

**Monitoring von Festphasensynthesen und  
biospezifische Detektion in der HPLC  
mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

**Hans-Martin Haake**

Tag der mündlichen Prüfung:

27.4.2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter

Prof. Dr. G. Jung

*Für Dagmar und Sophie*



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke für das interessante Thema, seine andauernde Unterstützung meiner Arbeiten und das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung danke ich für die Übernahme des Koreferats und seine Unterstützung der Arbeiten zum Synthese- und Wirkstoffmonitoring.

Herrn Dr. Andreas Brecht und Herrn Dr. Jacob Piehler danke ich für die Einführung in die Arbeitstechniken, ihre ständige Bereitschaft zu Diskussion und ihre wertvollen Anregungen.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, insbesondere der Biogruppe, danke ich für die fröhliche, motivierende und von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre.

Herrn Jochen Mehne danke ich für die Präparation nahezu unzähliger mit DAPEG beschichteter Transducerchips, die Durchführung zahlreicher Affinitätstitrationen und die sehr angenehme Zusammenarbeit im Rahmen verschiedener Projekte.

Herrn Dipl.-Chem. Rolf Tünnemann danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Umsetzung des Synthesemonitorings, die ich als sehr gelungenes Beispiel einer sich optimal ergänzenden Kooperation zweier Fachbereiche empfand.

Prof. Dr. Hubertus Irth und Frau Drs. Ing. Leonie de Best danke ich für die sehr erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit im Bereich der HPLC-RfS-Kopplung.

Allen Projektpartnern aus dem BMBF-Projekt LIBRARIAN II und verschiedener Industriekooperationen danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Dipl.-Chem. Alexander Jung danke ich für die sehr arbeitsintensive Zusammenarbeit im Dschungel des Computernetzes, besonders die Erledigung vieler anfallender Aufgaben in den letzten Wochen, durch die ich mehr Zeit dem Schreiben dieser Arbeit widmen konnte.

Schließlich danke ich allen, die mir privat zur Seite standen. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Dagmar für Ihre Geduld und ihr Verständnis für meine Arbeit.



---

1 Einleitung .....	1
1.1 Motivation der Arbeit .....	1
1.2 Zielsetzung und Gliederung .....	2
2 Theoretischer Teil .....	5
2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie RIfS .....	5
2.1.1 Beschreibung der theoretischen Grundlagen der RIfS .....	6
2.1.2 Komponenten eines RIfS-Aufbaus.....	11
2.2 Detektion und Reaktionen an einer Oberfläche .....	14
2.2.1 Kinetik von Oberflächenreaktionen und massentransportlimitierte Bindung.....	15
2.2.2 Oberflächenmodifikation und Referenzierung.....	17
2.3 Festphasensynthesen .....	20
2.3.1 Prinzip der Festphasensynthesen.....	20
2.3.2 Eingesetzte Kupplungsreagenzien, Schutzgruppen und Reaktionen .....	23
2.4 Biospezifische Detektion in der Flüssigchromatographie .....	25
2.4.1 Chromatographie.....	25
2.4.2 Kopplung von Bioassays und Flüssigchromatographie .....	28
3 Material und Methoden .....	30
3.1 Materialien .....	30
3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien .....	30
3.1.2 Lösungen .....	30
3.1.3 Geräte .....	30
3.2 Methoden .....	31
3.2.1 Oberflächenmodifikation .....	31
3.2.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie.....	33
3.2.3 Affinitätstitration.....	34
3.2.4 Bestimmung der Konzentration an aktivem Antikörper .....	35
3.2.5 Ellipsometrie .....	35
3.2.6 Sequenzierung .....	36

---

4 Ergebnisse und Diskussion .....	37
4.1 Beobachtung von Festphasensynthesen mit RIfS .....	37
4.1.1 RIfS-Messungen in organischen Lösungsmitteln.....	37
4.1.2 Zusätzliche Effekte auf das Schichtdickensignal bei Injektion.....	44
4.1.3 Kupplung von Fmoc-Aminocapronsäure in 1-2-Dimethoxyethan.....	47
4.1.4 Kupplung von Fmoc-Aminosäuren in DMF .....	52
4.1.5 Syntheseverfolgung für ein Hämagglutinin-Peptid .....	55
4.1.6 Referenzanalytik .....	61
4.1.7 Syntheseverfolgung bei nicht-peptidischen Festphasensynthesen .....	64
4.1.8 Zusammenfassende Diskussion .....	68
4.2 Biospezifische Detektion in der HPLC mit RIfS .....	70
4.2.1 Charakterisierung der hochkreuzreaktiven anti-Isoproturon Antikörper .....	70
4.2.2 Einfluß von Methanol auf die Affinitäten.....	76
4.2.3 Kopplung von HPLC mit RIfS.....	78
4.2.4 HPLC-Trennung von Pestiziden mit selektiver Detektion durch RIfS .....	82
4.2.5 Quantitative Auswertung der RIfS-Chromatogramme .....	85
4.2.6 Analyt-Anreicherung mittels Vorsäule .....	88
4.2.7 Limitierende Parameter und Gesamtperformance.....	89
4.2.8 Zusammenfassende Diskussion .....	91
4.3 Aufbau eines RIfS-Systems zur simultanen Detektion .....	93
4.3.1 Untersuchung der limitierenden Parameter des Einkanal-RIfS-Aufbaus.....	93
4.3.2 Aufbau eines Zweikanalsystems zur simultanen Referenzierung.....	98
4.3.3 Referenzierung der Lichtquelle.....	99
4.3.4 Referenzierung durch RIfS-Messungen an 2 Spots .....	101
4.3.5 Anwendung der Zweispotdetektion .....	107
4.3.6 Zusammenfassende Diskussion .....	110
5 Zusammenfassung und Ausblick .....	112
5.1 Zusammenfassung .....	112
5.2 Ausblick .....	115
6 Literatur.....	117



---

7 Anhang .....	125
7.1 Abkürzungen	125
7.2 Publikationen	126
7.3 Akademische Lehrer	127
7.4 Lebenslauf	128



## 1 Einleitung

### 1.1 Motivation der Arbeit

Die Detektion von Wechselwirkungen ist von zentraler Bedeutung in der Chemie und Biochemie. Diese können nach den auftretenden Energieänderungen in starke und schwache Wechselwirkungen eingeteilt werden. Zu ersteren werden ionische, metallische und kovalente Bindungen, also Wechselwirkungen zwischen Atomen, gezählt. Zu den schwachen Wechselwirkungen gehören Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen permanent geladener Gruppen und induzierter Dipole sowie die in wäßriger Umgebung auftretenden hydrophoben Wechselwirkungen. Diese sorgen nicht nur dafür, daß die Aggregatzustände flüssig und fest existieren, sondern sind auch die Voraussetzung für den Aufbau struktureller Organisation in allen biologischen Systemen. Schwache Wechselwirkungen spielen auch die zentrale Rolle bei biochemischen Prozessen wie DNA-Replikation, Proteinfaltung, spezifische Erkennung von Substraten durch Enzyme, von Antigenen durch Antikörper und Bindung von Signalmolekülen an Rezeptoren. Sie werden auch als Affinitätsbindungen bezeichnet. Ihre häufig sehr hohe Spezifität rührt daher, daß hier eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen zusammenwirken (siehe z. B. Israelachvili 1992).

Aus physikochemischer Sicht lassen sich kovalente Bindungsbildung und Affinitätsbindung gleich behandeln. Der Verlauf der Gleichgewichtseinstellung wird durch die kinetischen Konstanten für die Hin- und die Rückreaktion  $k_a$  und  $k_d$  definiert. Der Gleichgewichtszustand wird durch eine Gleichgewichtskonstante  $K$  beschrieben, die sich aus den Konzentrationen aller beteiligten Spezies ergibt. Für Affinitätsreaktionen werden auch die Begriffe Affinitäts- oder Dissoziationskonstante benutzt, die zueinander invers sind<sup>1</sup>.

Zur Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten kann die Wärmetönung der Reaktion kalorimetrisch verfolgt werden. Durch moderne Mikrokalorimeter sind Gleichgewichtskonstanten bis  $10^8 \text{ M}^{-1}$  bestimmbar (Wiseman *et al.* 1989). Dies erlaubt die Charakterisierung auch vieler biologischer Systeme. Vorteil dieser Methode ist, daß gleichzeitig Reaktionsenthalpie und -entropie erhalten werden. Trotzdem wird die Gleichgewichtskonstante meist aus den Konzentrationen im Gleichgewichtszustand bestimmt. Um die kinetischen Konstanten zu erhalten, muß der zeitliche Verlauf der Konzentrationen ermittelt werden. Bei chemischen

---

<sup>1</sup> Die Verwendung eines dieser beiden Begriffe hängt davon ab, ob die Reaktion zweier Teilchen zu einem Komplex oder der Zerfall des Komplexes als Hinreaktion betrachtet wird.

Reaktionen kommen dabei in der Regel spektroskopische Verfahren zum Einsatz. Bei biochemischen Reaktionen sind die zu detektierenden Konzentrationen aufgrund der oft hohen Gleichgewichtskonstanten häufig sehr klein, so daß hier Verfahren unter Verwendung radioaktiver, fluoreszenzbasierter oder enzymatischer Markierungen verwendet werden. Gleichgewichtskonzentrationen können durch Gleichgewichtsdialyse (Marrack und Smith, 1932, Eisen und Karush, 1949) bestimmt werden, oder durch Verwendung von Trenntechniken wie Fällung, Ultrazentrifugation, Filtration und Elektrophorese. Eine einfache Abtrennung ungebundener Spezies durch Waschschriffe erlauben die Festphasen-Testformate wie ELISA oder RIA. Den Nachweis von Bindung in der homogenen Phase ohne Abtrennung der ungebundenen Spezies erlauben fluoreszenzbasierte Verfahren wie Fluoreszenzlöschung (Velick *et al.*, 1960), die Fluoreszenzpolarisation (Dandliker *et al.*, 1964), der Förster-Energietransfer (Ullman *et al.*, 1976) und die Fluoreszenz-Korrelation (Eigen und Rigler, 1994).

Insbesondere die Markteinführung einer markierungsfreien optischen Methode zur Detektion von biomolekularer Wechselwirkung an einer Transduceroberfläche (das BIACore System) im Jahre 1990 führte zur Entwicklung und zum Einsatz verschiedener optischer und massensensitiver Detektionsverfahren (für einen Überblick der optischen Methoden siehe z. B. Brecht und Gauglitz, 1995, Gauglitz 1996, Haake *et al.*, 2000a). Ihnen gemeinsam ist, daß die Wechselwirkungen einer an der Transduceroberfläche immobilisierten Spezies mit einem gelöstem Bindungspartner *zeitaufgelöst* und *markierungsfrei* verfolgt werden können. Damit erlauben diese Techniken, die Bindung direkt zu detektieren und damit die Gleichgewichtseinstellung und das Gleichgewicht selbst zu beobachten. Die dabei erreichten Nachweisgrenzen sind unter Berücksichtigung der Tatsache, daß markierungsfrei beobachtet wird, beachtlich. Sie reichen je nach Methode und untersuchtem System von  $\text{ng/mm}^2$  bis hin zu  $\text{fg/mm}^2$ .

Zu diesen Verfahren gehört die im Arbeitskreis entwickelte Reflektometrische Interferenzspektroskopie RIfS, die seit einigen Jahren erfolgreich zur Detektion der Wechselwirkung zwischen Polymeren und gasförmigen bzw. in Wasser gelösten Analyten (Gauglitz *et al.*, 1993; Nopper und Gauglitz, 1998) sowie zur Detektion von biomolekularer Wechselwirkung (z. B. Brecht *et al.*, 1992; Piehler *et al.*, 1997; Piehler und Schreiber, 1999) eingesetzt wird.

## 1.2 Zielsetzung und Gliederung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Anwendung der Reflektometrische Interferenzspektroskopie auf zwei völlig neue Gebiete untersucht werden. Im ersten Teil dieser Arbeit

ging es dabei um die Detektion kovalenter Wechselwirkungen, genauer um die Frage, ob organische Festphasensynthesen an Glasyt-Oberflächen mit RIfS beobachtet werden können. Diese Fragestellung ergab sich im Rahmen eines BMBF Projektes, in dem auf der Basis der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie ein Aufbau mit abbildender Optik erstellt wurde, der die parallele Detektion von Wechselwirkungen in speziellen Mikrotiterplatten mit Interferenzschicht erlaubt. Ziel des Projekts ist die Etablierung von RIfS als markierungsfreier Methode zum Hochdurchsatzscreening. Neben Assayformaten bei denen das Target mit gelösten potentiellen Wirkstoffen aus einer Bibliothek versetzt wird, ist auch die Beobachtung von Targetwechselwirkungen mit immobilisierten Substanzen denkbar. Werden diese direkt in den Kavitäten der Mikrotiterplatte synthetisiert, ist ein Monitoring dieser Festphasensynthesen sehr attraktiv, um den Synthesefortschritt zu überwachen. Da die dabei synthetisierten Substanzmengen im Bereich von  $\text{pg/mm}^2$  liegen, sind die meisten für ein Monitoring verwendeten Detektionsprinzipien nicht geeignet.

Dabei sollte zunächst untersucht werden, inwieweit eine solche Beobachtung aufgrund des deutlich höheren Brechungsindex organischer Lösungsmittel im Vergleich zu den bisher eingesetzten Medien Luft und wäßrige Lösungen überhaupt möglich ist. Nach Klärung dieser grundsätzlichen Fragestellung sollte anhand von Modellsystemen Festphasensynthesen zeit-aufgelöst beobachtet und anschließend die Wechselwirkung mit einem Protein untersucht werden.

Im zweiten Teil sollte die Detektion biochemischer Wechselwirkungen zwischen einem Rezeptormolekül und der von einer HPLC-Säule eluierten Substanzen zur biospezifischen Detektion verwendet werden, d. h. zur Quantifizierung gewichtet mit der biologischen Aktivität des Rezeptors zum entsprechenden Analyten.

Die durchgeführten Arbeiten bauten auf Untersuchungen zur biospezifischen Detektion mit fluoreszenzbasierten Methoden auf (Oosterkamp *et al.*, 1994a, Oosterkamp *et al.* 1996). In diesen Untersuchungen wurde das Eluat der HPLC-Säule mit Rezeptor-Proteinen gemischt und die Wechselwirkung zur biospezifischen Detektion der Analyte verwendet. In der vorliegenden Arbeit sollten ein HPLC-RIfS-Kopplungsaufbau erstellt und mit einem kreuzreaktiven Antikörper als Modellsystem die Leistungsfähigkeit untersucht werden.

Im Rahmen dieser beiden Fragestellungen zeigte sich immer deutlicher, daß es sich um Bereiche handelte, in denen die Stabilität des RIfS-Signals von entscheidender Bedeutung ist. Daher wurden im dritten Teil der Arbeit zunächst die limitierenden Parameter der Methode bestimmt und ein Aufbau erstellt, der durch die Verwendung zweier Diodenzeilendetektoren

eine höhere Stabilität des Signals zeigte und gleichzeitig ermöglichte, Einflüsse von Lösungsmittel und unspezifischer Bindung zu minimieren.

### *Gliederung der Arbeit*

Zunächst werden in einem theoretischen Teil die Grundlagen der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie diskutiert, soweit sie für das Verständnis der Untersuchungen und Modellrechnungen nötig sind. Anschließend werden die Besonderheiten der Detektion an einer fest-flüssig Phasengrenze gezeigt. In weiteren Abschnitten werden die Grundlagen der Festphasensynthese, der Chromatographie und der biospezifischen Detektion erläutert.

Nach der Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden werden im nächsten Kapitel die Ergebnisse der drei beschriebenen Gebiete vorgestellt und diskutiert.

In einem abschließenden Kapitel werden schließlich die Ergebnisse zusammenfassend bewertet.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie RIfS

Die in dieser Arbeit verwendete Standardmethode ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie RIfS (Gauglitz *et al.*, 1993). Grundlage ist die Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten, mit deren Hilfe die optische Schichtdicke bestimmt werden kann (Hecht, 1989; Bergmann und Schaefer, 1993) und aus dieser bei bekannten Dispersionsverläufen die physikalische Schichtdicke. Langmuir und Schäfer beschrieben schon 1937 die Verwendung von Weißlichtinterferenz zur Untersuchung von dünnen Proteinschichten. Die Schichtdicke der adsorbierten Proteinfilm, darunter auch Monolagen, wurde als Farbänderung der Interferenzfarbe dünner Bariumstearatfilme nach der Proteinadsorption detektiert. Durch Vergleich dieser Farbänderungen mit der von Bariumstearatfilmen, deren Schichtdicke durch die Präparationstechnik bekannt war, konnten die Autoren die Schichtdicke der Proteinschichten abschätzen.

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie beruht auf der zeitaufgelösten Detektion spektraler Veränderungen im reflektierten Licht. Hierdurch kann z. B. das Quellen von Polymerfilmen bei Sorption von organischen Stoffen (Gauglitz *et al.*; 1993) und die Wechselwirkung von Biomolekülen mit an einer Oberfläche immobilisierten Interaktionspartnern in Submonolagen untersucht werden (z. B. Brecht *et al.*, 1992; Piehler und Schreiber, 1999). Inzwischen wurde durch Modifikation eines Küvettenpektrometers mit kommerziellen Komponenten ein kompaktes und preisgünstiges RIfS-Detektionssystem mit vergleichbarer Leistungsfähigkeit zu bestehenden Laboraufbauten aufgebaut (Schmitt *et al.*, 1997). Ein weiterer Einsatzbereich für die Methode im sogenannten Hochdurchsatzscreening wurde durch einen parallelisierten Aufbau erschlossen (Rothmund *et al.*, 1997). Dieser ermöglicht durch Verwendung von abbildender Optik RIfS-Messungen an 40 Probenpositionen. Mittlerweile wurde ein Aufbau für die Detektion von 384 Probenpositionen im Mikrotiterplattenformat für markierungsfreie Assays im Hochdurchsatz-Screening nach Wirkstoffen realisiert.

Die Anwendung von RIfS für die Detektion der Bindung von Biomolekülen aus einer wässrigen Phase an Oberflächen ist bei Brecht (1993) ausführlich diskutiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde RIfS unter anderem zum ersten Mal zur Detektion von kovalenten Bindungen an eine Oberfläche aus *organischen* Lösungsmitteln verwendet. Da sich die organischen Lösungsmittel auf die detektierten Signale und die Signalqualität auswirken, soll

im folgenden die Theorie der Methode soweit vorgestellt werden, wie sie zur Diskussion dieser Auswirkungen nötig ist. Anschließend werden die Komponenten eines RfS-Aufbaus beschrieben, da im Rahmen dieser Arbeit die limitierende Parameter des Einkanal-RfS-Meßsystems bestimmt und ein System mit höherer Signalstabilität aufgebaut wurden (Kap. 4.3).

### 2.1.1 Beschreibung der theoretischen Grundlagen der RfS

Trifft elektromagnetische Strahlung auf eine Phasengrenze zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex, so wird abhängig vom Einfallswinkel und den Brechungsindizes der beiden Medien je ein Teil der Strahlung reflektiert und transmittiert (siehe Abbildung 2-1).

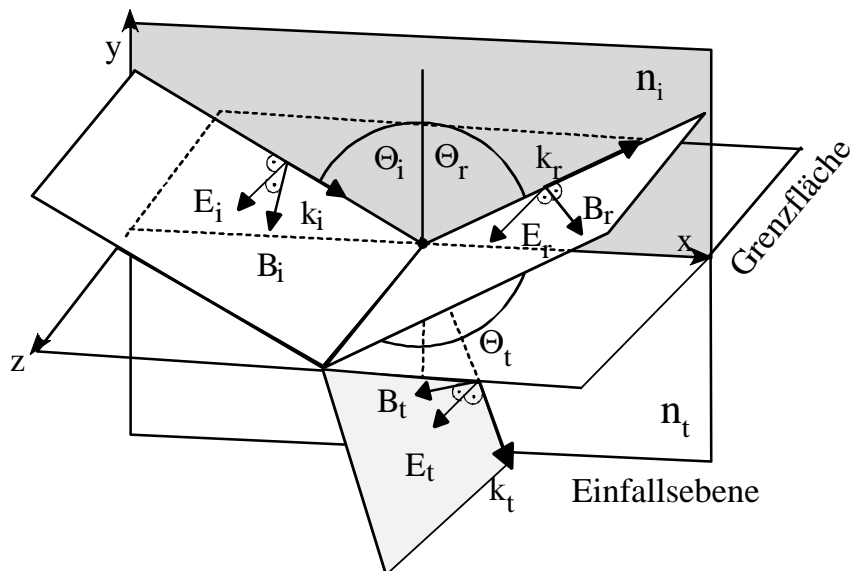


Abbildung 2-1 Transmission und Reflexion an einer Phasengrenze (nach Hecht, 1989).  
*E*: Elektrischer Feldvektor; *B*: Magnetischer Feldvektor  $\Phi$ : Einfallswinkel;  
*k* Wellenvektor, *n*: Brechungsindizes. Indizes: *i*: einfallender, *t*  
 transmittierter und *r* reflektierter Strahl.

