3	100 µl	
	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	Lsg. 4	5 µl	
	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	Lsg. 5	5 µl	
H											Puffer	5 µl	
											Substrat	5 µl	
												Substrat	5 µl
												Lsg. 3	100 µl
												Lsg. 4	5 µl
												Lsg. 5	5 µl
													NADH 120 µl
													NADH 120 µl

Abb. 34: Beispiel für eine Mikrotiterplattenbelegung

Die Mikrotiterplatte wurde mit Klebefolie luftdicht verschlossen und bei 30 °C die Zunahme des OD-Wertes bei λ = 340 nm im SPECTRA Fluor Plus gemessen.

Die Messdauer war unterschiedlich lang:

- 24 h, Messintervall: 1 min
- 22 h, Messintervall: 1 min
- 20 h, Messintervall: 1 min

Zwischen den Messungen wurde die Platte jeweils 3 Sekunden mit mittlerer Intensität geschüttelt.

4.4.3.3 Umsetzungen am Titrino unter pH-Stat-Bedingungen

Die Messungen am pH-Stat und Aufarbeitung der Reaktionslösung wird am Beispiel von N-Acetyl-D,L- β -2-naphthylalanin (**8**) mit Acylase I (A7) beschrieben.

Verbindung **8** (2 mmol, 0,514 g) wurde in 20 ml Wasser suspendiert und mit dem pH-Stat Titrino mit 0,1 N Natronlauge der pH auf 7,2 eingestellt. Danach wurden 21 mg des jeweiligen Enzyms zugefügt. Während der Messzeit wurde der pH-Wert kontrolliert auf 7,2 und die Temperatur auf 37 °C gehalten. Nach 15 h wurde die Reaktion abgebrochen. Die Lösung wurde mit 1 N Salzsäure auf pH 2,0 angesäuert und 5x mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte wurden nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 10 ml 2 N Salzsäure 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde filtriert und mit 0,1 N Natronlauge neutralisiert und der ausgefallene Feststoff abgetrennt. Dieser wurde zur Reinigung in 0,3 N Salzsäure gelöst, filtriert und wieder mit 0,1 N Natronlauge ausgefällt.

Der so erhaltene Niederschlag, H- β -2-Naphthyl-D-Ala-OH, wurde über eine Glasfritte abgetrennt, mit Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen:

Ausbeute: 0,132 g (30.70 %)

Schmelzpunkt: 223 °C (Lit.: 237-240 °C ^[80], 256-258 °C ^[86])

$[\alpha]^{589} = 11.23$ ($c = 0,605$ g/100 ml, 0,3 N HCl)

Literaturwert: $[\alpha]^{589} = 9,0$ ($c = 0,87$ g/100 ml, aq. HCl) ^[46]

C₁₃H₁₃NO₂ (215,25): ber. C 72,54, H 6,09, N 6,51; gef. C 72,28, H 6,14, N 6,25.

Die nach dem Extrahieren mit Ethylacetat noch vorhandene wässrige Lösung wurde neutralisiert und der ausgefallene Feststoff, H- β -2-Naphthyl-L-Ala-OH, abgetrennt. Zur Reinigung wurde dieser in 0,3 N Salzsäure gelöst, filtriert und mit 0,1 N Natronlauge wieder ausgefällt. Der so erhaltene Niederschlag wurde über eine Glasfritte abgetrennt und mit Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen:

Ausbeute: 0,052 g (12.10%)

Schmelzpunkt: 235 °C

$[\alpha]^{589} = -12.21$ ($c = 0.602$, 0.3 N HCl)

Literaturwert: $[\alpha]^{589} = -11$ ($c = 1,0$ g/100 ml, 0,3 N HCl) ^[46]

C₁₃H₁₃NO₂ (215.25): ber. C 72,54, H 6,09, N 6,51; gef. C 72,49, H 6,50, N 6,34.