Dieses Verhalten wird durch die Maxwell'schen Gleichungen beschrieben. Die Reflexionskoeffizienten *r*, die die relative Amplitude des reflektierten Teilstrahls bezogen auf die Amplituden des E-Feldes  $E_i$  des einfallenden Strahls darstellen, sind abhängig vom Einfallswinkel  $\Phi_i$  und den Brechungsindizes  $n_i$  und  $n_t$  der Medien. Sie lassen sich aus den Fresnel'schen Gleichungen berechnen. Für einen senkrecht zur Einfallsebene polarisierte Strahl gilt für nicht-absorbierende Medien:



$$r_{\perp} = \frac{E_{\perp r}}{E_{\perp i}} = \frac{n_i \cos \Phi_i - n_t \cos \Phi_t}{n_i \cos \Phi_i + n_t \cos \Phi_t} \quad (1)$$

und

$$r_{\parallel} = \frac{E_{\parallel r}}{E_{\parallel i}} = \frac{n_t \cos \Phi_i - n_i \cos \Phi_t}{n_i \cos \Phi_t + n_t \cos \Phi_i} \quad (2)$$

für einen parallel polarisierten Strahl.

Für senkrechten Einfall (alle Winkel  $\Phi = 0^\circ$ ) ist die Einfallsebene nicht mehr definiert und es ergibt sich folgende vereinfachte Form des Fresnelschen Reflexionsgesetzes:

$$\left( \frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{0^\circ} = \frac{n_i - n_t}{n_i + n_t} \quad (3) \text{Für dünne, planparallele Schichten}$$

tritt Mehrfachreflexion auf (Abbildung 2-2). Ist die Schichtdicke kleiner als die Kohärenzlänge ergeben sich Interferenzeffekte.

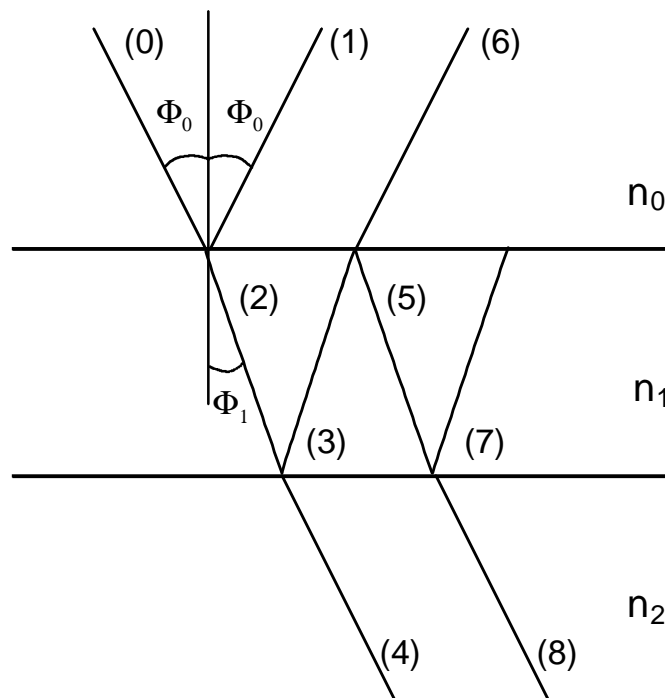


Abbildung 2-2 Mehrfachreflexion an einer planparallelen Schicht.

Bei geringen Reflektivitäten müssen nur der direkt reflektierte Teilstrahl (1) und der an der zweiten Phasengrenze reflektierte Strahl (3), der die erste Phasengrenze als (6) durchdringt, berücksichtigt werden. Mit den Fresnelkoeffizienten  $r_1$  (Reflexion an der Grenzfläche  $n_0/n_1$ ) und  $r_2$  (Reflexion an der Grenzfläche  $n_0/n_1$ ) ergibt sich unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung  $\delta$  des zweiten Teilstrahls der Gesamtreflexionskoeffizient  $R$ :

$$R = \frac{r_1 + r_2 e^{-2i\delta}}{1 + r_1 r_2 e^{-2i\delta}} \quad (4)$$

Für kleine Reflexionskoeffizienten kann der zweite Summand im Nenner vernachlässigt werden. Bei senkrechtem Einfall und geringen Reflektivitäten ergibt sich für eine Schicht der Dicke  $d_1$  und des Brechungsindex  $n_1$  unter Berücksichtigung eines Phasensprungs  $\phi$  beim Übergang vom optisch dünneren ins dichtere Medium für die Phasenverschiebung  $\delta$

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}, \quad (5)$$

da der zusätzliche Lichtweg des zweiten Teilstrahls der zweifachen optischen Schichtdicke  $n_1 d_1$  entspricht. Damit erhält man für die reflektierte Intensität bei Interferenz der reflektierten Teilstrahlen mit den Intensitäten  $I_1$  und  $I_2$  abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}\right) \quad (6)$$

D. h. man erhält ein spektrales Interferenzmuster in Abhängigkeit von der *optischen Schichtdicke*  $n_1 d_1$ , die sich für den Fall einer einzelnen Schicht eindeutig aus der Position der Extrema bestimmen läßt. In Abbildung 2-3 sind die Interferenzspektren für zwei unterschiedliche optische Schichtdicken schematisch gezeigt. Zu erkennen sind die Maxima 4, 3, 2 und 1 (nur zur Hälfte), sowie die Minima 4,5 (nur zur Hälfte), 3,5; 2,5 und 1,5

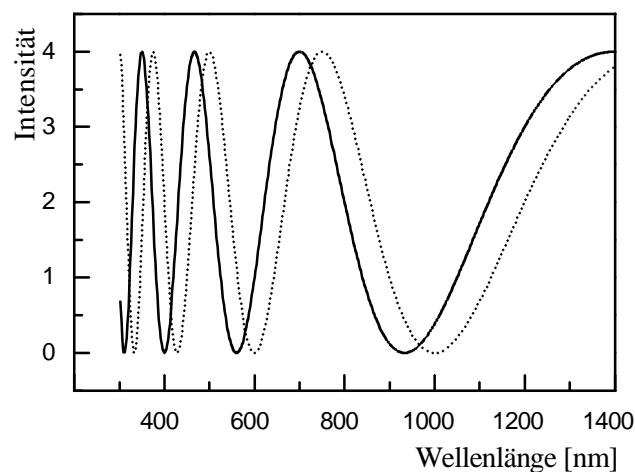


Abbildung 2-3 Nach Gl. (6)) berechnetes Reflexionsinterferenzspektrum für die optischen Schichtdicken 700 nm und 750 nm. Die Intensitäten  $I_1$  und  $I_2$  wurden willkürlich gleich 1 gesetzt.

Bei Mehrschichtsystemen läßt sich keine analytische Lösung mehr für die Berechnung der Reflexion angeben, hier ergibt sich der Reflexionskoeffizient rekursiv aus den Einzelreflexionen jeder Schicht  $l$  für senkrechte Polarisation gemäß:

$$r^l = \frac{E_{\perp r}}{E_{\perp i}} = \frac{r_{\perp}^{(l,l-1)} + r_{\perp}^{(l-1)} \exp\left\{-2i\omega \frac{n^{(l-1)}}{c} \cos \Phi^{(l-1)} d^{(l-1)}\right\}}{1 + r_{\perp}^{(l,l-1)} r_{\perp}^{(l-1)} \exp\left\{-2i\omega \frac{n^{(l-1)}}{c} \cos \Phi^{(l-1)} d^{(l-1)}\right\}} \quad (7)$$

und analog für parallele Polarisierung. Der Reflektivitätskoeffizient für nicht-polarisiertes Licht ergibt sich aus den Reflektivitätskoeffizient für senkrecht und parallel polarisiertes Licht

$$r = \sqrt{\frac{r_{\perp}^2 + r_{\parallel}^2}{2}}. \quad (8)$$

Für die Anwendung der Weißlichtinterferenz als Detektionsmethode muß eine geeignete Interferenzschicht aus mechanischen Gründen auf einen Träger aufgebracht werden. Aus weiter unten erläuterten Gründen werden für Messungen mit RIfS Mehrschichtsysteme verwendet. Hier läßt sich die optische Schichtdicke einzelner Schichten nicht mehr direkt aus der Lage der Extrema berechnen, da das erhaltene Interferenzmuster durch die dielektrischen Eigenschaften aller Schichten bestimmt wird. Unter Annahme der Gültigkeit von Gl. (6) läßt sich aus dem Interferenzmuster allerdings eine *scheinbare* optische Schichtdicke eines Schichtsystems bestimmen, die das RIfS-Signal darstellt.

Nach Brecht (1993) sollen nun einige Begriffe zur Beschreibung eine Interferenzspektrums eingeführt werden, siehe auch Abbildung 2-4.  $I_{max}$  beschreibt die maximale reflektierte Intensität des Interferenzspektrums,  $I_{fz}$  den Nutzsinalhub (Modulationstiefe), d. h. die Differenz zwischen  $I_{max}$  und der im Interferenzminimum reflektierte Intensität  $I_{Min}$ .

Aus Gl. (6) erhält man für  $I_{fz}$  die Beziehung:

$$I_{fz} = 4\sqrt{I_1 I_2}, \quad (9)$$

da der Cosinus-Term Werte zwischen  $-2\sqrt{I_1 I_2}$  und  $2\sqrt{I_1 I_2}$  annehmen kann.

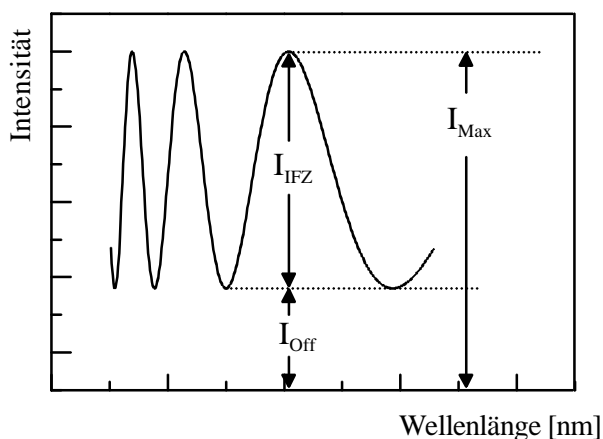


Abbildung 2-4 Größen zur Beschreibung von Interferenzspektren. Nach Brecht 1993.

Der Nutzsignalanteil  $F_{Ifz}$  gibt das Verhältnis aus Nutzsignal und Gesamtsignal an, d. h. den Anteil am reflektierten Licht, der Informationen über die Interferenzschicht trägt. Alle Offset-Anteile schränken den dynamischen Bereich des Detektors ein und verschlechtern damit das Signal-Rauschverhältnis.

$$F_{Ifz} = \frac{I_{Max} - I_{Min}}{I_{Max}} = \frac{I_{Ifz}}{I_{Max}} \quad (10)$$

Wie oben erwähnt werden für Messungen mit RIfS Mehrschichtsysteme verwendet. Da die Untersuchung von Proteinbindungen an die Transduceroberfläche die häufigste Anwendung im Bereich von optischen Affinitätsmessungen darstellt, wurde ein Schichtsystem speziell für diesen Einsatzbereich optimiert (Brecht und Gauglitz, 1994), das inzwischen zum Standardtransducer für markierungsfreie „Biomessungen“ im Arbeitskreis wurde. In Abbildung 2-5 ist dieses Schichtsystem, einschließlich Lichtleiter gezeigt.

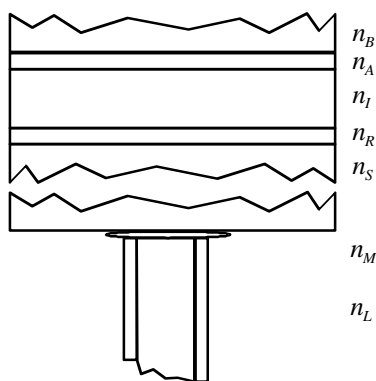


Abbildung 2-5 Schichtsystem des Standard-RIfS-Aufbaus für Messungen von Protein-Wechselwirkungen.

Weißlicht wird durch den Lichtleiter (Brechungsindex  $n_L$ ) auf die Rückseite des Transducers geführt. Um die Reflexion an dieser Grenzfläche zu minimieren, wird der Spalt zwischen Lichtleiter und Glaschip (dem sogenannten Substrat, Brechungsindex  $n_S$ ) mit einer Immersionsflüssigkeit (Glycerin, Brechungsindex  $n_M$ ) gefüllt. Die Interferenzschicht besteht aus Siliziumdioxid ( $n_I$ ), dessen Brechungsindex für die Beobachtung von Proteinbindung gut geeignet ist und außerdem den Vorteil bietet, daß eine gut etablierte Silanchemie zur Oberflächenmodifikation zur Verfügung steht. Die eigentlich untersuchte Schicht, der sogenannte Adlayer ( $n_A$ ) besitzt bei Biomessungen, d .h. unter Wasser, Brechungsindizes zwischen 1,36 und 1,39 (Piehler, 1997). In die Reflektivität an der Grenzfläche Adlayer-flüssige Phase geht der Brechungsindex der flüssigen Phase  $n_B$  ein. Diese flüssige Phase wird auch als Bulk bezeichnet. Die Auswirkungen der höheren Brechungsindizes auf die in Kapitel 4.1 ausgeführten Beobachtungen von Festphasensynthesen in organischen Lösungsmitteln werden im Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Da der Nutzsignalanteil dann maximal wird (Brecht und Gauglitz, 1994), wenn gilt:

$$n_I = \sqrt{n_S n_T}, \quad (11)$$

hochbrechende Gläser jedoch teuer und nur aufwendig zu polieren sind, wird eine zusätzliche, hochbrechende Schicht ( $n_R$ ) aus Tantalpentoxid zwischen Substrat und Interferenzschicht aufgebracht. Da deren Schichtdicke deutlich unter den Wellenlängen des sichtbaren Lichtes liegt, treten keine Interferenzeffekte durch diese reflexionsverstärkende Schicht auf. Die Reflektivität an der Grenzfläche zwischen Substrat und Interferenzschicht kann durch die Wahl der physikalischen Schichtdicke der  $Ta_2O_5$ -Schicht auf einen ähnlichen Wert wie die Reflektivität an der Grenzfläche Interferenzschicht-Bulk gebracht werden. Für die im Arbeitskreis als Standardtransducer für Einkanalmessungen von Biomolekülen unter wäßrigen Lösungen verwendeten Glaschips wurde die Tantalpentoxidschichtdicke mit 10 nm auf den Anwendungsbereich wäßriger Lösungen optimiert.

### 2.1.2 Komponenten eines RIfS-Aufbaus

Der typische Aufbau eines Einkanal-Meßsystems für RIfS-Messungen ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Das Licht einer Halogenlampe wird in einen Lichtleiter eingekoppelt und auf den RIfS-Transducer geführt. Das reflektierte Licht wird in den gleichen Lichtleiter eingekoppelt und über einen 2:1 Koppler in den Eingang eines Diodenarrayspektrometers geführt. Die Spektren werden mit einem PC erfaßt und ausgewertet, der zusätzlich das entsprechende

Probenhandhabungssystem steuert. Damit können zeitaufgelöst und online RfS-Spektren aufgenommen und Prozesse an der Transduceroberfläche beobachtet werden.

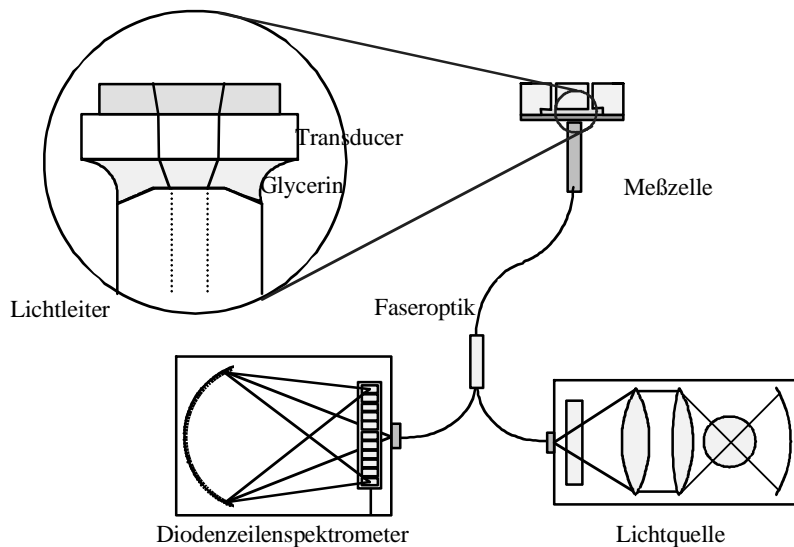


Abbildung 2-6 Aufbau eines Einkanal-RfS-Meßsystems.

Im folgenden sollen die 4 Komponenten, die für Einkanal-RfS-Systeme verwendet werden, beschrieben werden. Je zwei Elemente sind dabei aktiv (Lichtquelle und Detektor) bzw. passiv (Lichtleiter/Koppelement und Transducerchip).

### 1. Lichtquelle

Für den oben beschriebenen RfS-Aufbau mit spektraler Detektion wird eine Weißlichtquelle benötigt. Brecht (1993) zeigte, daß Halogenlampen in Verbindung mit einem hochstabilen Netzteil und gelöteten Verbindungen (zur Reduktion von Schwankungen in der Lampenversorgung durch Übergangswiderstände) geeignet sind. Die spektrale Verteilung der Strahlung im sichtbaren Bereich von Glühlampen wird durch die Planckschen Strahlungsformel beschrieben, wobei zu berücksichtigen ist, daß es sich um einen sogenannten grauen Strahler handelt, dessen Strahlungsvermögen geringer ist als eines schwarzen Strahlers. Das Maximum der Strahlstärke (Wiensches Verschiebungsgesetz) liegt jedoch ungefähr bei der gleichen Wellenlänge (s. z. B. Bergmann und Schaefer 1993). Da das Licht in einem Lichtleiter auf den Transducerchip geführt wird, ist nicht die abgestrahlte Leistung der Lampe, sondern die Lichtmenge, die in den Lichtleiter eingekoppelt wird, entscheidend. Hier gehen die numerische Apertur des Lichtleiters, des Linsensystems, das die Glühwendel auf den Lichtleitereingang abbildet, sowie die Leuchtdichte der Lampe ein. Für Fluktuationen im

Lichtfluß sorgen Bewegungen der Glühwendel, Temperaturänderungen an der Kolbenaußenseite durch Luftbewegungen und Schwankungen der Versorgungsspannung.

Neben solchen systematischen Schwankungen im Lichtfluß führt die zufällige Emission von Photonen durch die Lichtquelle zu statistischen Schwankungen. Während die systematischen Änderungen im Lichtfluß durch eine Referenzmessungen beseitigt werden können, ist dies für die statistischen Schwankungen nicht möglich. Durch  $n$  Mehrfachmessungen kann für letztere das Signal-Rauschverhältnis gemäß

$$\frac{S}{N} = \sqrt{n}, \quad (12)$$

verbessert werden.

## 2. Lichtleiter und Koppellement

Für alle eingesetzten RIFS-Aufbauten wurde die gleiche Faseroptik verwendet. Daher soll hier nur kurz auf dieses Bauteil eingegangen werden. Zum Einsatz kam ein in LIGA-Technik (*Lithographie Galvanoformung und Abformung*) hergestellter 1:2 Koppler aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit Multimode-Lichtleitern aus dem gleichen Material. Der Vorteil dieser Bauteile ist ein im Vergleich zu Quarzlichtleitern um eine Größenordnung günstigerer Preis, da erstere für die Signalübertragung in Datennetzen (sogenannten LAN, *Local Area Network*) entwickelt und hergestellt werden. Wichtig für die Verwendung zur Signalübertragung ist hierbei eine ausgeprägte Absorptionsbande bei 730 nm, die den nutzbaren Lichtbereich einschränkt, da im Bereich der Bande aufgrund der sehr kleinen Lichtintensitäten das Signal-Rauschverhältnis stark ansteigt. Die Auswirkungen mechanischer Einflüsse durch Verformungen auf die Transmission und damit das RIFS-Signal sind bei Seemann (1995) beschrieben. Um einen solchen Einfluß auszuschließen, wurden die Lichtleiter im Aufbau fixiert bzw. in einem Schlauch geführt.

## 3. Diodenarraydetektor und Elektronik

In dieser Arbeit wurden ausschließlich monolithische Diodenzeilenspektrometerbausteine der Firma Zeiss verwendet. Diese MMS-Spektrometer bestehen aus einem linsenähnlichen Glaskörper, auf dem als dispersives Element ein Gitter aufgeprägt ist, das den Eingangsspalt auf eine fest mit dem Glaskörper verklebte Diodenzeile abbildet. Durch diese monolithische Bauweise ist die Wellenlängenstabilität bei Erschütterungen und Temperaturänderungen sehr hoch. Wichtige Größen des Detektors sind Linearität, Empfindlichkeit, Untergrundsignal

(Dunkelstrom), Rauschen und Sättigungswert. Der lineare Bereich beträgt für Siliziumphotodioden 5-7 Größenordnungen (Ingle and Crouch, 1988). Die Empfindlichkeit der MMS beträgt laut Herstellerangaben  $10^{13}$  Counts/Ws, ein relativ hoher Wert. Aus Dunkelstrom  $I_{dark}$ , Rauschen  $sdv(I_{dark})$  und Sättigungswert  $I_{sat}$  errechnet sich der Dynamikbereich nach

$$D = \frac{I_{sat}}{I_{dark} + 3sdv(I_{dark})}, \quad (13)$$

wobei zusätzlich zum Rauschen des Dunkelstroms auch Beiträge der Digitalisierungselektronik zu berücksichtigen sind. Die verschiedenen Beiträge zum Detektorrauschen werden bei Rothmund (1999) diskutiert.

#### 4. Transducerchip

Die Eigenschaften des Interferenzschichtsystems wurden bereits in Kapitel 2.1.1 diskutiert, ebenso die Vorteile der Verwendung einer silikatischen Oberfläche. In dieser Arbeit wurde mit Interferenzschichten bestehend aus 10 nm  $Ta_2O_5$  und 500 bzw. 330 nm  $SiO_2$  gearbeitet und das Minimum 2,5 bzw. 1,5 ausgewertet. Die  $SiO_2$ -Schichtdicke von 330 nm wurde als optimal für senkrechten Einfall, Weißlicht einer Halogenlampe geführt im PMMA-Lichtleiter und wässrige Lösungen berechnet, da damit das Maximum der Lichtintensität im Auswertungsbereich liegt und die Absorptionsbande des PMMA im Rahmen der zu erwarteten Minimumverschiebungen noch nicht stört.

#### 2.2 Detektion und Reaktionen an einer Oberfläche

Reaktionen an einer Oberfläche unterscheiden sich oft von denen in Lösung, da Transportprozesse wesentlich häufiger eine limitierende Rolle spielen. Die Auswirkungen auf die Detektion von Affinitätsreaktionen an einer Transduceroberfläche sind für Biosensoren in der Literatur ausführlich diskutiert (z.B. Eddowes, 1987; Glaser, 1993; O'Shannesy, 1994, Schuck, 1996; Piehler, 1997b; Haake *et al.*, 2000a). Da zur Affinitätsbestimmung und für die Kopplung HPLC-RfS massentransportlimitierte Bindung ausgenutzt wurde, werden im folgenden kurz die Grundlagen der Kinetik von Oberflächenreaktionen, der Einfluß der Diffusion und das Testformat des Bindungshemmtests erklärt. In einem weiteren Abschnitt wird auf notwendige Oberflächenmodifikationen und die Referenzierung der gemessenen Signale eingegangen.



### 2.2.1 Kinetik von Oberflächenreaktionen und massentransportlimitierte Bindung

Die Bindung eines gelösten Reaktionspartners  $B$  an eine immobilisierte Spezies  $A$  unter Bildung des Komplexes  $AB$  gehorcht im einfachsten Fall (1:1 Kinetik) folgender Kinetik:



wobei  $k_a$  die Assoziationsraten- und  $k_d$  Dissoziationsratenkonstante darstellen.

Unter Durchflußbedingungen bleibt die Konzentration an  $B$  im Volumen konstant. Unter Einführung der Oberflächenkonzentration  $\Gamma$  an  $AB$  (auch Oberflächenbeladung genannt) läßt sich das Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung aufstellen:

$$d\Gamma/dt = k_a c (\Gamma_{\max} - \Gamma) - k_d \Gamma \quad (15)$$

$\Gamma_{\max}$  ist dabei die maximale Oberflächenbeladung (Bindungskapazität) und  $c$  die Volumenkonzentration an  $A$ . Integration ergibt:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s t}) \quad (16)$$

mit der konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten  $k_s$ :

$$k_s = k_a \cdot c + k_d \quad (17)$$

und der Gleichgewichtsbeladung (Langmuir Isotherme):

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{\max} \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (18)$$

$K$  ist hierbei die thermodynamische Gleichgewichtskonstante, im Falle von (biochemischen) Affinitätsreaktionen auch Affinitätskonstante genannt.

Das bisher beschriebene Verhalten wird allerdings nur dann detektiert, falls der Transport, d. h. die Diffusion an die Oberfläche, keine Rolle spielt. Insbesondere für den Fall, daß  $B$  ein Makromolekül darstellt, kann die Diffusion nicht mehr vernachlässigt werden. Dabei treten die Grenzfälle rein kinetisch und rein diffusionskontrolliertes Bindungsverhalten auf. Bestimmend sind dabei folgende Parameter (Glaser, 1993): Das Produkt aus maximaler Oberflächenbeladung  $\Gamma_{\max}$  und der sogenannten scheinbaren Assoziationsratenkonstante  $k'_a$  (engl. apparent association rate constant) im Verhältnis zum Onsager Koeffizienten des Massentransports  $L_M$  (bei manchen Autoren auch mit  $k_m$  bezeichnet). Die scheinbare Assoziationsratenkonstante  $k'_a$  ist die Größe, die man erhält, wenn man eine Auswertung der Meßkurven gemäß einer einfachen 1:1 Kinetik durchführt. Sie weicht je nach Einfluß des Massentransports entsprechend von der wirklichen Assoziationsratenkonstante ab.

Der Massentransportkoeffizient ist nach Sjölander und Urbanitzky (1991) für ein Durchflußsystem definiert nach:

$$L_m = k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 f}{h^2 b l}} \quad (19)$$

wobei  $D$  den Diffusionskoeffizient,  $f$  die Volumenflußrate,  $h$  und  $b$  die Höhe und die Breite des Flußkanals, sowie  $l$  den Abstand zwischen Beginn des Flußkanals und dem Detektionspunkt darstellen. Glaser unterschied drei Fälle, wobei  $g$  die Oberflächenkonzentration an Bindungsstellen, also  $g = \Gamma_{max} - \Gamma$  ist:

- a)  $k'_{ag} \ll L_m$ , hier ist die Kinetik frei von Massentransporteinfluß und die Bindungskurven können problemlos zur Bestimmung der kinetischen Konstanten herangezogen werden.
- b)  $k'_{ag} \approx L_m$ , in diesem Fall wird die gemessene Bindungskinetik durch beide limitierende Faktoren beeinflusst und eine Bestimmung der kinetischen Konstanten über ein einfaches 1:1 Modell führt zu Abweichungen, die von wenigen Prozent bis zu mehreren Größenordnungen betragen können.
- c)  $k'_{ag} \gg L_m$ . Hier werden die gemessenen Bindungskurven nur durch den Massentransport an die Oberfläche bestimmt. Damit können sie zwar nicht zur Ermittlung der kinetischen Konstanten, aber zur Bestimmung der Volumenkonzentration an  $B$  herangezogen werden.

Fall c) kann also dadurch erzwungen werden, daß eine möglichst hohe Anzahl an Bindungsstellen an der Oberfläche bereitgestellt wird. Dann gilt (Karlsson *et al.*, 1994):

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_M \cdot c, \quad (20)$$

d. h. die Bindungsrate ist proportional der Konzentration an bindungsfähiger Species  $B$ . Dies wird im sogenannten Bindungshemmtest oder Titrationsassay ausgenutzt (Piehler *et al.*, 1997). Dabei werden Aliquots des zu untersuchenden Rezeptormoleküls  $R$  mit verschiedenen Konzentrationen an Ligand  $L$  vermischt und die Gleichgewichtskonzentration an freiem Rezeptor über die Bindungsrate detektiert.  $R$  entspricht nun den Spezies  $B$  in Gl. (14),  $A$  ist ein immobilisierter Ligand, an den  $R$  bindet, während  $L$  irgendeine Substanz ist, deren Wechselwirkung mit  $R$  untersucht wird. Die Oberfläche dient also als Sonde, mit der das Gleichgewicht zwischen  $R$  und  $L$  quantifiziert wird. Für einheitliche Rezeptormoleküle  $R$  kann an die gemessenen Daten eine Modellfunktion, die aus dem Massenwirkungsgesetz



abgeleitet wurde, angepaßt werden. Man erhält die Gleichgewichtskonstante  $K$ :

$$K = \frac{k_a}{k_d}, \quad (22)$$

und die Konzentration an aktiven Rezeptormolekülen.  $k_a$  und  $k_d$  sind hierbei die Assoziationsraten- und Dissoziationsratenkonstante für die Reaktion zwischen  $R$  und  $L$  in der Lösung.

Für Mischungen aus verschiedenen Rezeptormolekülen, wie sie beispielsweise polyklonale Antikörper darstellen, gibt es für jede Subpopulation eine Affinitätskonstante, die nicht mehr durch das beschriebene Verfahren zugänglich sind. Die Affinität der Gesamtpopulation gegenüber einem bestimmten Analyten kann aber durch eine mittlere Affinitätskonstante beschrieben werden, die der Affinitätskonstanten monoklonaler Antikörper mit dem gleichen Testmittelpunkt (d. h. 50% Inhibierung) entspricht. Sie kann aus dem Testmittelpunkt bestimmt werden, wobei im Falle von Antikörpern berücksichtigt werden muß, daß diese über zwei unabhängige Bindungsstellen verfügen, einfach besetzte Antikörper jedoch noch an die Oberfläche binden können. Es ergibt sich

$$K = \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2} \cdot c_{o,L}(TM) - c_{o,R}}, \quad (23)$$

mit  $c_{o,L}$  als Ligandkonzentration am Testmittelpunkt und  $c_{o,R}$  als Konzentration an Bindungsstellen des Antikörpers, d. h. der zweifachen Antikörperkonzentration. Die Ableitung von Gl. (23). findet sich bei Schobel (1999). Abschließend sollte noch erwähnt werden, daß auch im Falle einer kinetisch kontrollierten Bindung die Anfangsphase der Bindungskurve zur Bestimmung der Konzentration freier Rezeptoren herangezogen werden kann, da sich hierfür (kleines  $T$ ) Gl (15) vereinfacht zu

$$d\Gamma/dt = k_a c \Gamma_{\max} \quad (24)$$

### 2.2.2 Oberflächenmodifikation und Referenzierung

Ein weiterer wichtiger Aspekt der markierungsfreien Detektion von Bindung an einer Oberfläche ist die Tatsache, daß jegliche Veränderung der optischen Eigenschaften der Oberfläche detektiert werden. Daher sind sowohl unspezifische Bindung<sup>2</sup> als auch Veränderungen der optischen Eigenschaften durch Variationen im Bulk und Temperaturänderungen grundsätzliche Probleme dieser Verfahren. Die Lösungsansätze für diese Probleme sind zum einen Oberflächenmodifikationen, die die unspezifischen Wechselwirkungen reduzieren und zum

---

<sup>2</sup> Als unspezifische Bindung wird in diesem Zusammenhang die Wechselwirkung der gelösten Teilchen mit der Oberfläche im Gegensatz zur spezifischen Interaktion zwischen immobilisiertem und gelöster Teilchen, die in der Regel auf affiner Bindung beruht, bezeichnet.

anderen die Referenzierung der gemessenen Signale. Im folgenden werden zunächst die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oberflächenmodifikationen gezeigt und anschließend die in der Literatur beschriebenen Referenzierungsansätze dargestellt.

Erster Schritt einer Oberflächenmodifikation der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche ist eine Silanisierung, bei der auf der Oberfläche vorhandene Silanolgruppen mit Silanen umgesetzt werden. Zur anschließenden Kupplung von aminofunktionalisierten Polymeren ist Glycidyoxypropyltrimethoxysilan GOPTS besonders geeignet, das zunächst über die Methoxygruppen mit den Silanolgruppen der Oberfläche reagiert, siehe Abbildung 2-7. Zur Vereinfachung wird im Schema nur die Bindung einer Si-O-Si gezeigt. In einem weiteren Schritt wird mit einem aminofunktionalisierten Polymer umgesetzt, wobei die Epoxygruppe unter Ringöffnung an das Amin bindet. Die Reaktion mit einem Aminodextran verläuft analog. Die Funktion des Polymers ist zum einen die Abschirmung der Oberfläche zur Reduktion unspezifischer Bindung und zum anderen die Möglichkeit an freie Aminogruppen Liganden kovalent zu binden. Die beiden Polymere Dextran und PEG zeigen dabei unterschiedliche Eigenschaften. Während das Dextran im wässrigem Medium ein Hydrogel bildet und dadurch ein Volumen zur Wechselwirkung zur Verfügung steht, bildet PEG zumindest in der Modellvorstellung eine sogenannte Polymerbürste. Daher können an Oberflächen, die mit Dextran und Liganden modifiziert wurden, mehrere Monolagenäquivalente Rezeptormoleküle binden, während auf PEG-Oberflächen maximal Monolagen möglich sind. Im Rahmen der Arbeiten zum Synthesemonitoring wurden an die mit Diamino-PEG modifizierten Oberflächen (Piehler, 2000) in RIFS-Meßzellen Aminosäuren unter Bildung einer Amidbindung angekuppelt.

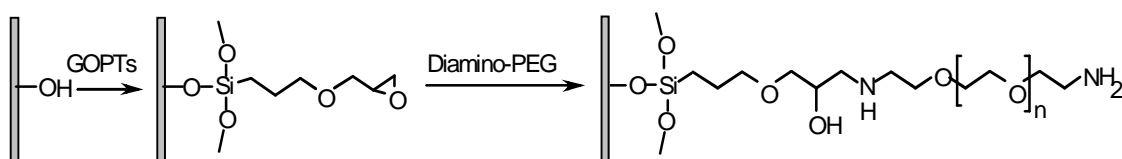


Abbildung 2-7 Oberflächenmodifikation. 1. Schritt Silanisierung mit GOPTS, 2. Schritt: Kupplung eines aminofunktionalisierten Polymers am Beispiel des DAPEG.

Wie oben erwähnt sind nicht nur unspezifische Effekte bei der markierungsfreien Detektion problematisch, sondern auch Temperaturschwankungen und Änderungen im Bulk. Das Ausmaß dieser Effekte auf das Meßsignal hängt dabei stark vom Detektionsverfahren ab. Alle Methoden, die reine Brechungsindexeffekte durch Evaneszentfeld-Verfahren detektieren, werden deutlich stärker beeinflusst, als Methoden, die Änderungen im Reflexionsverhalten bestimmen. Alle bisher kommerzialisierten Verfahren (Oberflächenplasmonenresonanz SPR,

Resonant Mirror, Gitterkoppler) gehören in die erste Kategorie, während RIFS und Ellipsometrie zur zweiten Rubrik gehören. Aus diesem Grund wird bei den meisten kommerziellen Geräten auf 0,1 °C oder besser thermostatisiert und eine parallele Detektion an mindestens zwei Kanälen angeboten. O' Brien *et al.* 1999 zeigten, daß die parallele Detektion in zwei Kanälen auch zur Kompensation von Temperatureffekten in einem nicht-thermostatisierten SPR-Aufbau verwendet werden kann.

Die parallele Detektion in einem Referenzkanal bietet die Möglichkeit, gleichzeitig Bulk-effekte und unspezifische Bindung zu korrigieren (z. B. Karlsson und Fält 1997). Dies setzt allerdings voraus, daß der Referenzmeßpunkt so modifiziert ist, daß die unspezifische Bindung gleich groß ist und an ihm keine spezifische Bindung auftritt. Eine weitere Alternative wurde von Karlsson und Ståhlberg 1995 beschrieben, die an 4 Meßspots unterschiedliche Mengen an Antikörper immobilisierten und damit Oberflächen mit 4 verschiedenen Bindungskapazitäten erhielten. Die unterschiedlichen Gleichgewichtsbelegungen in Wechselwirkung mit dem Protein-Antigen erlaubte damit die Bestimmung der Affinitätskonstante zwischen immobilisiertem Antigen und Antikörper.

In einer kürzlich erschienen Publikation wurde erstmals theoretisch und experimentell der Einfluß der Signalkorrektur von kinetischen Messungen durch einen Referenzkanal untersucht (Ober und Ward 1999a). Die Autoren zeigten, daß insbesondere bei den für kinetische Messungen in der Regel notwendigen kleinen Oberflächenbelegungen (siehe oben) die Kompensation des Bulkeffekts mittels Subtraktion des Referenzkanals den größten Beitrag zur Streuung der ermittelten kinetischen Konstanten liefert. Der zusätzliche Fehler ist deutlich größer, als der durch Basislinienrauschen verursachte Beitrag, wie die Autoren in einer weiteren Studie nachwiesen (Ober und Ward 1999b). Die Autoren verwendeten für Ihre Untersuchungen ein (Protein)-Antigen-Antikörper-System, das mit der nur mit Dextran modifizierten Oberfläche praktisch keine unspezifische Wechselwirkung zeigte. Spielt auch unspezifische Bindung eine Rolle, muß die Referenzoberfläche mit einem möglichst vergleichbaren Liganden modifiziert werden. Jedes unterschiedliche Verhalten der beiden Oberflächen führt dann zu weiteren Fehlerquellen, was in dieser Arbeit (Abschnitt 4.3.5) an einem Beispiel der Konzentrationsbestimmung eines Antibiotikums aus einer Fermenterproduktion exemplarisch gezeigt wird.

Für die reflektometrische Interferenzspektroskopie wurde die Referenzierung der Lichtquelle in einem Aufbau basierend auf einem optischen Multiplexer untersucht (Seemann 1997). Dabei gelang es durch Verwendung eines von maximal 13 Kanälen des Multiplexers als

Referenzkanal Driften aufgrund von Änderungen im Lampenspektrum zu korrigieren, wobei allerdings das Basislinienrauschen hauptsächlich durch Schaltfehler des Multiplexers um 10% zunahm. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Aufbau realisiert, der eine Referenzierung durch eine zweite Diodenzeile, die durch die gleiche Elektronik angesteuert wurde (elektronisches Multiplexing) ermöglicht (Kapitel 4.3).

## 2.3 Festphasensynthesen

### 2.3.1 Prinzip der Festphasensynthesen

Merrifield synthetisierte 1963 erstmals ein Tetrapeptid an einem Polystyrolharz und führte damit die Festphasensynthese ein (Merrifield 1963). Für diese Leistung erhielt er 1984 den Nobelpreis. Das Prinzip der Peptidfestphasensynthese (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) ist in Abbildung 2-8 gezeigt.

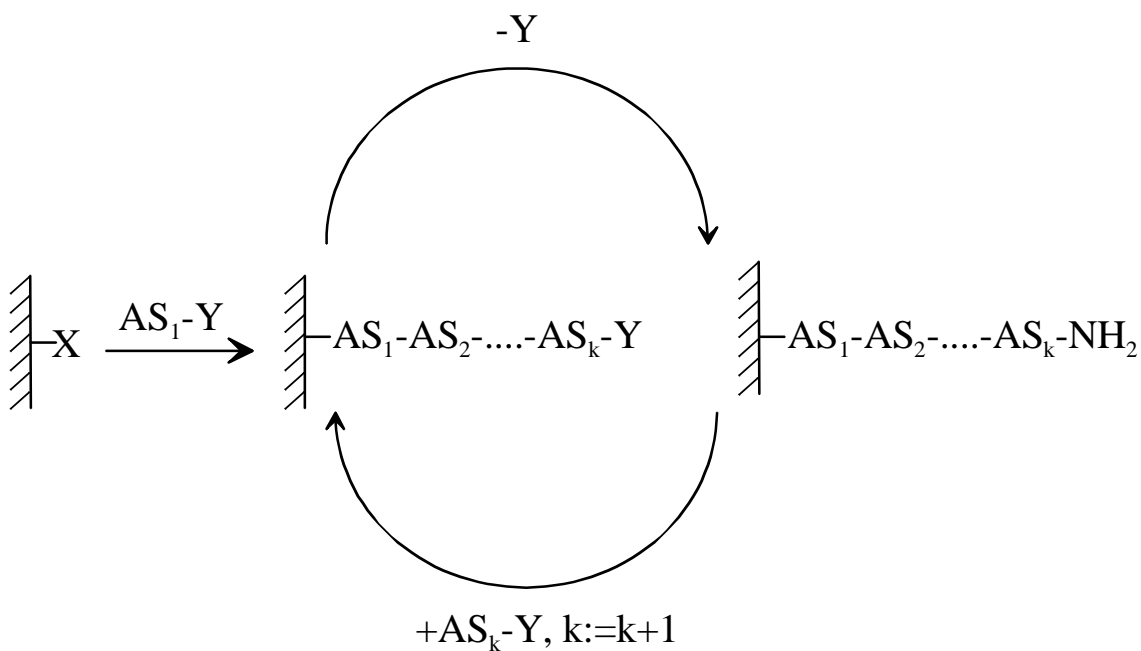


Abbildung 2-8 Prinzip der Peptidfestphasensynthese nach Merrifield.