Dünnschichtchromatographie an Chiraplate-Fertigplatten zeigte eine Enantiomerenreinheit von mindestens 99 %.

4.4.3.4 Dünnschichtchromatographie

Eluent für die kieselgelbeschichteten Aluminiumplatten:

Butanol : Wasser : Eisessig \rightarrow 3 : 1 : 1

Eluent für die Chiraplate-Fertigplatten:

Methanol : Wasser : Acetonitril \rightarrow 1 : 1 : 4

Die Detektion der beiden Plattentypen war gleich: zuerst unter UV Licht bei $\lambda = 254$ nm und danach durch Anfärben mit einer 1% Ninhydrinlösung und anschließender Erwärmung im Trockenschrank bei 100°C.

4.4.4 Glucosidaseassay

4.4.4.1 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Das Pflanzenmaterial (100 g) wurde homogenisiert und 2x mit je 300 ml heißem Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde über eine Kationenaustauschersäule (Merck Ionenaustauscher I) und eine Anionenaustauschersäule (ACROS, Dowex 1x2) gereinigt und auf eine Menge von 1 ml je 1 g eingesetztes Ausgangsmaterial konzentriert.

4.4.4.2 LC-MS Messungen

Eluent: Wasser; Flussrate: 0,1 ml/ min.

Für die Detektion der Massenspektren wurden folgende Bedingungen benutzt: positiver Ionenpolaritäts-Modus, ESI-Spray-Spannung 4,1 kV, Kapillarspannung 34 V, Kapillartemperatur 200 °C, Linsenspannung +10 V, Schutzgas N₂, Trägergas He.

Für die selektive Detektion der Calystegine A3, B2 und C1 wurde der CRM-Modus (MS³) genutzt; dabei werden die Fragmentierungsreaktionen (Massendetektor CID mit Helium als Kollisionsgas und einer Resonanzanregungsspannung RF 0-5 V von Peak zu Peak) des Mutterions (MH⁺) von A3 (m/z 160 → m/z 142), B2 (m/z 176 → m/z 159,158) und entsprechend C1 (m/z 192 → m/z 174,156) erfasst.

4.4.4.3 Assay

In einem 0,05 M Natriumacetatpuffer (pH 6,0) wurden alle Substanzen gelöst.

Folgende Substratkonzentrationen wurden hergestellt: 1,0 / 1,11 / 1,25 / 1,43 / 1,67 / 2,0 / 2,5 / 3,33 / 5,0 / 10,0 mM. Die standardisierten Pflanzenextrakte wurden entsprechend der Stärke ihrer inhibierenden Wirkung weiter verdünnt: 1:60 / 1:50 / 1:40 / 1:30 / 1:20 / 1:10 / 1:5.

Die eisgekühlte Enzymlösung enthielt ca. 4,2 U/ml und die Konzentration der Standardlösung betrug 2 mM.

Lösung 1: Substrat (p-Nitrophenol-β-D-glycopyranosid)	100 µl pro Kavität
Lösung 2: Enzym (β-Glucosidase)	50 µl pro Kavität
Lösung 3: Inhibitor (Pflanzenextrakte)	100 µl pro Kavität
Lösung 4: Standard (p-Nitrophenol)	5 µl pro Kavität

Entsprechend des jeweiligen Belegungsschemas wurden die Mikrotiterplatten bestückt.

Experimenteller Teil

Substratkonz. in mmol / l	1 0,0	2 1,0	3 1,11	4 1,25	5 1,43	6 1,67	7 2	8 2,5	9 3,33	10 5	11 10	12 Standard
A: Kontrolle	Substrat 100 µl Puffer 100 µl Blindwert	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl
B	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl											Std. 100 µl Puffer 100 µl
C		Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl										Std. 100 µl Puffer 100 µl
D			Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl			Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl						Std. 100 µl Puffer 100 µl
E				Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl		Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl						Std. 100 µl Puffer 100 µl
F					Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl		Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl				Std. 100 µl Puffer 100 µl
G							Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl		Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 100 µl
H										Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 100 µl