An einem festen, in der Regel polymeren, Träger wird die erste Aminosäure AS<sub>1</sub> über ihre Carboxygruppe kovalent an eine funktionelle Ankergruppe des Polymers mittels entsprechender Aktivierungsreagenzien angekuppelt. Um einen eindeutigen Reaktionsablauf zu gewährleisten, darf die α-Aminogruppe der Aminosäure nicht an der Reaktion beteiligt werden und wird daher durch eine Schutzgruppe Y blockiert, die im nächsten Schritt

abgespalten wird. Anschließend kann die nächste Aminosäure, wiederum mit geschützter Aminogruppe, unter Bildung einer Amidbindung angekuppelt werden. Der Zyklus aus Schutzgruppenabspaltung und Kupplung der nächsten Aminosäure wird dann bis zur Fertigstellung des Peptids mit den entsprechenden Aminosäuren wiederholt. Zum Schutz vor Nebenreaktionen sind alle trifunktionellen Aminosäuren mit sogenannten Seitenschutzgruppen versehen, wobei das Prinzip der orthogonalen Schutzgruppenstrategie angewandt wird. Dies bedeutet, daß terminale (temporäre) und konstante Seitenschutzgruppen unter unterschiedlichen Bedingungen abgespalten werden, wodurch eine selektive Entfernung der temporären Schutzgruppen am Ende eines Kupplungsschrittes ermöglicht wird. Die Seitenschutzgruppen werden in der Regel am Ende der Synthese entfernt, wobei häufig gleichzeitig das Peptid vom Träger abgespalten wird.

Das Verfahren der Festphasensynthese bietet folgende Vorteile (vgl. Jung, 1996):

- Vereinfachte Reaktionsführung, da zeitaufwendige Reinigungs- und Isolierschritte durch die kovalente Anbindung an den Träger entfallen. Am Ende jedes Schrittes wird statt dessen das Trägermaterial gewaschen und filtriert.
- Durch Einsatz großer Überschüsse an Reagenzien (möglich durch die einfache Abtrennung) werden höhere Umsätze erzielt.
- Möglichkeit der Automatisierung, da immer technisch identische Schritte.

Kritisch bei der Festphasensynthese sind unvollständig ablaufende Reaktionsschritte, da sie zu Fehlsequenzen führen, die aufgrund der geringen Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften insbesondere bei größeren Peptiden kaum vom eigentlichen Produkt abzutrennen sind. Aus diesem Grund werden meist nur Peptide mit bis zu 20 Aminosäuren an der Festphase synthetisiert. Bei größeren Peptide werden zunächst Abschnitte getrennt hergestellt und anschließend verknüpft (Fragment-Kondensation, Benz, 1994).

Festphasensynthesen wurden inzwischen nicht nur für peptische Systeme eingesetzt, sondern auch für Oligonukleotide (Gait 1989) und Oligosaccharide (Danishefsky, 1993 ). Eine neuere Entwicklung ist der Einsatz der Festphasensynthese für nichtoligomere Verbindungen: die sogenannte Organische Chemie an fester Phase (Solid Phase Organic Synthesis, SPOS), die speziell im Bereich der Suche nach Leitstrukturen und Optimierung von Pharmaka Anwendung findet (Früchtel und Jung, 1996; Jung 1996; Jung 1999; Gordon *et al.*, 1994).

Besonders für automatisierte Synthesen sind Verfahren notwendig, die eine Kontrolle der Vollständigkeit von Kupplung und Abspaltung, aber auch der Waschschrte ermöglichen. Die Detektion des Reaktionendes erlaubt nicht nur eine zeitsparende Durchführung der Synthese,

sondern minimiert auch unerwünschte Nebenreaktionen wie Racemisierung und Schutzgruppenverlust. Die einfachste Methode, die Vollständigkeit der Kupplung zu überprüfen, bietet der Kaisertest (Kaiser *et al.* 1970), der freie Aminogruppen durch die Ninhydrinreaktion anzeigt. Allerdings gibt diese Methode nicht den Verlauf der Reaktion wieder, ist schwierig zu automatisieren und erfordert außerdem die Entnahme von Syntheselösung bzw. Syntheseharz. Daher wurden verschiedene Methoden für ein Synthesemonitoring entwickelt, wobei die wichtigsten Verfahren auf UV-Detektion und Leitfähigkeitsmessungen basieren. Häufig wird die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (s. u.) UV-spektroskopisch verfolgt (Cameron *et al.*, 1987), womit allerdings nur die Entschützungsreaktion verfolgt werden kann.

Die ersten Methoden zur Verfolgung der Kupplung beruhten auf Verwendung von zugesetzten Indikatoren für die Konzentration an freien Aminogruppen, wie beispielsweise Pikrinsäure (Hodges und Merrifield, 1975).

Nachteil dieser Methoden sind mögliche Nebenreaktionen durch die Indikatoren. Die Entwicklung von Aktivestern wie HOBt (Atherton *et al.*, 1986) boten neben geringeren Racemisierungspotential auch die Möglichkeit, die Kupplung online zu verfolgen, da HOBt durch freie Aminogruppen deprotoniert wird, und das entstehende Anion bei 440 nm stark absorbiert. Im Verlauf der Reaktion nimmt die Absorption entsprechend der Abnahme an freien Aminogruppen ab, die spektroskopische Verfolgung erlaubt damit ein Monitoring. Die Abnahme der protonierten Aminogruppen sowie deprotonierter HOBt-Moleküle im Verlaufe der Reaktion kann auch konduktometrisch verfolgt werden (Fox *et al.*, 1991). Diese Methode gestattet auch, die Entschützungsreaktion zu verfolgen, da bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe ein Carbaminsäuresalz entsteht, das die Leitfähigkeit erhöht.

Leitfähigkeitsmessungen bei der Kupplung sind auch bei Verwendung anderer Kupplungsreagenzien möglich, indem eine Base zum Reaktionsgemisch zugefügt wird, die mit der bei der Acylierung freigesetzten Säure Ionenpaare ergeben. Weitere, technisch anspruchsvollere Monitoringmethoden sind IR-Spektroskopie (z. B. Pivonka *et al.*, 1996), MAS-NMR (Anderson *et al.*, 1995, Pursch *et al.*, 1997) und MALDI-TOF MS (Egner *et al.*, 1995).

Eine interessante Methode mit einem hohen Parallelisierungspotential wurde erst kürzlich in der Literatur beschrieben (Fischer und Tran, 1999). Die Autoren beschreiben die Verwendung einer NIR-Camera mit 320-240 Pixel und eines akusto-optischen Monochromators zur Detektion von Amino- und Amidbanden bei der Festphasensynthese von Peptiden. Die Technik ist zumindest für die beschriebenen Peptidsynthesen universell einsetzbar, da bei der Kupplung (wie oben beschrieben) immer freie Aminogruppen zu Amidbindungen umgesetzt



werden und bei der Abspaltung der terminalen Schutzgruppe wieder freie Aminogruppen entstehen.

Zur Detektion von Festphasenreaktionen an planaren Glasoberflächen ist allerdings keine dieser Methoden<sup>3</sup> geeignet, da im Unterschied zur Synthese an Polymerharzen, bei der die Produktkonzentrationen typischerweise im millimolaren Bereich liegen, Oberflächenkonzentrationen von pMol/mm<sup>2</sup> nachzuweisen sind. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eine oberflächensensitive optische Detektionsmethode, die erfolgreich zum Nachweis von Bindungsvorgängen aus wäßrigen Lösungen verwendet wurde, zur Detektion bei Festphasensynthesen geeignet ist (siehe Kapitel 4.1).

### 2.3.2 Eingesetzte Kupplungsreagenzien, Schutzgruppen und Reaktionen

Aus der Vielzahl der Kupplungsreagenzien und Schutzgruppen zur Peptidsynthese sollen hier nur die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen eingeführt werden.

In den Arbeiten zum Monitoring der Peptidsynthese an modifizierten SiO<sub>2</sub>-Oberflächen wurde die 1970 von Carpino und Han (1970) eingeführte Fmoc-Strategie eingesetzt (Abbildung 2-9).

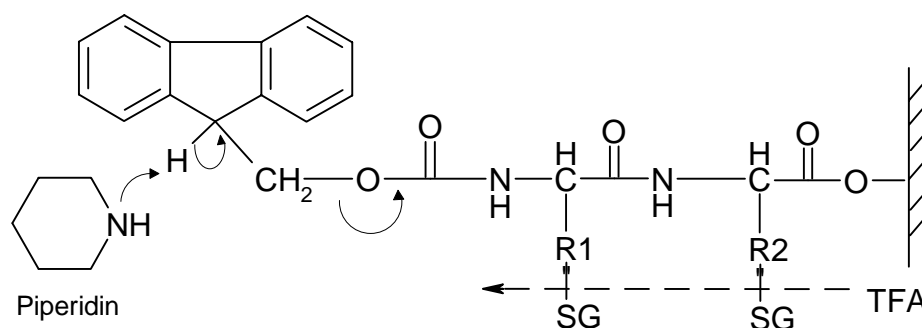


Abbildung 2-9 Fmoc-Strategie, SG = Seitenschutzgruppe, TFA = Trifluoessigsäure.

Hierbei werden Aminosäuren verwendet, die an der  $\alpha$ -Aminogruppe mit der basenlabilen 9-Fluorenylmethyloxycarbonylgruppierung geschützt sind. Die Fmoc-Gruppe wird durch ein sekundäres Amin (Piperidin) abgespalten, unter Freisetzung von Dibenzofulven und einem Carbaminsäureanion, das unter Kohlendioxidabspaltung zerfällt. Die Seitenschutzgruppen sind basenstabil jedoch säurelabil, so daß sie mit Trifluoressigsäure am Ende der Synthese abgespalten werden können. Bei polymerbasierten Festphasensynthesen wird in diesem Schritt

<sup>3</sup> Eventuell wäre MALDI-TOF MS in Verbindung mit einem photolabilen Linker geeignet, allerdings ist die Methode nicht zerstörungsfrei.

in der Regel auch die säurelabile Ankergruppierung (z. B. Benzylester) zum Polymer getrennt, so daß Seitenschutzgruppenabspaltung und Abspaltung vom Träger in einem Schritt erfolgen können.

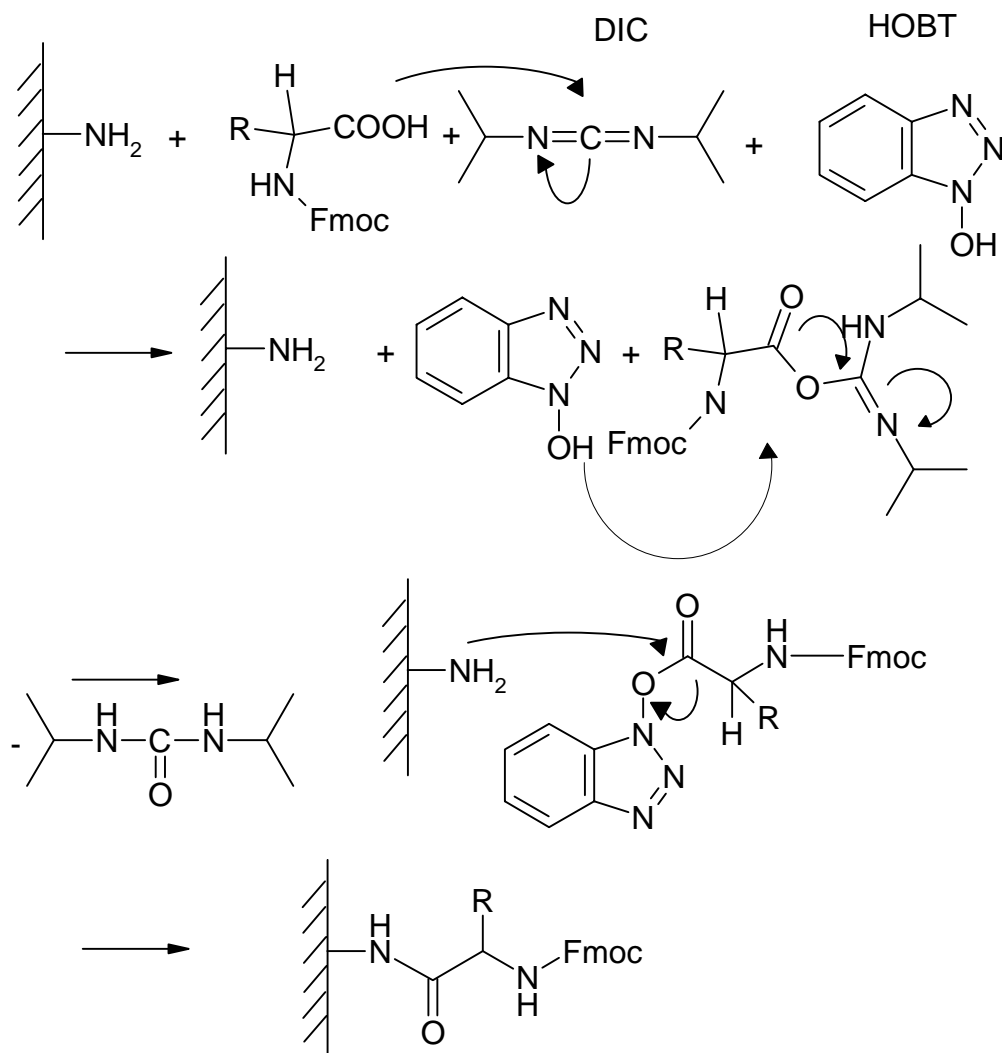


Abbildung 2-10 Reaktionsmechanismus der Kupplung mit HOBT/DIC.

Zur Kupplung wurden die beiden Reagenzien DIC (1,3-Diisopropylcarbodiimid) und TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat, Knorr 1988) verwendet, sowie teilweise zusätzlich HOBT (1-Hydroxybenzotriazol), das die Gefahr der Racemisierung minimiert. In Abbildung 2-10 ist der Mechanismus der Amidbindungsbildung dargestellt. Zunächst bilden Aminosäure und DIC ein O-Acyl-isoharnstoff-Intermediat, das unter Abspaltung von Diisopropylharnstoff mit HOBT zu einem Aktivester reagiert. Durch die Aktivesterbildung wird die Wahrscheinlichkeit der Racemisierung am  $\alpha$ -C-Atom der

Aminosäure verringert. Der Aktivester reagiert dann mit der freien Aminogruppe am Ende der immobilisierten Peptidkette.

## 2.4 Biospezifische Detektion in der Flüssigchromatographie

### 2.4.1 Chromatographie

Chromatographie ist eine Methode zur Trennung von Substanzgemischen, die zur Untersuchung der qualitativen Zusammensetzung von Stoffgemischen, zur Quantifizierung von Komponenten in Stoffgemischen, zur präparativen Gewinnung von Einzelkomponenten aus Gemischen und zur Reinheitsprüfung eingesetzt wird (Böcker, 1997; Schwedt, 1994). Es existiert eine große Anzahl von Varianten; allen gemeinsam ist die Verwendung einer mobilen und einer stationären Phase. Die zu trennenden Komponenten werden in der mobilen Phase gelöst, die über die stationären Phase strömt. Je nach Stärke der Wechselwirkung mit der stationären Phase werden die Komponenten unterschiedlich lange zurückgehalten, wodurch die Substanzen getrennt werden. Die Einteilung in verschiedene chromatographische Verfahren kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen:

- Apparative Aspekte: Säulen-, Hochdruckflüssigkeits-, Dünnschichtchromatographie
- Aggregatzustand der stationären und mobilen Phase: Flüssig-Flüssig-Chromatographie, Gas- Flüssig-Chromatographie
- Art der Wechselwirkungen: Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Gelpermeations-, Affinitätschromatographie

Allerdings liegt nur in den seltensten Fällen ein einziger Trennmechanismus vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eingesetzt, daher sollen im folgenden nur die Grundlagen dieser Methode beschrieben werden.

Bei der HPLC handelt es sich um eine Säulenchromatographie, d. h. die stationäre Phase befindet sich in einer Säule, die mobile Phase wird kontinuierlich durch diese Säule gepumpt. Die getrennten Substanzen verlassen nacheinander die Säule und werden zum Detektor geleitet. Die vom Detektor registrierten Signale nennt man Peaks, Bereiche in denen nur mobile Phase den Detektor durchströmt, werden als Basislinie bezeichnet. Unter gleichen chromatographischen Bedingungen ist die Retentionszeit  $t_r$ , d. h. die Zeit, die zwischen Injektion und Detektion der Substanz verstreicht, für eine Komponente gleich groß. Durch Vergleich mit dem Chromatogramm eines Standards unter gleichen Bedingungen kann dadurch eine qualitative Aussage gemacht werden. Allerdings können durchaus zwei völlig

unterschiedliche Substanzen unter gegebenen Bedingungen die gleichen Retentionszeit besitzen. Um zu einer gesicherten Analyse zu kommen, gibt es zwei Möglichkeiten:

- Chromatographieren von Probe und Standard unter zwei verschiedenen Bedingungen, da es unwahrscheinlich ist, daß zwei Substanzen unter unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen zweimal gleiche Retentionszeiten aufweisen.
- Verwendung geeigneter Detektoren, die weitere Informationen über die jeweilige Substanz liefern können, oder die Verwendung einer Kopplungstechnik (s. u.).

Eine quantitative Aussage läßt sich sowohl aus der Peakfläche als auch aus der Peakhöhe gewinnen, wobei meist die Peakfläche verwendet wird.

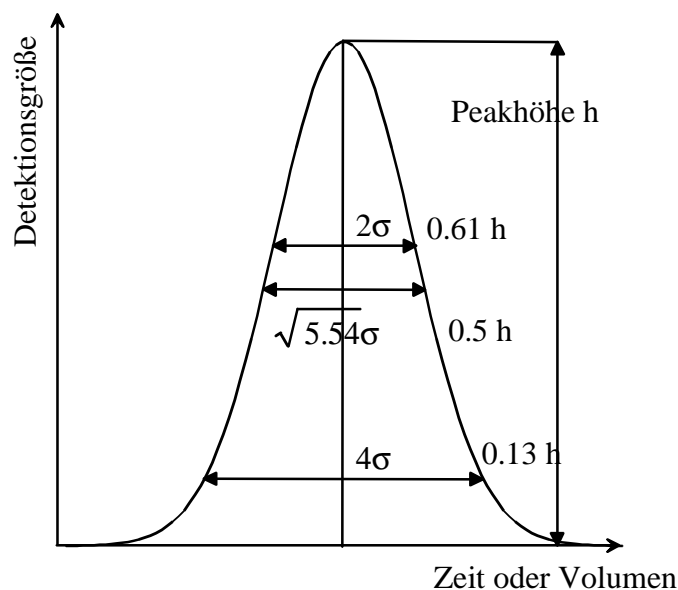


Abbildung 2-11 Gaußprofil eines idealen Chromatographiepeaks.

Wenn keine zusätzlichen Effekte, die ein Tailing oder Heading bewirken, auftreten, besitzen Chromatographiepeaks aufgrund der Verteilungsprozesse, die zur Trennung führen, bei einer ausreichend hohen Anzahl an Trennböden, ein Gaußprofil, vgl. Abbildung 2-11. Zur Charakterisierung der Peakbreite kann zum einen die Standardabweichung  $\sigma$  und zum anderen die Peakbreite auf halber Höhe  $fwhh$  (full width at half height) herangezogen werden, die über

$$fwhh = \omega = \sqrt{5.54}\sigma \quad (25)$$

zusammenhängen. Aus der Peakbreite auf halber Peakhöhe  $\omega$  berechnet sich die substanzabhängige Anzahl der theoretischen Böden nach

$$N = 5.54 \cdot \sqrt{\frac{t_R}{\omega}} \quad (26)$$

Wichtige Parameter von Detektoren sind Selektivität, Empfindlichkeit, Rauschen, Drift, Dynamischer Bereich, Zeitkonstante und Totvolumen.

Die Selektivität ist ein Maß für die Ansprechcharakteristik des Detektors. Manche Detektoren sprechen auf praktisch alle Änderungen in der mobilen Phase an und werden als universelle Detektoren bezeichnet. Selektive Detektoren ergeben hingegen nur bei bestimmten Komponenten ein Signal, wobei der Grad der Selektivität einen sehr weiten Bereich umfassen kann. Empfindlichkeit (Änderung des Signals pro Konzentrationsänderung) und Rauschen bestimmen die Nachweisgrenze. Hierfür existieren verschiedene Definitionen, häufig wird das dreifache Basislinienrauschen ( $3\sigma$ ) herangezogen, um die Nachweisgrenze zu berechnen. Insbesondere bei sehr langen Trennungen kann die Drift des Detektors die Nachweisgrenze erhöhen.

Der dynamische Bereich des Detektors gibt an, über welchen Konzentrationsbereich Änderungen in der Konzentration als Änderung im Signal detektiert werden. Häufig wird auch der lineare Bereich angegeben, in dem sich Änderungen in der Konzentration linear auf das Signal auswirken.

Die Zeitkonstante ist ein Maß dafür, wie rasch der Detektor einen Peak registriert. Sie wird definiert als Zeit, die das System mindestens benötigt, um 63% des Vollausschlags zu erreichen (Böcker 1997). Eine zu kleine Zeitkonstante vergrößert allerdings das Rauschen.

Beim Totvolumen des Detektors muß in der Regel ein Kompromiß zwischen zusätzlicher Bandenverbreiterung und Empfindlichkeit gefunden werden. Die zusätzliche Bandenverbreiterung des Detektors kann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\sigma_T^2 = \sigma_P^2 + \sigma_D^2 \quad (27)$$

wobei  $\sigma_T$  die Standardabweichung des Peaks,  $\sigma_P$  die Standardabweichung des Peaks ohne zusätzliche Verbreiterung durch den Detektor und  $\sigma_D$  die zusätzliche Standardabweichung sind, die durch das Volumen des Detektors hervorgerufen wird.

Der in der HPLC am häufigsten eingesetzte Detektor ist der UV/Vis Detektor, den es sowohl in der Ausführung als „einfachen“ UV/Vis-Detektor (Detektion nur eines Wellenlängenbereiches) als auch als Photodiodenarraydetektor gibt. Weitere wichtige Detektoren sind:

- Differentialrefraktometer, die durch die Detektion des Brechungsindex des Eluats praktisch alle Substanzen erkennen,
- Fluoreszenzdetektoren, die sich durch sehr hohe Empfindlichkeiten und höhere Selektivitäten auszeichnen sowie

- elektrochemische Detektoren, mit denen reduzierbare oder oxidierbare Substanzen nachgewiesen werden können.

Eine weiterer Typ sind sogenannte Reaktionsdetektoren, bei denen die eluierten Substanzen durch eine chemische Reaktion umgewandelt und die Derivate dann selektiver und empfindlicher als die eigentlichen Verbindungen nachgewiesen werden können. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit des Flußsystems ist hierbei ein quantitativer Umsatz der Reaktion nicht notwendig.

Schließlich werden heute häufig Kopplungsmethoden eingesetzt, bei denen das Trennverfahren mit einer spektroskopischen Methode gekoppelt wird. Die wichtigsten Kopplungsmethoden im HPLC Bereich sind HPLC-MS, HPLC-NMR, HPLC-ICP, HPLC-GC.

#### 2.4.2 *Kopplung von Bioassays und Flüssigchromatographie*

Ein weiterer Kopplungsansatz, der in den letzten Jahren entwickelt wurde, ist die Kopplung von Bioassays mit Flüssigkeitschromatographie. Damit wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen weisen Bioassays hohe Selektivitäten und Empfindlichkeiten auf, die eine Verwendung als Detektor attraktiv erscheinen lassen, zum anderen ist die Verwendung von Bioassays zur Detektion in den analytischen Bereichen interessant, in denen Effekte von Substanzen auf Biomoleküle untersucht werden. Beispiele sind das *Screening* nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen oder Pflanzenschutzmitteln. In der Literatur sind einige Ansätze zur Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Immunoassays (z. B. Oosterkamp *et al.*, 1994a; Oosterkamp *et al.*, 1994b, Irth *et al.*, 1993), Rezeptorassays (Oosterkamp *et al.* 1996) und sogenannten Immobilized Enzyme Reactors (IMMER, z. B. Yao und Wasa, 1988; Kita *et al.*, 1990; Ikegawa *et al.*, 1992; Ortega 1994) erschienen. In den Arbeiten, in denen Immuno- und Rezeptorassays mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelt wurden, wurden entweder *fluoreszenzmarkierte* Rezeptoren oder im kompetitiven Testformat *fluoreszenzmarkierte* Liganden eingesetzt. Im Gegensatz hierzu wurden die enzymatischen Reaktionen überwiegend elektrochemisch detektiert. Ikegawa *et al.* wiesen durch 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Reaktor erzeugtes NADH über eine Chemilumineszenzreaktion nach. Eine ausführliche Übersicht über die Kopplung von Bioassays mit Flüssigkeitschromatographie wurde von Emneus and Marko-Varga 1995 veröffentlicht .

Die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit markierungsfreien, transducerbasierten Bioassays wurde in der Literatur nur für die Detektion von Proteinen beschrieben. Tom-Moy *et al.* zeigten den Einsatz eines Oberflächentransversalwellenbauteiles (Surface Transverse

---

Wave, STW) als HPLC Detektor für IgG-Proteine, während Bracewell *et al.* (1998) ein kommerzielles Gerät auf der Basis des Prismenkoppler (*Resonant Mirror*) benutzten, um den Durchbruch von Antikörperfragmenten in einer Affinitätschromatographie zu detektieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine markierungsfreie Methode zur biospezifischen Detektion von kleinen Molekülen mit HPLC gekoppelt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten, in denen als Modellsystem ein hochkreuzreaktiver Pestizid-Antikörper verwendet wurde, werden in Kapitel 4.2 dargestellt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standardchemikalien und -biochemikalien von FLUKA, Neu-Ulm und SIGMA, Deisenhofen, soweit nicht andere Quellen angegeben sind.
- Funktionalisierte Silane von ABCR, Karlsruhe.
- Polyklonale Isoproturon-Antikörper von Dr. Ram Abuknesha, Kings College London.
- Monoklonale anti-HA-Antikörper von Boehringer Mannheim.
- Kommerzielle Isoproturon-Derivate von Riedel de Haën.
- Das HA-Peptid wurde von Dipl.-Chem. Rolf Tünnemann synthetisiert
- [3-(4-Carboxymethylphenyl)]-1,1-dimethylharnstoff und 4-Chlor-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)-capronsäure von Dr. Ram Abuknesha, Kings College London.
- Interferenzschichten (10 nm Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und 330 nm SiO<sub>2</sub> auf 1 mm D263 Substrat, hergestellt durch einen Ion-plating Prozeß) von Schott, Mainz.
- Oxidierte Siliziumwafer von Wacker Chemie, Burghausen.
- Aminodextran AMD synthetisiert nach Piehler 1997.
- Diaminopolyethylenglykol DAPEG M 2000 g/mol Rapp Polymere Tübingen.

##### 3.1.2 Lösungen

###### *Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)*

150 mM NaCl

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

mit 2 M KOH auf pH 7,4 einstellen.

###### *Piranha-Lösung*

60 Vol.-% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%ig)

40 Vol.-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

vorsichtig vermischen und frisch verwenden.

##### 3.1.3 Geräte

- Küvettenpektrometer Spekol 1100 (Analytik Jena), modifiziert nach Schmitt et. al 1997 mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von



MicroParts, Dortmund und 5V/10W Halogenlampe mit integriertem Reflektor (Oshino Lamps, Nürnberg).

- 2 MMS-Diodenarrays, Sonderserie mit Diodenarray von Hamamatsu 128 Pixel a  $50 \times 2500 \mu\text{m}^2$ , Carl-Zeiss Oberkochen
- Ansteuerelektronik MMS/MCS-Emcon 14 für bis zu 4 Spektralsensoren von tec5 Sensorik und Systemtechnik GmbH, Steinbach (Taunus).
- ASIA FIA und Autosampler von Ismatec, Wertheim-Mondfeld.
- Hamilton Dilutor Microlab 541C und Ventilsteuerung MVP mit 1-8-Ventil von Hamilton Deutschland, Darmstadt
- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- Winkelrotor Zentrifuge Biofuge 15 von Heraeus Sepatech, Osterode.
- Spektralellipsometer ES4G, Sopra, Paris.
- Proteinsequenzer Modell 477 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) in Kombination mit dem PTH Analyzer Model 120 A.
- verschiedene Meßzellen aus Plexiglas, Polypropylen, Polyethylen und Teflon, Fertigung nach eigenen Zeichnungen
- Meßzellen aus PCTFE, Sonderanfertigung durch Hewlett-Packard, Waldbronn.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Oberflächenmodifikation

In dieser Arbeit wurden Transducerchips mit folgenden Modifikationen eingesetzt: AMD, DAPEG, Dichlordimethylsilan. Die Schichten wurden gemäß folgender Protokolle hergestellt:

Reinigung und Aktivierung der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche (einheitlich für alle Schichten)

- *Transducerchips ca. 3 min. in 6 N NaOH (oder KOH) im Ultraschallbad behandeln, mit bidestilliertem Wasser abspülen*
- *½ h in Piranha einlegen, im Ultraschallbad behandeln, mit bidestilliertem Wasser abspülen*

Die Transducerchips müssen absolut hydrophil sein. Anschließend werden sie trocknen gelassen und dann rasch weiter umgesetzt.

#### Umsetzung mit $\text{Si}(\text{CH}_3)_2 \text{Cl}_2$ (nach Brecht, 1993)

- *Eine Lösung von 2% Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan auf die Oberfläche tropfen (ca.  $100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) und warten, bis das Lösungsmittel verdunstet ist.*
- *Spülen mit Methanol und bidestilliertem Wasser.*

#### Umsetzung mit GOPTS (= 3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan)

- *auf ein gereinigten Transducerchip 10-15  $\mu\text{l}$  GOPTS geben, mit einem zweiten Transducerchip abdecken (Sandwich-Technik)*
- *in einer leeren, verschlossenen Glaskammer ca. 1 h stehen lassen*
- *kurz mit Aceton (Wassergehalt  $\leq 0,1\%$ ) spülen und sofort unter einem Stickstoffstrom trocknen*
- *zügig weiterverarbeiten (wg. Luftfeuchtigkeit)*

#### Kupplung von Aminodextran AMD

- *auf einem mit GOPTS silanisierendem Transducerchip 20  $\mu\text{l}$  Aminodextranlösung (10 mg AMD in 20  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser gelöst, pH 7-8) geben und wie bei der Silanisierung einen zweiten Transducerchip auflegen*
- *die Transducerchips in einer geschlossenen Glaskammer in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mindestens 12h umsetzen*
- *nach der Umsetzung sehr gründlich mit bidestilliertem Wasser spülen*

#### Kupplung von Diamino-Polyethylenglycol 2000 DAPEG (nach Birkert *et al.*, 2000)

- *auf einem mit GOPTS silanisierendem Transducerchip 30  $\mu\text{l}$  DAPEG in Dichlormethan (4 mg/ml) und bei 70 °C mindestens 36 h reagieren lassen*
- *nach der Umsetzung sehr gründlich mit bidestilliertem Wasser spülen*
- *in Ethanol 3 min im Ultraschallbad behandeln und mit bidestilliertem Wasser spülen*

#### Kupplung von 4-Chloro-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)-capronsäure (ACA) an eine AMD-Oberfläche

- *1 mg der Substanz und 0,5  $\mu\text{l}$  DIC in 5  $\mu\text{l}$  DMF lösen und auf einen AMD beschichteten Transducerchip geben, einen zweiten Transducerchip auflegen*
- *den Sandwich in einer verschlossenen Glaskammer über Nacht reagieren lassen*
- *nach der Umsetzung sehr gründlich mit DMF und bidestilliertem Wasser spülen*

Kupplung von [3-(4-Carboxymethylphenyl)]-1,1-dimethylharnstoff an eine AMD-Oberfläche

- 1 mg der Substanz in 5 µl einer Lösung von 0,5 mg TBTU und 0,5 µl DIEA in DMF auflösen und auf einen AMD beschichteten Transducerchip geben, einen zweiten Transducerchip auflegen
- das Sandwich in einer verschlossenen Glaskammer über Nacht reagieren lassen
- nach der Umsetzung sehr gründlich mit DMF und bidestilliertem Wasser spülen

### 3.2.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

#### Messung

Der Aufbau für RfS-Messungen ist in Abbildung 2-6 gezeigt. Zur Spektrenerfassung und Ansteuerung der FIA bzw. des Dilutors wurde das Programm „MEASURE“ von G. Kraus eingesetzt. Die Integrationszeit wurde jeweils so gewählt, daß 90% der Sättigung des Detektors erreicht wurden. Üblicher Zeitabstand zwischen den Meßpunkten war 5 s. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden je nach Integrationszeit jeweils so viele Spektren aufsummiert, wie in 90% dieses Zeitintervalls möglich war.

#### Auswertung

Die Interferenzspektren  $I_K(\lambda)$  wurden aus den Reflexionsspektren  $I(\lambda)$  durch Korrektur mit dem Dunkelsignal  $I_Z(\lambda)$  und dem Referenzsignal  $I_R(\lambda)$  ermittelt:

$$I_K(\lambda) = \frac{I(\lambda) - I_Z(\lambda)}{I_R(\lambda) - I_Z(\lambda)} \quad (28)$$

Die korrigierten Spektren wurden mit dem Programm „IFZ“ von A. Brecht und G. Kraus ausgewertet. Das Programm führt eine Parabelanpassung an ein ausgewähltes Extremum durch. Bei allen Messungen wurde hierzu das Minimum bei  $m = 1,5$  herangezogen und aus der Lage dieses Extremums durch Multiplikation mit dem Faktor 0,75 die optische Schichtdicke der Interferenzschicht berechnet. Durch einen dynamischen Datenaustausch zwischen „Measure“ und „Ifz“ konnte die Verschiebung des Extremums *on-line* verfolgt werden.

#### Probenhandhabung

Zur Probenhandhabung wurde für die Affinitätsbestimmungen und für die Versuche mit dem Doppelspektrometere Aufbau ein Fließinjektionssystem ASIA von Ismatec eingesetzt. Bei den Messungen zum Monitoring von Festphasensynthesen wurden die Proben mit einem Hamilton Dilutor durch ein 1-8-Ventil aufgesogen und in die Meßzelle injiziert (Abbildung 4-7). In beiden Fällen wurden die Probenhandhabung durch das Programm Measure gesteuert. Für die HPLC-RfS-Kopplung wurde der in Abbildung 4-34 gezeigte Aufbau verwendet. Die Aufgabe

der Probe auf die Säule geschah durch manuelles Schalten eines Injektionsventils, ebenso der Wechsel von Eluat-Antikörperlösung bzw. Regenerationslösungen vor der RfS-Meßzelle.

### 3.2.3 *Affinitätstitration*

Antikörper, die zum immunanalytischen Nachweis verwendet wurden, wurden durch Affinitätstitrationen charakterisiert. Das Verfahren ist ausführlich bei Piehler *et al.* (1997) beschrieben. Es wurden Aliquots einer Antikörperlösung mit aufsteigenden Konzentrationen an Analyt inkubiert und die jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen an Antikörper bestimmt. Dazu wurden RfS-Transducerchips mit einer hohen Dichte an Bindungsstellen verwendet, da damit praktisch ausschließlich diffusionslimitierte Bindung detektiert wird (Vgl. Kapitel 2.2). Damit sind die Steigung der Bindungskurven direkt proportional der Konzentration an freiem Antikörper. Die halblogarithmische Auftragung der relativen Antikörperkonzentrationen gegen die Analytkonzentration ergibt Diagramme, die analog zu Titrationsverläufen von Säure/Basetitrationen sind. Falls es sich um monoklonale Antikörper handelt, kann durch Anpassung geeigneter Modellfunktionen, die Affinitätskonstante bestimmt werden. Bei polyklonalen Antikörpern kann der Testmittelpunkt bei einer bestimmten Antikörperkonzentration als Maß für die mittlere Affinität herangezogen werden.

#### *Messung*

Zur Herstellung der Proben wurden 900 µl der entsprechenden Lösung des Liganden zu 100 µl der zehnfach konzentrierten Lösung des Antikörpers gegeben und nach intensiven Vermischen für mindestens 10 min vorinkubiert. Nach einer Messung der Basislinien mit einer Pumprate von etwa 30 µl/min über einen Zeitraum von 2 min wurde die Probe mit erhöhter Pumprate (60-100 µl/min) injiziert und über einen Zeitraum von 200-400 s inkubiert. Dann wurde gespült und je nach Antikörper-Rezeptor-System entweder mit Salzsäure oder Pepsinlösung, gefolgt von einem kurzen Puls Acetonitril/Wasser/Propionsäure 49:49:2, v:v:v regeneriert.

#### *Auswertung*

Die Steigung der Massentransport-kontrollierten Bindungskurve wurde durch lineare Regression über den Bereich der Bindungskurve bestimmt, in dem die Bindungskurve lineares Verhalten zeigte (konstante Probenkonzentration in der Flußzelle). Die ermittelte Steigung wurde auf die maximale Steigung ohne Analyt normiert, um eventuelle Änderungen der Eigenschaften der Transduceroberfläche zu eliminieren.

Für die polyklonalen Antikörper wurde an die relativen Konzentrationen an freien Antikörpern folgende logistische Funktion mit einem Marquart-Levenberg-Algorithmus (Software

Origin 5.0 von Microcal, Northampton, USA) angepaßt, um den Testmittelpunkt  $x_2$ , den Exponenten  $p$  und den Offset  $A_2$  zu ermitteln:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (29)$$

Dabei wurde der Wert von  $A_1$  auf 100% gesetzt, während der Offset  $A_2$ , der Testmittelpunkt  $x_0$  und der Exponent  $p$  variiert wurden. Bei halblogarithmischer Auftragung ist die Steigung im Testmittelpunkt gegeben durch

$$\frac{A_2 - A_1}{4} p \quad (30)$$

und damit proportional zum Exponenten  $p$ , der somit ein Maß für die Breite des dynamischen Bereiches darstellt.

#### **3.2.4 Bestimmung der Konzentration an aktivem Antikörper**

Die polyklonalen anti-Isoproturon Antikörper wurden von Dr. Abuknesha hergestellt, affinitätsgereinigt und als Ammoniumpräzipitat zur Verfügung gestellt. Nach Auflösung in PBS wurde zunächst die Konzentration an Gesamt-IgG durch Aufnahme eines UV-Spektrums und Auswertung der Extinktion bei 278 nm bestimmt. Der Anteil an spezifischen Antikörpern wurde durch folgendes Verfahren ermittelt: Zunächst wurde eine Affinitätstitration mit einem monoklonalen anti-Atrazin-Antikörper durchgeführt. Durch die Anpassung einer Modellfunktion für monoklonale Antikörper konnte die Konzentration an aktivem Antikörper quantifiziert, und damit aus den Steigungen der Bindungskurven die Empfindlichkeit, d. h. Steigung pro Antikörperkonzentration, unter den Bedingungen des Titrationsassays (Flußraten, Meßzelle) bestimmt werden. Anschließend wurde in die gleiche Meßzelle ein Transducer mit immobilisiertem Isoproturonderivat eingebaut und mit dem gleichen Meßprogramm Proben der anti-Isoproturon-Antikörper gemessen. Aus den Steigungen der Bindungskurven konnte dann mit der vorab bestimmten Empfindlichkeit die aktive Konzentration bestimmt werden.

#### **3.2.5 Ellipsometrie**

Die spektrale Ellipsometrie wurde zur Charakterisierung der verwendeten RIFs-Transducer und als Referenzmethode für die Festphasensynthese auf SiO<sub>2</sub> Wafern eingesetzt. Näheres zur

Anwendung der Methode auf dünne organische und biochemische Schichten findet sich bei Striebel (1995) und Hehl (1998).

Die ellipsometrischen Messungen wurden unter einem Einfallswinkel von  $70^\circ$  durchgeführt. Licht einer Xenon-Hochdrucklampe durchläuft einen rotierenden Polarisator. Der linear polarisierte Lichtstrahl fällt auf die Probe und wird reflektiert. Er durchläuft den Analysator und einen Doppelmonochromator und wird schließlich durch den Photomultiplier detektiert. Aus der Signalmodulation und Stellung des Analysators lassen sich die ellipsometrischen Winkel  $\cos \Delta$  und  $\tan \Psi$  bestimmen.

#### Aufbau

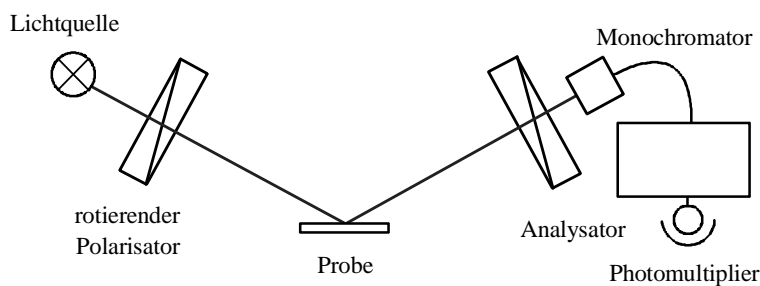


Abbildung 3-1 Schematischer Aufbau für die ellipsometrischen Messungen.