Abb. 35: Mikrotiterplattenbelegung ohne Inhibitor

Substratkonz. in mmol / l	1 0,0	2 1,0	3 1,11	4 1,25	5 1,43	6 1,67	7 2	8 2,5	9 3,33	10 5	11 10	12 Standard
A: Kontrolle	Substrat 100 µl Puffer 100 µl Blindwert	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Substrat 100 µl Puffer 100 µl	Std. 100 µl Puffer 100 µl
B: Grund-assay	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Puffer 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 100 µl
C: Inh.-Konz. 1	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 1 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 1 50 µl
D: Inh.-Konz. 1												Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 1 50 µl
E: Inh.-Konz. 2	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 2 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 2 50 µl
F: Inh.-Konz. 2												Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 2 50 µl
G: Inh.-Konz. 3	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Substrat 100 µl Inhibitor 3 50 µl Enzym 50 µl	Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 3 50 µl
H: Inh.-Konz. 3												Std. 100 µl Puffer 50 µl Inhibitor 3 50 µl

Abb. 36: Mikrotiterplattenbelegung mit Inhibitor

Direkt nach Zugabe der Enzymlösung mit der Finnpipette® Multistepper, wurde die Platte im SPECTRA Fluor Plus bei 42 °C gemessen und die Zunahme des OD-Wertes bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ über 20 min mit einem Messintervall von 50 Sekunden registriert.

4.4.5 Ureaseassay

Alle Substanzen wurden in einem 0,5 M Triethanolaminpuffer (pH 8,0) gelöst.

Folgende Harnstoffkonzentrationen wurden hergestellt: 0,21 / 0,31 / 0,42 / 0,63 und 1,26 mM.

Die Konzentration der NADH-Standardlösung betrug 0,72 mM.

Von Thioharnstoff wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 0,025 / 0,051 / 0,102 / 0,125 / 0,15 / 0,2 M.

- Lösung 1: Substrat (Harnstoff) 50 µl pro Kavität
- Lösung 2: 15 mg GIDH, 75 mg Oxoglutarat und 50 mg NADH in 25 ml Puffer 50 µl pro Kavität
- Lösung 3: 9 mg Urease 50 µl pro Kavität
- Lösung 4: Inhibitor (Thioharnstoff) 50 µl pro Kavität
- Lösung 5: NADH 200 µl pro Kavität

Substratkonz. in mmol / l	1 0,0	2 0,5	3 1,0	4 1,5	5 2,0	6 2,5	7 0,5	8 1,0	9 1,5	10 2,0	11 2,5	12 NADH	
A: Grund-assay	Puffer 100 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Puffer 50 µl Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl	Std. 100 µl Puffer 100 µl
B: Grund-assay													
C: Inh.-Konz. 1	Puffer 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 5 200 µl
D: Inh.-Konz. 1													
E: Inh.-Konz. 2	Puffer 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 5 200 µl
F: Inh.-Konz. 2													
G: Inh.-Konz. 3	Puffer 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 1 50 µl Lsg. 2 50 µl Lsg. 3 50 µl Lsg. 4 50 µl	Lsg. 5 200 µl
H: Inh.-Konz. 3													

Abb. 37 Mikrotiterplattenbelegung für den Ureaseassay mit Inhibitor

Direkt nach Zugabe der Enzymlösung, wurde die Platte im SPECTRA Fluor Plus bei 37 °C gemessen und die Annahme des OD-Wertes bei $\lambda = 340$ nm über 15 min mit einem Messintervall von 50 Sekunden registriert.