#### 3.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Peptiden erfolgte mittels Edman-Abbau mit einem „pulsed liquid phase“ Proteinsequencer. Dabei werden die einzelnen Aminosäuren eines Peptids schrittweise mit Phenylisothiocyanat und Trifluoressigsäure umgesetzt. Die entstehenden Phenylhydantoinaminosäuren wurden mit HPLC getrennt und über Standards identifiziert und quantifiziert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Beobachtung von Festphasensynthesen mit RIfS<sup>4</sup>

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, wird im folgenden zunächst untersucht, ob Reaktionen in organischen Lösungsmitteln mit einer Glastypeoberfläche überhaupt mit RIfS untersucht werden können. Dazu werden zum einen RIfS-Spektren mit experimentell bestimmten Dispersionsverläufen der RIfS-Transducerchips simuliert und zum anderen mit typischen Lösungsmitteln Spektren aufgenommen und Signal-Rausch-Verhältnisse bestimmt. Anschließend werden zunächst Ergebnisse, die für Reaktionen im Lösungsmittel 1,2-Dimethoxyethan abliefen, vorgestellt. Die meisten peptidischen Festphasensynthesen werden in Dimethylformamid durchgeführt, daher wurden auch in diesem Lösungsmittel beispielhaft Kupplungen durchgeführt, ehe ein Modelligand aus neun Aminosäuren auf der Oberfläche synthetisiert wurde, dessen Wechselwirkung mit einem Antikörper als Modell-Rezeptormolekül anschließend untersucht wurde. Im anschließenden Abschnitt werden Referenzmessungen beschrieben und schließlich als Modell für eine nicht-peptidische Synthese der Aufbau von Triazinderivaten und ihre Wechselwirkung mit monoklonalen Antikörper untersucht.

#### 4.1.1 RIfS-Messungen in organischen Lösungsmitteln

Bisher wurde die reflektometrische Interferenzspektroskopie nur für Messungen unter einer wäßrigen bzw. gasförmigen Phase eingesetzt. Da die weitaus meisten Festphasensynthesen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden, wurde zunächst der Einfluß dieser Lösungsmittel auf das Signal-Rausch-Verhältnis der RIfS-Signale untersucht und durch Berechnungen der zu erwartenden Empfindlichkeiten die prinzipiellen Möglichkeiten der Beobachtung von Syntheseschritten an Festphasen abgeschätzt.

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, trägt das gesamte Schichtsystem zum RIfS-Signal bei. Für Messungen in organischen Lösungsmitteln, die einen höheren Brechungsindex als wäßrige Lösungen aufweisen, ist daher ein deutlicher Einfluß der optischen Eigenschaften des Lösungsmittels auf die Signalqualität zu erwarten.

Zunächst wurden optische Parameter und Schichtdicken für die verwendeten RIfS-Transducer durch ellipsometrische Messungen an RIfS-Transducern nach dem bei Piehler 1997 ange-

---

<sup>4</sup> Die Untersuchungen, die im Kapitel 4.1 vorgestellt werden, wurden in Kooperation mit Herrn Dipl.-Chem. Rolf Tünnemann, Arbeitskreis Prof. Dr. Günther Jung durchgeführt.

gebenen Verfahren (Unterdrückung des Rückseitenreflexes durch Sandstrahlen und Schwärzen) bestimmt. In Abbildung 4-1 sind die Dispersionsverläufe für Substrat, reflexionsverstärkende Schicht und Interferenzschicht, die durch Anpassung an die ellipsometrischen Winkel bestimmt wurden, gezeigt.

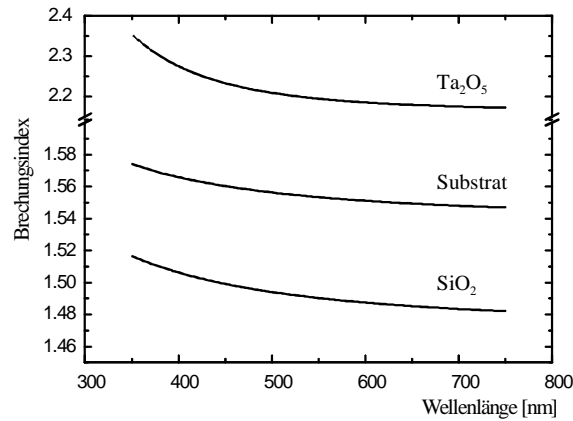


Abbildung 4-1 Dispersionsverläufe der einzelnen Schichten für die verwendeten RIFs-Transducer.

Mit diesen Dispersionsverläufen wurden nach Gl. (7) und Gl. (8) (Kapitel 2.1) Interferenzspektren berechnet, wobei der Brechungsindex des Bulks variiert wurde. Um die Rechnungen allgemein zu halten, wurden sie für dispersionsfreie Lösungen durchgeführt. Zur Charakterisierung der Spektren ist in Abbildung 4-2 das relative Nutzsignal gegen den Brechungsindex des Bulk aufgetragen.

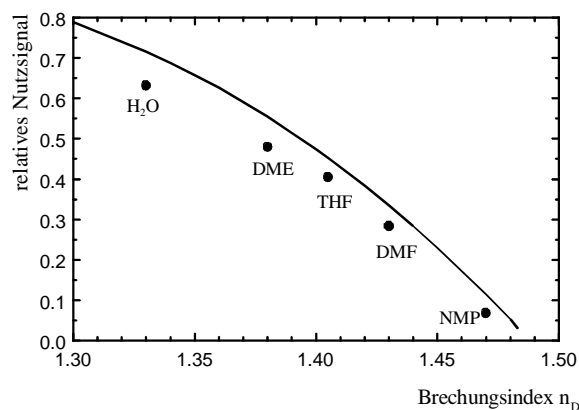


Abbildung 4-2 Relatives Nutzsignal gegen Brechungsindex des Bulks. — berechnete Werte, • experimentell bestimmte Werte.

Das relative Nutzsignal nimmt um so stärker ab, je mehr sich der Brechungsindex des Bulks dem der Interferenzschicht nähert. Zusätzlich sind in Abbildung 4-2 experimentell bestimmte



relative NutzsSignale für fünf typische Lösungsmittel eingezeichnet. Man erkennt, daß die gerechnete Kurve den gefunden Verlauf wiedergibt, wobei die experimentellen Werte unter den berechneten liegen. Dies liegt daran, daß Offsets und die Dispersion der Lösungsmittel in den simulierten Spektren nicht berücksichtigt wurden. Die größten Beiträge zum Offset liefern der Rückwandreflex der Meßzelle und das Übersprechen des Y-Kopplers, d. h. Licht, das direkt von der Lichtquelle zum Spektrometer geführt wird. Schließlich wird, bedingt durch die relativ hohe numerische Apertur der Polymerfaser von 0,46, auch nicht senkrecht reflektiertes Licht zum Spektrometer geführt, ein Anteil, der in den Rechnungen nicht berücksichtigt wird. Das relative NutzsSignal wirkt sich direkt auf das Signal-Rausch-Verhältnis aus. Bei Messungen von Prozessen an der Oberfläche des RIFS-Transducers interessiert nicht das S/N-Verhältnis des primären Signals (der Spektren), sondern das Rauschen der scheinbaren optischen Schichtdicke. In Abbildung 4-3 sind rms-Werte für dieses Rauschen sowie das relative NutzsSignal in Abhängigkeit vom Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels angegeben. Das Schichtdickenrauschen wurde über 60 Meßpunkte bestimmt. Dabei wurde zunächst die Integrationszeit so gewählt, daß die Intensität im Maximum des Spektrum 90% des dynamischen Bereiches des Spektrometers (14 bit) erreichte, und dann so viele Spektren aufsummiert, daß eine Meßfrequenz von 0,2 Hz resultierte.

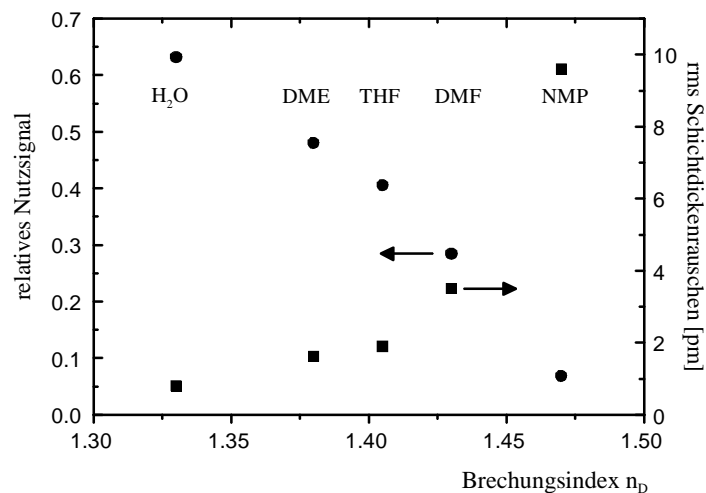


Abbildung 4-3 Relatives NutzsSignal und Schichtdickenrauschen gegen Brechungsindex des Bulks.

Man erkennt, daß mit abnehmendem NutzsSignalanteil das Rauschen deutlich erhöht wird. Neben diesen hochfrequenten Rauschanteilen sind für Messungen auch besonders mittelfristige Schwankungen und sehr niedrigfrequente Schwankungen (Drift) des Signals relevant. Diese limitierten die tatsächlich mögliche Auflösung stärker als das reine Rauschen.

Auch für diese Signalschwankungen wurden mit abnehmendem Nutzsignalanteil zunehmende Werte gefunden. Für die beiden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Lösungsmittel wurden bei mit Diamino-PEG beschichteten Transduceroberflächen (die für die Festphasensynthesen verwendet wurden, s. u.) Driften von bis zu 20 pm/h bzw. 30 pm/h für DME bzw. DMF ermittelt. Diese liegen damit um bis zu 2 Größenordnungen über den Werten, die für Messungen unter wäßrigen Lösungen mit RIfS auftreten. Diese Werte gelten für ruhende Lösungen, Effekte bei der Injektion in die Meßzelle werden im Kapitel 4.1.2 beschrieben.

Um die prinzipiellen Möglichkeiten eines Monitorings von Festphasensynthesen unter DMF abzuschätzen, müssen die gefundenen Schwankungen des RIfS-Signals mit den Signalen, die sich bei der Festphasensynthese an der Transduceroberfläche ergeben, verglichen werden. Daher wurde zunächst die theoretische Empfindlichkeit für die Kupplung Fmoc-geschützter Aminosäuren an die Transduceroberfläche berechnet. Hierzu wurden mit den in Kapitel 2.1 für Mehrschichtsysteme angegebenen Formeln Interferenzspektren simuliert. Optische Parameter für die Schicht aus an die Oberfläche gekuppelten Aminosäuren können aufgrund der hohen Korrelation zwischen Schichtdicke und Brechungsindex bei den sehr dünnen Peptidschichten nicht bestimmt werden. Daher wurde mit einer von De Feijter (De Feijter 1978) für die Adsorption von Proteinen an eine Oberfläche angegebenen Formel gearbeitet. Danach ergibt sich die Oberflächenbeladung  $\Gamma$  aus der physikalischen Schichtdicke multipliziert mit der Differenz der Brechungsindizes des adsorbierten Films  $n_{Schicht}$  und des Bulks  $n_{Bulk}$ , dividiert durch das Brechungsindexinkrement  $dn/dc$ :

$$\Gamma = \frac{n_{Schicht} - n_{Bulk}}{dn/dc} \cdot d, \quad (31)$$

wobei vorausgesetzt wird, daß das Brechungsindexinkrement konstant bleibt. Zunächst wurden die Brechungsindexinkremente bei 25°C für die beiden jeweils Fmoc-geschützten Aminosäuren Glycin (ohne Seitengruppe) und Arginin (mit der 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) -Seitenschutzgruppe) in DMF refraktometrisch bestimmt (Abbildung 4-4).

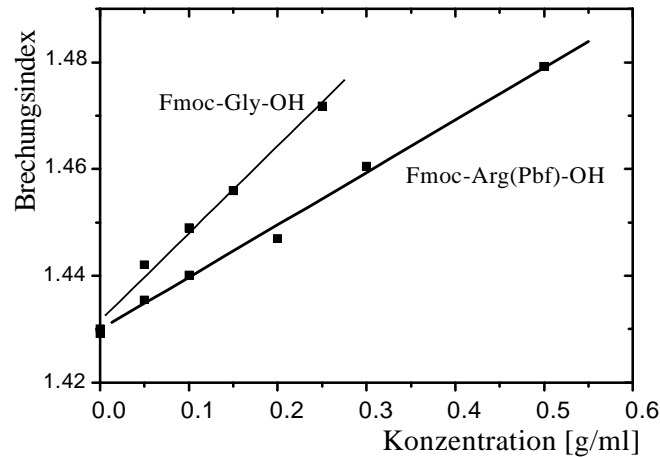


Abbildung 4-4 Bestimmung der Brechungsindexinkremente für Fmoc-Gly-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH in DMF.

Damit wurden die in Tabelle 4-1 angegebenen Brechungsindexinkremente erhalten. Zur Kontrolle wurde der Wert für Ovalbumin in Wasser bestimmt, der mit 0,191 ml/g in guter Übereinstimmung mit dem von De Feijter (De Feijter 1978) angegebenen Wert von 0,188 ml/g (gemessen bei 21°C) ist.

Tabelle 4-1 Brechungsindexinkremente und theoretische Empfindlichkeiten für Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH in DMF und Ovalbumin (Piehler, 1997) in Wasser.

	Brechungsindexinkrement [ml/g]	berechnete Empfindlichkeit [nm/(ng/mm <sup>2</sup> )]
Fmoc-Gly-OH	0,16	4,6
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0,098	3,5
Ovalbumin	0,191	1,7

Mit den experimentell bestimmten Brechungsindexinkrementen wurde nach Gl. (31) die physikalische Schichtdicke für eine bestimmte Oberflächenbeladung mit Fmoc-Aminosäure berechnet, wobei die optischen Parameter der Aminosäureschicht mit den Werten für 25%ige Lösungen der Fmoc-Aminosäure abgeschätzt wurden.

Damit konnten dann nach Gl. (7) und Gl. (8) Interferenzspektren für die Kupplung von Fmoc-Aminosäuren simuliert, und durch Extremwertanpassung in das Minimum 1,5 bei ca. 560 nm die scheinbare optischen Schichtdicke bestimmt werden. Für die beiden Aminosäuren ergeben sich die in Abbildung 4-5 gezeigten Verläufe der optischen Schichtdicke mit zunehmender Beladung der Transduceroberfläche. Die aus diesen optischen Schichtdicken durch lineare

Regression berechneten Werte für die theoretische Empfindlichkeit sind in der dritten Spalte von Tabelle 4-1 angegeben. Für Ovalbumin ist der von Piehler (1997) errechnete Wert von  $1,7 \text{ nm}/(\text{ng}/\text{mm}^2)$  angegeben, der mit radioaktiv markierten Antikörpern empirisch bestimmte Wert liegt bei  $1 \text{ nm}/(\text{ng}/\text{mm}^2)$  (Brecht 2000). Für die beiden Aminosäuren gilt damit, daß entsprechend des höheren Anteils der Fmoc-Gruppe im Fmoc-Glycin ist hier die Empfindlichkeit pro Masseneinheit höher, als beim Arginin.

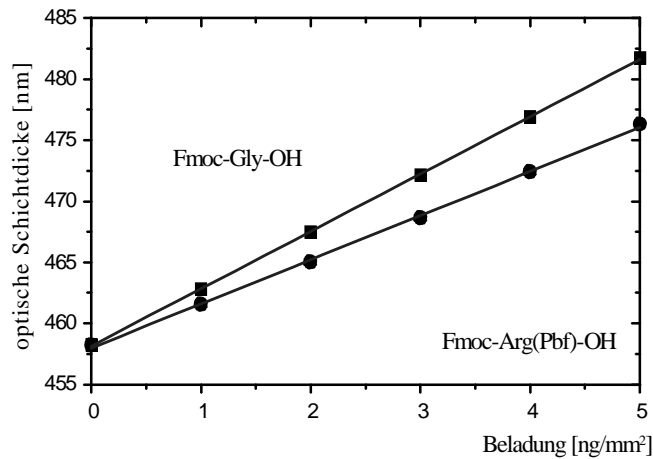


Abbildung 4-5 Bestimmung der theoretischen Empfindlichkeiten für die Kupplung von Fmoc-Gly-OH bzw. Fmoc-Arg(Pbf)-OH an die SiO<sub>2</sub>-Schicht unter DMF.

Mit diesen theoretischen Empfindlichkeiten lassen sich die bei Kupplung einer Monolage Aminosäure an die Oberfläche zu erwartenden Änderungen der optischen Schichtdicke abschätzen. Geht man von  $10^{12}$  reaktiven Gruppen pro  $\text{mm}^2$  ( $1,67 \text{ pMol}/\text{mm}^2$ ) für eine SiO<sub>2</sub>-Oberfläche aus (Piehler 1997, Lang 1997), so würde eine Monolage Fmoc-Glycin bzw. Fmoc-Arginin(Pbf) zu einer Änderung der optischen Schichtdicke von 2,3 nm bzw. 3,8 nm führen. Diese optischen Schichtdickenzunahmen sind als obere Grenzwerte für Monolagen anzusehen. Die tatsächlichen Werte dürften niedriger sein, da, zum einen nicht mit einer vollständigen Umsetzung aller Gruppen zu rechnen ist, und wie für den Fall von Proteinbindung beschrieben, die theoretisch errechneten Empfindlichkeiten eventuell größer sind als die empirischen. Trotzdem ist mit diesen Ergebnissen unter Vergleich mit den Werten für das Schichtdickenrauschen zu erwarten, daß die Kupplung von Fmoc-geschützten Aminosäuren mit RfS zu beobachten sein sollte.

Da für die Bindung von Proteinen aus wäßriger Phase an die Transduceroberfläche sowohl die theoretische wie auch die empirische Empfindlichkeit bekannt sind, wurde die Adsorption von Ovalbumin aus Phosphatpuffer an eine durch Silanisierung hydrophob eingestellte SiO<sub>2</sub>-Ober-

fläche beobachtet und resultierende Schichtdickeneffekte unter Puffer bzw. unter DMF gemessen. Die Bindungskurve zu diesem Experiment ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Durch die Meßzelle fließt abwechselnd für je 200 Sekunden PBS-Puffer bzw. DMF. Aufgrund des unterschiedlichen Dispersionsverhaltens der beiden Lösungsmittel ändert sich die scheinbare optische Schichtdicke von 684,2 nm unter PBS auf 685,8 nm unter DMF. Nach dreimaligem Wechsel wird unter PBS eine Lösung von 1 mg/ml Ovalbumin injiziert. Bei der Bindung des Proteins an die Oberfläche nimmt die optische Schichtdicke um ca. 1,8 nm zu, entsprechend einer Oberflächenbelegung von  $1,8 \text{ ng/mm}^2$ . Beim Wechsel auf DMF ist die gemessene optische Schichtdicke um 2,6 nm größer, als vor der Proteinadsorption. Beim nächsten Wechsel auf wäßrige Bedingungen ist die scheinbare optische Schichtdicke allerdings wieder etwas niedriger, ein Effekt, der mit dem teilweise Ablösen der Proteinschicht bei der DMF-Injektion erklärt werden kann. Man erkennt, daß dieses Ablösen ein einmaliger Vorgang ist, da bei den nächsten beiden Wechseln des Lösungsmittels wieder konstante optische Schichtdicken von 685,5 nm bzw. 688,4 nm beobachtet werden.

Um den Unterschied im Schichtdickeneffekt unter beiden Lösungsmitteln zu quantifizieren, werden daher diese Werte mit den optischen Schichtdicken vor der Adsorption verglichen. Man erhält Zunahmen der optischen Schichtdicke von 1,3 nm (PBS) bzw. 2,6 nm (DMF), d.h. die Empfindlichkeit des RfS-Signal ist unter DMF doppelt so hoch wie unter Puffer.

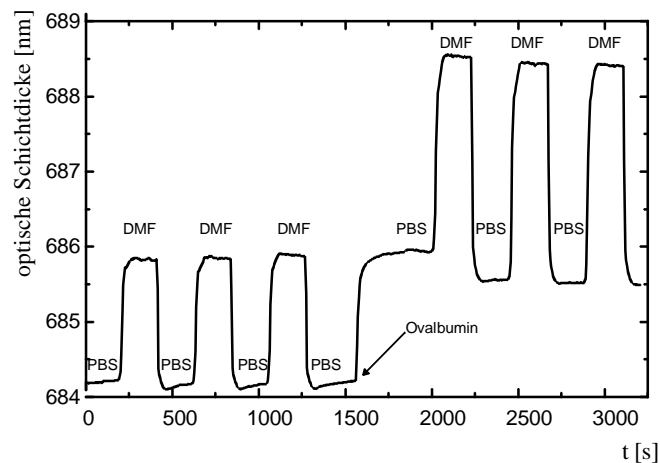


Abbildung 4-6 Vergleich der Schichtdickeneffekte unter Puffer bzw. unter DMF bei Adsorption von Ovalbumin.

### *Schlußfolgerungen*

- ⇒ *Die höheren Brechungsindizes der organischen Lösungsmittel führen zu einer Abnahme der relativen Nutzsignale und dementsprechend zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses wie auch der Driften.*
- ⇒ *Durch Bestimmung der Brechungsindexinkremente von Fmoc-geschützten Aminosäuren konnten theoretische Empfindlichkeiten und zu erwartende Signale abgeschätzt werden.*
- ⇒ *Der Vergleich der Limitierungen des RfS-Signals läßt erwarten, daß auch unter den Lösungsmitteln DME und DMF die Detektion der Kupplung von Fmoc-geschützten Aminosäuren an die Oberfläche detektierbar sein sollten.*
- ⇒ *Durch diese höheren Empfindlichkeiten werden die erhöhten Unsicherheiten im Meßsignal zum Teil kompensiert .*
- ⇒ *Der Vergleich von Schichtdickenzunahmen bei Adsorption von Proteinen unter Wasser bzw. DMF zeigt, daß die empirischen Empfindlichkeiten wie die theoretisch errechneten unter DMF höher sind.*

#### **4.1.2 Zusätzliche Effekte auf das Schichtdickensignal bei Injektion**

Bei der Durchführung von Synthesen in einer RfS-Meßzelle wurden jedoch noch weitere Instabilitäten im Schichtdickensignal beim Austausch des Superstrates durch Injektion gefunden. Diese werden im folgenden gezeigt, und die sich ergebenden Unsicherheiten für eine Quantifizierung von Schichtdickensignalen abgeschätzt. Da die Festphasensynthesen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt und teilweise relativ lange Reaktionszeiten eingehalten wurden, mußte der üblichen RfS-Aufbau modifiziert werden. Anstelle eines Fließinjektionssystems (FIA) mit Peristaltikpumpen und Scherventil wurde der in Abbildung 4-7 dargestellte Aufbau verwendet. Über ein 1-8-Ventil konnten verschiedene Lösungen mittels einer Spritzenpumpe aufgezogen und in die Meßzelle überführt werden. Die Spritze war außerdem zum Spülen der Meßzelle mit einem Lösungsmittelvorrat verbunden.

Im Unterschied zum üblichen Aufbau wurden also Lösungen bzw. Lösungsmittel in die Meßzelle injiziert, danach ruhten diese. Bei diesen Injektionen kommt es zu Druckschwankungen, die sich aufgrund der hohen Auflösung des RfS-Signals (gemessen werden Effekte im Picometerbereich) bemerkbar machen.

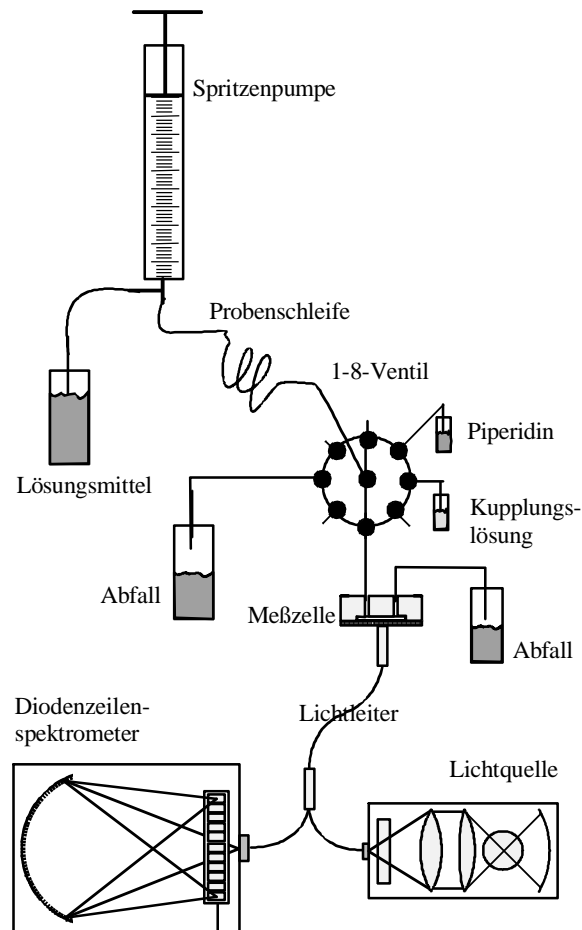


Abbildung 4-7 Aufbau für die Verfolgung von Festphasensynthesen.

Zusätzliche Effekte können durch das Quellen der Dichtung bei Kontakt mit unterschiedlichen Lösungen hinzukommen. In Abbildung 4-8 sind beispielhaft drei Meßkurven für mit Diamino-PEG modifizierte Transducerchips unter DMF gezeigt, bei denen in regelmäßigen Abständen zweimal  $100\ \mu\text{l}$  Lösungsmittel in die Meßzelle injiziert wurde. Man erkennt, daß die Injektion zu relativ starken Signalsprüngen führt, die in einem Fall positiv, in den anderen Fällen negativ sind. In der anschließenden Ruhephase kommt es zu einem relativ raschen Äquilibrieren des Signals. Das Ausmaß der Sprünge und die Zeit bis zur anschließenden Einstellung eines Gleichgewichtszustandes variiert relativ stark. Neben dem Anpreßdruck des Transducers an die Dichtung scheint auch die Oberflächenbeschichtung eine wichtige Rolle zu spielen. Für alle Auswertungen von Schichtdickenänderungen wurde daher die optische Schichtdicke nach definierten Zeitpunkten nach der Injektion von reinem Lösungsmittel aus dem Lösungsmittelvorrat und dem Äquilibrieren herangezogen.

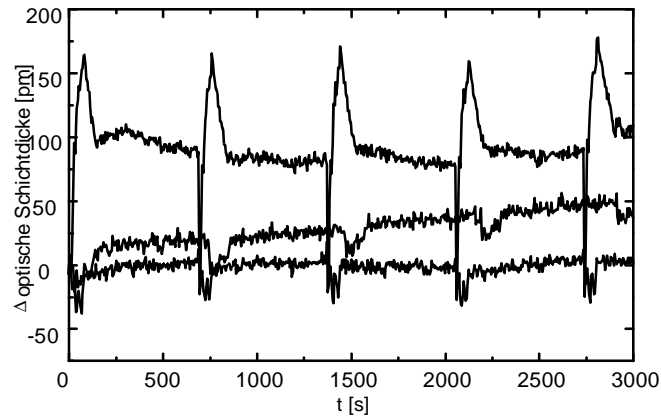


Abbildung 4-8 Verhalten von DAPEG-Schichten beim Spülen mit Lösungsmittel.

Um die Auswirkungen von Signalschwankungen aufgrund der Injektion auf die Beobachtung von Festphasensynthesen abzuschätzen, wurden Blankmessungen durchgeführt, bei denen im Meßaufbau anstelle von Kupplungslösungen Lösungsmittel aufgezogen und in die Meßzelle injiziert wurde. Nach einer halben Stunde wurde mit Lösungsmittel aus dem Lösungsmittelvorrat gespült.

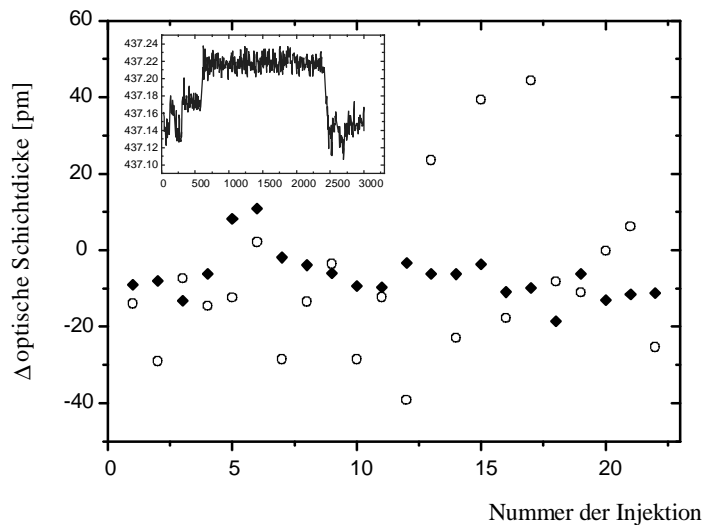


Abbildung 4-9 Vergleich der Schichtdickeneffekte unter DME bzw. DMF bei Injektion von reinem Lösungsmittel aus einer Probenposition und Spülen nach 30 min. ○: DMF; ◆: DME. Nr. 1-11 und 12-22 jeweils eine Meßreihe mit neuem Transducerchip. Inset: Beispielmesskurve.

In Abbildung 4-9 sind die Schichtdickeneffekte, die sich aus der Differenz der Meßkurven direkt vor der Injektion des Blanks und am Ende der Messung (nach Äquilibrieren des Signals) ergeben, für je zwei Versuchsreihen mit Dimethoxyethan (DME) und Dimethylformamid (DMF) aufgetragen (siehe als Beispiel das Inset in Abbildung 4-9).



Aus diesen Versuchsreihen wird deutlich, daß die Signalsprünge unter DMF größer sind, als unter DME und die sich ergebenden Unsicherheiten im Signal über denen liegen, die für die reinen Drifteffekte (siehe Abschnitt 4.1.1) bestimmt wurden.

#### *Schlußfolgerungen*

- ⇒ *Bei Injektion von Lösungsmittel kommt es zu zusätzlichen Einflüssen auf das RIFS-Signal.*
- ⇒ *Daher wird für die Auswertung von Schichtdickeneffekten die optische Schichtdicke zu definierten Zeitpunkten nach Injektionen bestimmt.*
- ⇒ *Die Effekte führen zu einer größeren Unsicherheit im Signal, als die reinen Drifteffekte. Die Unsicherheiten betragen für DMF etwa  $\pm 50$  pm, für DME  $\pm 20$  pm.*

#### **4.1.3 Kupplung von Fmoc-Aminocaprinsäure in 1-2-Dimethoxyethan**

Wie beschrieben sind sowohl Signal-Rauschverhältnis, Driften als auch zusätzliche Effekte auf das Signal von RIFS-Messungen mit dem Lösungsmittel 1,2-Dimethoxyethan DME durch den höheren Nutzsignalanteil günstiger als bei den für Festphasensynthesen üblicheren Lösungsmitteln Dimethylformamid DMF oder Tetrahydrofuran THF. Aufgrund des relativ unpolaren Charakters von DME sind allerdings die meisten Fmoc-geschützten  $\alpha$ -Aminosäuren in DME nur schlecht löslich. Die Fmoc-geschützte 6-Aminohexansäure ( $\epsilon$ -Aminocaprinsäure) löst sich jedoch auch in relativ hohen Konzentrationen.

In Abbildung 4-10 ist die Kupplung einer 0,2 M Fmoc-Aminocaprinsäurelösung mit DIC an eine DAPEG-Oberfläche (Oberflächenfunktionalisierung siehe Abbildung 2-7) gezeigt. Nach der Aufnahme von 10 Minuten Basislinie wurde die Kupplungslösung in die Meßzelle injiziert. Man erkennt einen Sprung in der optischen Schichtdicke von ca. 1 nm. Anschließend nahm die optische Schichtdicke kontinuierlich zu, wobei der Signalverlauf eindeutig einen Sättigungscharakter aufwies. Nach 1 h wurde die Kupplungslösung aus der Meßzelle gespült, was zu einem negativen Sprung des Signals führte. Es verblieb ein Zuwachs der optischen Schichtdicke von 1330 pm. Anschließend wurde 20%ige Piperidinlösung in DME injiziert, worauf das Signal rasch abnahm. Nach 10 min Inkubation wurde mit DMF gespült, das verbleibende Schichtdickensignal war um 500 pm niedriger als die optische Schichtdicke nach der Kupplung, im Vergleich zur Basislinie vor der Kupplung verblieben 840 pm residuale Schichtdickenzunahme. In zwei weiteren Schritten wurde jeweils noch einmal 20%ige Piperidinlösung injiziert. Dabei nahmen die optischen Schichtdicken wiederum ab, wobei die Signalverläufe deutlich flacher waren. Die entsprechenden Signale unter DME nahmen um

240 bzw. 80 pm ab. Insgesamt verblieb damit 510 pm Zuwachs im Vergleich zur Basislinie zu Beginn der Messung. Dieses Ergebnis läßt sich folgendermaßen erklären: Zunächst band die Fmoc-geschützte Aminohexansäure an die Oberfläche. Die Bindungskurve zeigte einen Sättigungsverlauf entsprechend der Abnahme an Bindungsstellen (Aminogruppen) auf der Oberfläche. Der Sprung der optischen Schichtdicke um ca. 1 nm bei Injektion der Kupplungslösung setzte sich dabei vermutlich aus einem Effekt aufgrund der unterschiedlichen optischen Eigenschaften des reinen Lösungsmittels bzw. der Kupplungslösung sowie einer sehr raschen Bindung zusammen, da beim Spülen nach der Kupplung ein Sprung um lediglich 350 pm beobachtet wurde.

Bei der Injektion der Piperidinlösung wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und die entstehenden Abspaltprodukte diffundierten in die Lösung. Dies äußerte sich als Abnahme der optischen Schichtdicke. Diese Reaktion war nach der ersten Piperidininjektion noch nicht beendet, daher wurden auch bei den folgenden Injektionen noch Schutzgruppenreste abgespalten.

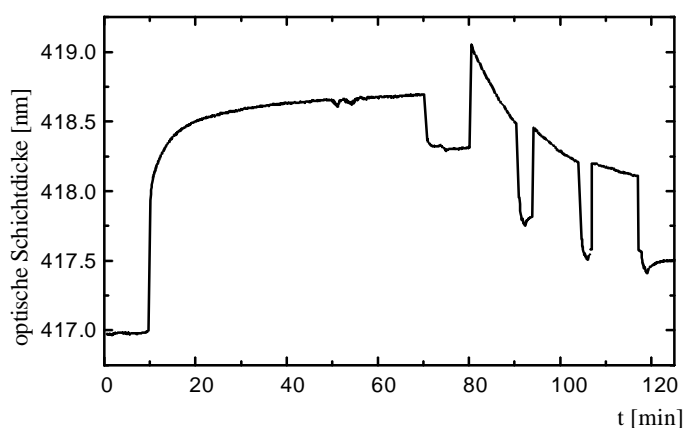


Abbildung 4-10 Kupplung von Fmoc-Aminocapronsäure mit DIC in DME an eine Diamino-PEG Oberfläche und Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit 20% Piperidin.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten Signalverlauf tatsächlich um Bindung und Abspaltung von der Transduceroberfläche und nicht um Artefakte wie Quelleffekte des Polyethylenglykols oder der Meßzellendichtung handelte, wurde das in Abbildung 4-11 gezeigte Experiment durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst wieder eine Basislinie aufgenommen und dann nach 10 Minuten eine 0,2 M Lösung von Fmoc-Aminocapronsäure und DIC injiziert. Man erkennt einen ansteigenden Signalverlauf wie in Abbildung 4-10. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Spülen mit dreimal 100 µl DMF unterbrochen. In dieser Zeit hat soviel Fmoc-Capronsäure an

die Oberfläche gebunden, daß die optische Schichtdicke im Vergleich zur Basislinie um ca. 260 pm zugenommen hat. Anschließend wurde wieder Kupplungslösung injiziert, das Signal zeigt nach dem Brechungsindexsprung weiter einen raschen Anstieg, entsprechen einer Fortsetzung der Bindungskurve, die durch das Spülen mit DMF abgebrochen wurde. Dies kann auch bei den weiteren Spül- und Injektionsschritten beobachtet werden, wobei sowohl bei den Abschnitten der Bindungskurve unter DMF als auch unter Kupplungslösung ein Sättigungsverlauf erkennbar ist. Die Reaktion scheint nach der 7. Injektion abgeschlossen zu sein; während der 8. Phase unter Kupplungslösung ändert sich das Signal praktisch nicht mehr.

Nach dem Spülen verbleibt eine Schichtdickenzunahme im Vergleich zur Basislinie vor der Reaktion von 960 pm. Auch die Abspaltung wurde durch wiederholte Injektionen von Piperidinlösung und Spülvorgängen aufgeteilt. In der ersten Abspaltungsphase nimmt das Signal um 340 pm ab, gerechnet als Differenz der Basislinie vor und nach der ersten Injektion von Piperidin. Innerhalb der zweiten zehnmütigen Abspaltungsphase nimmt die optische Schichtdicke nochmals um 110 pm ab, in der dritten dann nur noch um 50 pm. Allerdings wird auch während der vierten Piperidininkubation noch ein leicht abnehmendes ein Signal detektiert, obwohl unter DME residual kein Schichtdickeneffekt mehr zu beobachten ist.

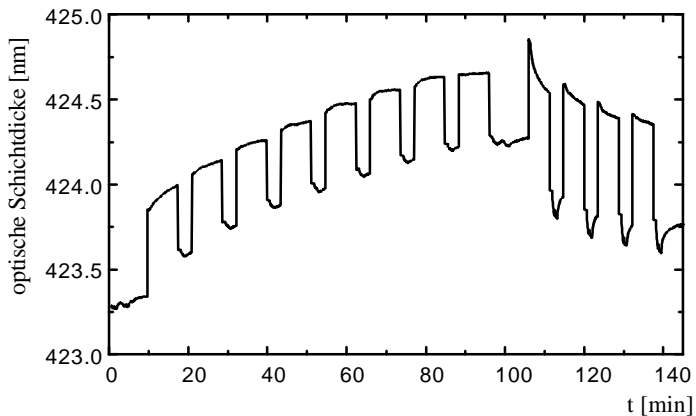


Abbildung 4-11 Wiederholte Injektion von Kupplungslösung (*Fmoc*-Aminocapronsäure, DIC je 0,2 M) und wiederholte Abspaltung der *Fmoc*-Gruppe mit 20% Piperidin.

Die Wiederholung des Experiments der Kupplung von *Fmoc*-Aminocapronsäure an DAPEG-Oberflächen führte zu unterschiedlichen Bindungskurven, von denen in Abbildung 4-12 neun exemplarisch gezeigt sind. Dabei fällt auf, daß der Sprung zu Beginn der Inkubation von Kupplungslösung, die erreichte optische Schichtdicke nach der Kupplung und der zeitliche Verlauf variierten. Der Sprung enthält sowohl Anteile, die aus den unterschiedlichen optischen Eigenschaften von reinem Lösungsmittel und der Lösung, sowie aus beginnender Bindung an die Oberfläche resultieren. Der erste Anteil kann durch den Sprung beim Spülen

nach der Kupplung mit DMF gut abgeschätzt werden, da sich die optischen Eigenschaften der PEG-Schicht durch die Kupplung von Aminosäure nur relativ wenig ändern.

Der Vergleich der beiden Sprünge vor und nach der Inkubation zeigt damit, daß innerhalb der ersten Sekunden relativ viel Substanz an die Oberfläche bindet. Für die unterschiedlichen Schichtdickenzunahmen wurde eine Korrelation mit dem Alter der Schichten gefunden (Abbildung 4-13). Die Abnahme der Bindungsfähigkeit für Aminosäuren bei nicht frisch präparierten Schichten deutet auf einen Alterungsprozeß hin. Daher wurde untersucht, ob bei einer längeren Lagerung unter Modifikationsbedingungen, d. h. bei 70 °C und unter dem aufgetragenen DAPEG-Überschuß, die Alterung verzögert werden kann. Wie aus Abbildung 4-13 zu erkennen ist, trifft dies für den Zeitraum von 2-4 Tagen offenbar zu. Eine Erklärung für den Alterungsprozeß konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Für SAM-Schichten aminoterminaler Thiole wurde die Bildung von Carbamaten IR-spektroskopisch nachgewiesen, die eine verminderte Reaktionsfähigkeit der entsprechenden Oberflächen gegenüber chemischen Modifikationen nach sich zog (Brockman *et al.* 1999).