5 Literaturverzeichnis

- [1] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.*, **109**, 2961-2962 (1997).
- [2] F. Badalassi, D. Wahler, G. Klein, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.*, **112**, 4233-4236 (2000).
- [3] E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.*, **380**, 1029-1033 (1999)
- [4] G. Klein, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.*, **113**, 1821-1823 (2001).
- [5] L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.*, **62**, 4560-4561 (1997).
- [6] L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.*, **4**, 2324-2331 (1998)
- [7] A. Mai Fai Liu, N. A. Somers, R. J. Kazlauskas, T. S. Brush, F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, G. P. Horsman, A. Mezzetti, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 545-556 (2001).
- [8] M. Baumann, B. H. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 4781-4790 (2000).
- [9] M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühling, A. Holzwarth, *Angew. Chem.*, **110**, 2792-2795 (1998).
- [10] M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.*, **111**, 1872-1875 (1999).
- [11] M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.*, **113**, 4329-4333 (2001).
- [12] J. Knabe, *Pharmazie in unserer Zeit*, **24**, 324-330 (1995).
- [13] H. J. Roth, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **137**, 1030-1037 (1997).
- [14] H. Brunner, *Rechts oder Links*, VCH-Verlag, Weinheim (1999).
- [15] C. A. White, G. Subramanian, *A Introduction to Liquid Chromatography*, VCH-Verlag, Weinheim (1994).
- [16] U. Oehmichen, K.A. Langner, <http://www.tu-dresden.de/medkai/969716.pdf>, Internet.
- [17] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag (1994).

- [18] S. Koul, S. C. Taneja, R. Parshad, G. N. Qazi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 3395-3399 (1998).
- [19] P. M. Dinh, M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Letters*, **40**, 749-752 (1999).
- [20] K. Wünsche, U. Schwaneberg, U. T. Bornscheuer, H. H. Meyer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 2017-2022 (1996).
- [21] H. Yang, E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 957-960 (1999).
- [22] N. W. Fadnavis, R. L. Babu, S. K. Vadivel, A. A. Deshpande, U. T. Bhalerao, *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 4109-4112 (1998).
- [23] A. S. Bommarius, K. Drauz, K. Günther, G. Knaup, M. Schwarm, *Tetrahedron Asymmetry*, **8**, 3197-3200 (1997).
- [24] S. M. Birnbaum, M. Winitz, J. P. Greenstein, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **60**, 496-498 (1956).
- [25] C. J. Easton, J. B. Harper, *Tetrahedron Letters*, **39**, 5269-5272 (1998).
- [26] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.
- [27] Boehringer Mannheim, *Methoden der enzymatischen Bioanalytik und Lebensmittelanalytik*, (1997).
- [28] B. Waidner, *Dissertation*, Universität Karlsruhe, 2003.
- [29] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*, VCH-Verlag, Weinheim (2000).
- [30] H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2. Auflage, Vol. **2**, VCH-Verlag, Weinheim (1970).
- [31] L. Rover Jr., J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L.T. Kubota, E. Katekawa, S. H. P. Serrano, *Anal. Biochem.*, **260**, 50-55 (1998).
- [32] S. G. A. Alivisatos, F. Ungars, G. Abraham, *Nature*, **203**, 973-974 (1964).
- [33] P. Monecke, *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität, 1998.
- [34] R. Blume, H. Wenck, <http://www.chemieunterricht.de/dc2/katalyse/e-adh.htm>, Internet.
- [35] R. Csuk, P. Dörr, *Tetrahedron*, **51**, 5789-5798 (1995).
- [36] <http://www.bads.de/Alkohol/blutalkoholbestimmung.htm>, Internet.

- [37] T. Büchner, H. Redetzki, *Klinische Wochenschrift*, **29**, 615-616 (1951).
- [38] H. O. Beutler, G. Michal, *Z. Anal. Chem.*, **284**, 113-117 (1977).
- [39] R. Iffland, G. Krambrich, *Klinisches Labor*, **39**, 147-150 (1993).
- [40] G. Jung, G. Féraud, *Clin. Chem.*, **24**, 873-876 (1978).
- [41] I. A. Rose, *Methods of Enzymology*, **I**, 591-595 (1955).
- [42] F. Lundquist, U. Fugmann, H. Rasmussen, *Biochem. J.*, **80**, 393-397 (1961).
- [43] H. U. Bergmeyer, H. Möllering, *Biochem. Z.*, **344**, 167-189 (1966).
- [44] W. Buckel, H. Eggerer, *Biochem. Z.*, **343**, 29-43 (1965).
- [45] C. Junge, C. Spadinger, *Deutsche Lebensmittel – Rundschau*, **75**, 12-15 (1979).
- [46] D. Seebach, E. Dziadulewicz, L. Behrendt, S. Cantoreggi, R. Fitzi, *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, 1215-1232, (1989).
- [47] H. Faulstich, H. O. Smith, S. Zobeley, *Liebigs Ann. Chem.*, **1973**, 765-771 (1973).
- [48] R. Schwyzer, E. Surbeck-Wegmann, *Helvetica Chimica Acta*, **43**, 1073-1076 (1960).
- [49] D. Tepfer, A. Goldmann, N. Pamboukdjian, M. Maille, A. Lepingle, D. Chevalier, J. Denarie, C. Rosenberg, *Journal of Bacteriology*, **170**, 1153-1161 (1988).
- [50] D. Tepfer, A. Goldmann, C. Rosenberg, *Europ. Pat. Appl.*, 14 pp. CODEN:EPXXDW EP 203863 A1 19861203, (1986).
- [51] N. Asano, A. Kato, K. Oseki, H. Kizu, K. Matsui, *Europ. J. Biochem.*, **229**, 369-376 (1995).
- [52] N. Asano, K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, *Carbohydrate Research*, **259**, 243-255 (1994).
- [53] R. J. Nash, M. Rothschild, E. A. Porter, A. Watson, R. Waigh, P. G. Waterman, *Phytochemistry*, **36**, 357 (1993).
- [54] W. J. Griffin, G. D. Lin, *Phytochemistry*, **53**, 623-637 (2000).
- [55] R. J. Molyneux, Y. T. Pan, A. Goldmann, D. Tepfer, A. D. Elblein, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **304**, 81-88 (1993).
- [56] A. Goldmann, B. Message, D. Tepfer, R. J. Molyneux, O. Duclos, F. D. Boyer, Y. T. Pan, A. D. Elblein, *Journal of natural Products*, **59**, 1137-1142 (1996).

- [57] N. Asano, A. Kato, M. Miyauchi, H. Kizu, T. Tomimori, K. Matsui, R. J. Nash, R. J. Molyneux, *Europ. J. Biochem.*, **248**, 296-303 (1997).
- [58] N. Asano, A. Kato, K. Matsui, A. A. Watson, R. J. Nash, R. J. Molyneux, L. Hackett, J. Topping, B. Winchester, *Glycobiology*, **7**, 1085-1088 (1997).
- [59] M. Kimura, F. Chen, N. Nakashima, I. Kimura, N. Asano, S. Sakuji, *Wakan Iyakugaku Zasshi*, **13**, 214-219 (1995).
- [60] B. Dräger, *Phytochemical Analysis*, **6**, 31-37 (1995).
- [61] B. Dräger, C. Funck, A. Hoehler, G. Mrachatz, A. Nahrstedt, A. Portsteffen, A. Schaal, R. Schmidt, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **38**, 235-240 (1994).
- [62] R. Keiner, K. Nakajima, T. Hashimoto, B. Dräger, *Journal of Applied Botany*, **74**, 122-125 (2000).
- [63] R. Keiner, B. Dräger, *Plant Science*, **150**, 171-179 (2000).
- [64] Y. Scholl, D. Hoke, B. Dräger, *Phytochemistry*, **58**, 883-889 (2001).
- [65] A. A. Watson, D. R. Davis, N. Asano, B. Winchester, A. Kato, R. J. Molyneux, B. L. Stegelmeier, R. J. Nash, *ACS Symposium Series*, **745**, 129-139 (2000).
- [66] J. Schwartz, J. Sloan, Y.C. Lee, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **137**, 122-127 (1970).
- [67] J. Conchie, A. L. Gelman, G. A. Levvy, *Biochem J.*, **103**, 609 (1967).
- [68] M. V. Kelemen, W. J. Whelan, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **117**, 423-428 (1966).
- [69] M. P. Dale, W. P. Kopfler, I. Chait, L. D. Byers, *Biochemistry*, **25**, 2522-2529 (1986).
- [70] G. Legler, A. Korth, A. Berger, C. Ekhart, G. Gradnig, A. E. Stütz, *Carbohydrate Research*, **250**, 67-77 (1993).
- [71] J. M. Walker, J. S. Winder, S. J. Kellam, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **38**, 141-146 (1993).
- [72] H. Kaltwasser, H. G. Schlegel, *Anal. Biochem.*, **16**, 132 (1966).
- [73] Calzyme Laboratories, Inc., <http://www.calzyme.com/catalog/urease.html>, Internet.
- [74] G. B. Kistiakowsky, W. H. R. Shaw, *J. Amer. Soc.*, **75**, 866-871 (1953).

- [75] R. Csuk, M. J. Schabel, Y. von Scholz, *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 3505-3512 (1996).
- [76] A. Ueno, M. Nohara, F. Toda, K. Uno, Y. Iwakura, *J. of Polymer Science*, **13**, 2751-2761 (1975).
- [77] M. Pugnieri, B. Castro, A. Previero, *Chirality*, **3**, 170-173 (1991).
- [78] J. Kovacs, I. Teplan, I. Mezo, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **84**, 109-113 (1975).
- [79] M. J. Anatol, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **235**, 249-251 (1952).
- [80] K. U. Prasad, R. W. Roeske, F. L. Weitzl, *J. Med. Chem.*, **19**, 492-495 (1976).
- [81] J. S. Tou, B. D. Vineyard, *J. Org. Chem.*, **49**, 1135-1136 (1984).
- [82] R. Grupe, H. Niedrich, *J. prakt. Chem*, **312**, 1087-1093 (1970).
- [83] E. L. Bennett, C. Niemann, *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1798-1800 (1950).
- [84] M. D. Lloyd, K. D. Merritt, V. Lee, T. J. Sewell, B. Wha-Son, J. E. Baldwin, C. J. Schonfield, S. W. Elson, K. H. Baggaley, N. H. Nicholson, *Tetrahedron*, **55**, 10201-10220 (1999).
- [85] H. Yajima, K. Kubo, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2039-2044 (1965).
- [86] K. Dittmer, W. Herz, S. J. Cristol, *J. Biol. Chem.*, **173**, 324 (1948).

Lebenslauf

Name	Claudia Korb
Geburtsdatum	09. November 1974
Geburtsort	Karl-Marx-Stadt
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schule

1981 – 1990	„Komarow-Oberschule“, Karl-Marx-Stadt
1990 – 1993	„Georgius-Agricola-Gymnasium“, Chemnitz

Beruflicher Werdegang

September 1993 – März 1994	Pharmazeutisch-technische – Assistentin „Berufliches Schulungszentrum für Gesundheit und Sozialwesen“, Chemnitz
März 1994	Studienzulassung durch ZVS, damit Abbruch der Ausbildung
März 1994 – April 1998	Studium an der Universität Würzburg, Fachrichtung Pharmazie
Mai 1998 – Oktober 1998	Pharmaziepraktikum bei Hoechst Marion Roussel, Frankfurt
November 1998 – April 1999	Pharmaziepraktikum in der „Neuen Apotheke“, Chemnitz
Juni 1999	Approbation als Apotheker
Juli 1999 – heute	Anfertigung einer Dissertation am Institut für Organische Chemie des Fachbereiches Chemie an der Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die im Wortlaut oder im Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle (Saale), den 16. September 2003

Claudia Korb