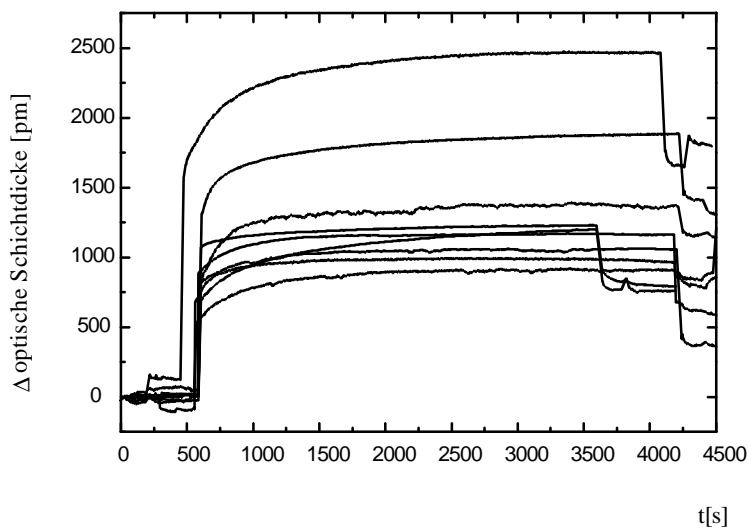


Abbildung 4-12 9 Bindungskurven der Kupplung von Fmoc-Aminocaprinsäure mit DIC in DME, je 0,2 M, an eine Diamino-PEG Oberfläche.

Da die Bindungskurven in Abbildung 4-12 unterschiedliche Gleichgewichtsbelegungen und Brechungsindexsprünge aufwiesen, wurde zur Charakterisierung des Zeitverlaufs an die Bindungskurven in erster Näherung eine Funktion gemäß Gl. (16) angepaßt. Diese stellt nur eine Näherung dar, da hier im ruhenden Probenvolumen gemessen wurde. Allerdings dürfte die Annahme einer konstanten Konzentration an gelöstem Bindungspartner eine sehr gute Näherung darstellen, da selbst bei Bindung einer Monolage weniger als 1‰ der aktivierten

Aminosäure bindet und die relativ kleine Masse des Aktivesters einen hohen Diffusionskoeffizienten bedingt. Eine weitere Vereinfachung stellt die einer Reaktion nach Gl. (14) dar, da tatsächlich zwei Teilchen (der HOBt-Aktivester mit den Aminogruppen auf der Oberfläche) unter Bildung des Peptids und eines HOBt-Anions entstehen. Dieses Anion wird allerdings sofort unter Protonenaufnahme zu HOBt reagieren und somit nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Aus diesen Gründen dürfte die Annahme einer Reaktion pseudoerster Ordnung eine gute Näherung darstellen.

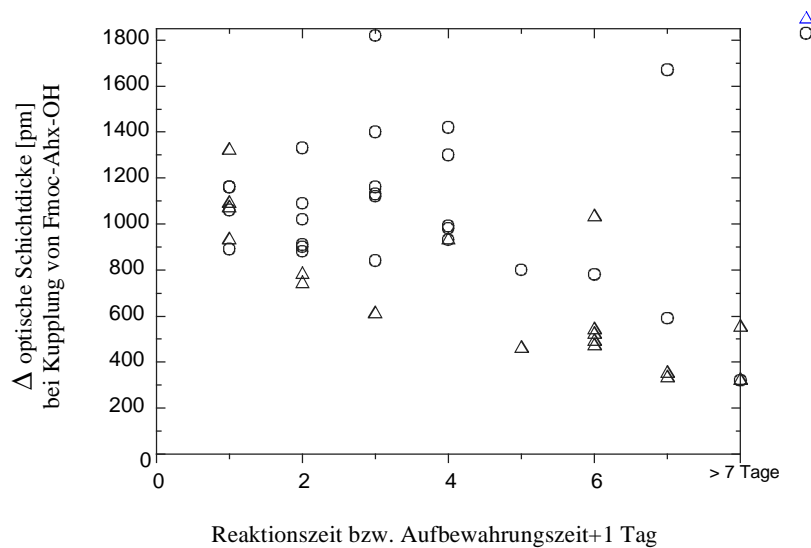


Abbildung 4-13 Vergleich der Schichtdickeneffekte bei Kupplung von Fmoc-Aminocapronsäure. ○: Transducer bis zur Verwendung unter DAPEG getempert; △: Reaktionszeit 1 Tag, danach Lagerung unter Atmosphärenbedingungen.

Um Fehler im Anfangsbereich der Bindung aufgrund der Injektion und aufgrund von Drifteffekten im Endbereich zu minimieren, wurden nur Schichtdickenwerte im Bereich zwischen 150 s und 1150 s ausgewertet. Die in Abbildung 4-14 dargestellten Werte für die Ratenkonstanten  $k_s$  variieren um den Faktor 2,2, wobei weder eine Korrelation mit dem Alter der Schichten noch mit der Endschichtdicke gefunden wurde. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Vorstellung der Oberfläche als einem einheitlichen, polymerbürstenartigem Film nur eine Idealbetrachtung ist und in der Realität mit einer Vielzahl unterschiedlicher Bindungsstellen zu rechnen ist, ist diese Streuung verständlich.

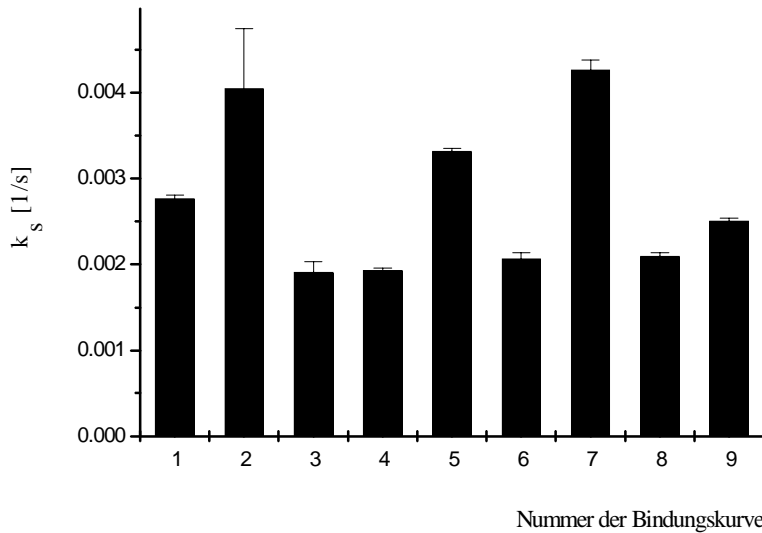


Abbildung 4-14 Nach Gl. (16) berechnete Ratenkonstanten für die Bindungskurven in Abbildung 4-12 von oben nach unten. Fehlerbalken: Fehler der Anpassung.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Bei Inkubation von Kupplungslösung auf eine Oberfläche mit freien Aminogruppen werden Sättigungssignale beobachtet.
- ⇒ Der Vergleich der optischen Schichtdicke unter demselben Lösungsmittel vor der Reaktion und bei den Waschschrritten beweist, daß die zunehmenden Signale unter Kupplungslösung durch Veränderungen an der Oberfläche hervorgerufen werden.
- ⇒ Die Injektion von frischer Kupplungslösung auf eine Oberfläche, bei der schon alle Gruppen abreagiert haben, führt zu keiner weiteren Zunahme.
- ⇒ Die beobachteten Schichtdickenzunahmen sind sehr unterschiedlich, eine Korrelation mit dem Alter der Schichten läßt einen chemischen „Alterungsprozeß“ vermuten, der die Anzahl der reaktionsfähigen Aminogruppen reduziert.
- ⇒ Eine kinetische Auswertung der Kupplung mit einem Modell pseudo-erster Ordnung ergab Ratenkonstanten, die etwa um den Faktor zwei streuten. Diese Streuung ist zwar höher, als die bei Affinitätsbindungen unter Wasser üblicherweise bestimmten Werte, zeigt aber doch eine gewisse Reproduzierbarkeit der Bindung und der Detektion.
- ⇒ Auch die Abspaltung der Fmoc-Gruppe läßt sich verfolgen, allerdings führt hier die wiederholte Injektion von Piperidinlösung auch dann zu leicht abnehmenden Signalen, wenn sich die residuale Schichtdicke, d.h. unter DME vor und nach der Injektion, nicht mehr ändert.

#### 4.1.4 Kupplung von Fmoc-Aminosäuren in DMF

Die meisten Peptidsynthesen werden im Lösungsmittel DMF durchgeführt, da hier alle Fmoc-geschützten Aminosäuren und die Kupplungsreagenzien sehr gut löslich sind. Wie be-

schrieben, sind in diesem Lösungsmittel die Unsicherheiten im RfS-Signal größer, als unter DME. Die maximal erwarteten Signale bei der Kupplung Fmoc-geschützter Aminosäuren wurden für die beiden Aminosäuren Glycin bzw. Arginin (mit Seitenschutzgruppe Pbf) in Kapitel 4.1.1 für eine Monolage mit 2,3 nm bzw. 3,8 nm berechnet. Wie erwähnt würde dies allerdings nur für eine komplette Umsetzung aller Silanolgruppen auf der Oberfläche mit dem Epoxysilan, DAPEG und mit der Aminosäure gelten.

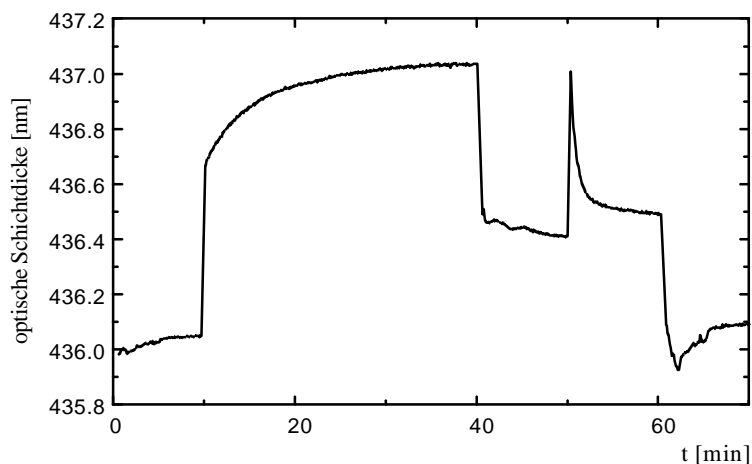


Abbildung 4-15 Kupplung von 0.1 M Fmoc-Gly-OH mit 0,1 M TBTU/HOBT, 0.2 M DIEA an eine DAPEG-Oberfläche und anschließende Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF.

Abbildung 4-15 zeigt die Kupplung vom Fmoc-Glycin mit TBTU/HOBT/DIEA (siehe Kapitel 2.3.2) an eine DAPEG-Oberfläche. Nach 10 min Basislinie wurde die Kupplungslösung injiziert. Man erkennt zunächst wieder einen Sprung, gefolgt von einer Sättigungskurve. Nach 40 min wird wieder mit DMF gespült, es verbleibt eine residuale Schichtdickenzunahme im Vergleich zur Basislinie vor der Injektion von 370 pm. Dies entspricht 16% des oben berechneten Maximalwertes für eine Monolage. Bei 50 min wurde 20% Piperidinlösung injiziert, es folgt ein Sprung und eine stark abnehmender Signalverlauf. Beim Spülen mit DMF und anschließendem Äquilibrieren wurde eine optische Schichtdicke erreicht, die knapp 50 pm über der Basislinie vor der Kupplung, und damit innerhalb der durch Drift und Spüleffekte zu erwartenden Unsicherheit des Signals, liegt. Da nach der Fmoc-Abspaltung nur eine sehr kleine Gruppierung (Amidbindung und Methylengruppe) zusätzlich an der Oberfläche verbleibt, ist eine vergleichbare optische Schichtdicke wie vor der Kupplung zu erwarten. Die anschließende Kupplung der Seitengruppen-geschützten Aminosäure Arginin (Abbildung 4-

16) führte zu einer residualen Schichtdickenzunahme von 730 pm, was 19% des errechneten theoretischen Wertes für eine Monolage entspricht. Bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verblieben 390 pm Schichtdickenzunahme im Vergleich zur Basislinie vor der Reaktion. Da die Seitenkette mit der Schutzgruppe Pbf nicht abgespalten wird, entspricht diese residuale Zunahme den Erwartungen.

Ebenfalls in Abbildung 4-16 gezeigt ist die Inkubation der Kupplungslösung auf eine gecappte DAPEG-Oberfläche. Als Cappen bezeichnet man die Reaktion von Aminogruppen auf der Oberfläche mit einer monofunktionellen Spezies, die eine Weiterreaktion verhindert. Diese Reaktion wird manchmal als Zwischenschritt vor der Fmoc-Abspaltung bei Peptidfestphasensynthesen angewendet, um zu verhindern, daß bei einem Kupplungsschritt nicht umgesetzte Aminogruppen bei der nächsten Kupplung wieder reagieren und damit eine lediglich um einen Rest verminderte Fehlsequenz ergeben, die vom eigentlichen Produkt schwer abzutrennen sind. Im Gegensatz hierzu sind die gecappten Fehlsequenzen deutlich kürzer als das Endprodukt und lassen sich daher leichter abtrennen. Die DAPEG-Oberfläche, die in diesem Experiment verwendet wurde, wurde eine Stunde mit Acetylchlorid umgesetzt. Die Inkubation von Kupplungslösung auf eine solche Oberfläche führte zu einem Signalsprung aufgrund der etwas anderen optischen Eigenschaften dieser Lösung im Vergleich zu reinem DMF. Während der Inkubation ist ein leicht driftendes Signal zu beobachten, beim Spülen mit DMF (nach 40min) wurde ein lediglich um 15 pm von der Basislinie vor der Inkubation abweichender Wert erhalten. Bei Inkubation von Piperidinlösung resultierte zunächst wieder ein Sprung im Signal. Anschließend nahm das Signal etwas stärker ab, als es durch einen reinen Drifteffekt zu erklären wäre. Wie die optische Schichtdicke nach Spülen mit Lösungsmittel (nach 60 min) beweist, fand keine Abspaltung von der Oberfläche statt. Diese verstärkte Drift während der Piperidininkubation wurde schon in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Eventuell ist der Effekt auf eine Quellung der O-Ringdichtung der Zelle zurückzuführen. Auch die Effekte beim Waschen mit Lösungsmittel nach 62 min und die anschließende Äquilibration des Signals sind, wie diese Referenzmessung mit einer inaktiven Oberfläche zeigt, reproduzierbar. Eine solche Oberfläche könnte zur Referenzierung der Messungen mit dem in Kapitel 4.3 vorgestellten Zweikanalaufbau herangezogen werden.



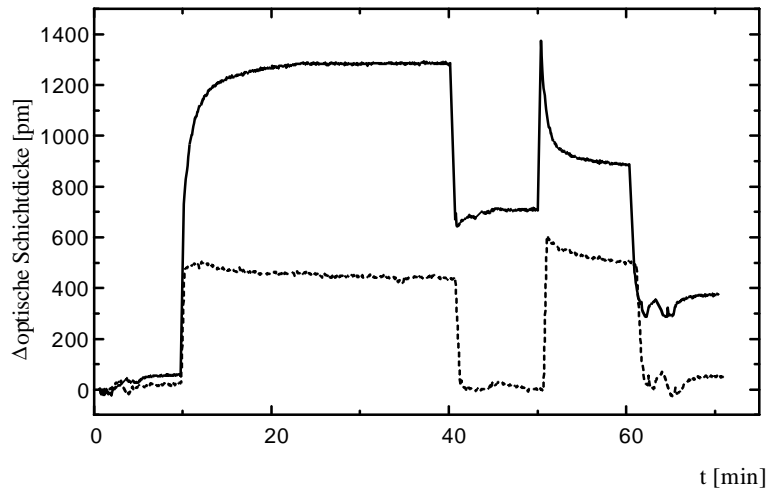


Abbildung 4-16 Kupplung von 0,1 M Fmoc-Arg(Pbf)-OH mit 0,1 M TBTU/HOBT, 0,2 M DIEA (Diisopropylethylamin) an eine DAPEG-Oberfläche und Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF. Gestrichelt: gekuppte DAPEG-Oberfläche, siehe Text.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Auch unter dem häufig für Peptidsynthesen verwendeten Lösungsmittel DMF sind sowohl Kupplung als auch Schutzgruppenabspaltung zeitaufgelöst detektierbar
- ⇒ Auch für die kleinste Aminosäure Glycin wurden noch signifikant detektierbare Signale gemessen.
- ⇒ Eine Referenzoberfläche auf der alle reaktiven Aminogruppen abgesättigt wurden, zeigt keine Bindungseffekte und könnte zur Referenzierung von Sprüngen und Driften im Signal verwendet werden.

#### 4.1.5 Syntheseverfolgung für ein Hämagglutinin-Peptid

Als Modellsystem für die Syntheseverfolgung eines Peptids wurde ein Teil des Hämagglutinins (HA) des humanen Influenzavirus gewählt, gegen das ein hochaffiner monoklonaler Antikörper kommerziell erhältlich ist. Das Hämagglutinin ist ein Oberflächenprotein, das an der Virusinfektion beteiligt ist. Der Antikörper wird allerdings in der Regel dazu verwendet, rekombinante Proteine, deren DNA-Sequenz um die Sequenz des HA-Epitops erweitert wurde (sogenanntes Epitope Tagging), zu detektieren bzw. zu reinigen.

Bei dem Epitop handelt es sich um ein Nonapeptid mit der Sequenz Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala (siehe Abbildung 4-17). Mit diesem Antikörper steht eine Methode zur Verfügung, den Syntheserfolg direkt an der Transduceroberfläche zu überprüfen. Gleichzeitig

handelt es sich damit um einen Test, wie er bei einem Screening von auf der Oberfläche synthetisierten Bibliotheken mit einem Targetprotein durchgeführt werden würde.

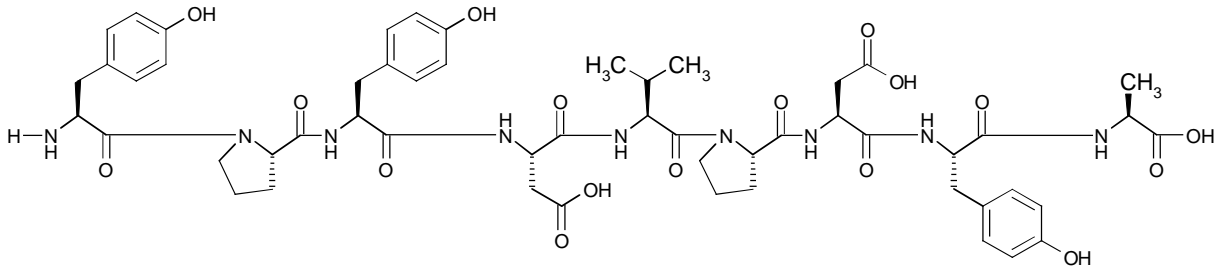


Abbildung 4-17 Struktur des HA-Peptids

Das Peptid wurde vom C-terminalen Ende unter Verwendung der Fmoc-Strategie aufgebaut. In Abbildung 4-18 sind beispielhaft die Bindungskurven für die erste, fünfte und neunte Aminosäure dargestellt. Für alle Kupplungen wird innerhalb des Inkubationszeitraums eine Sättigung erreicht, wobei dies unterschiedlich lange dauert. Im Gegensatz dazu scheint die Abspaltung der Fmoc-Gruppe einheitlich nach drei Minuten abgeschlossen zu sein.

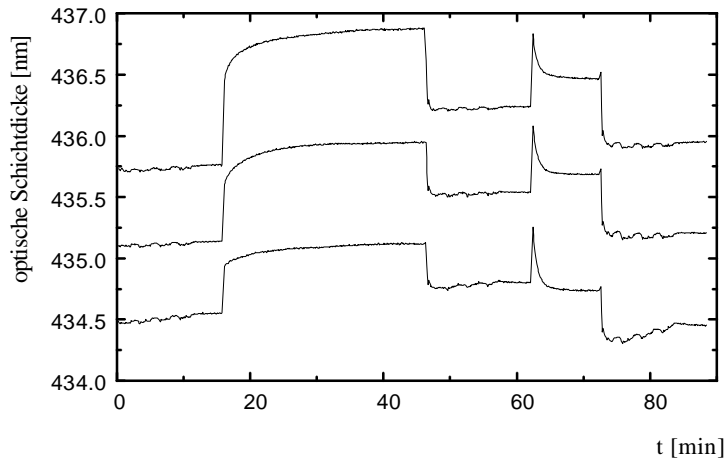


Abbildung 4-18 Beispielhafte Bindungskurven für die Synthese des HA-Peptids: Alanin (1. AS), Valin (5. AS), Tyrosin (9. AS).

Abbildung 4-19 zeigt im Überblick die beobachteten Schichtdickenänderungen nach den jeweiligen Kupplungen und Abspaltungen. Die Zunahmen der optischen Schichtdicken für die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäure sind unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Unsicherheiten im RfS-Signal unter DMF signifikant. Die residualen Zunahmen nach Abspaltung der Schutzgruppe sind teilweise negativ, liegen allerdings innerhalb des Bereiches, der aufgrund dieser Unsicherheiten im Signal als nicht signifikant gelten muß.

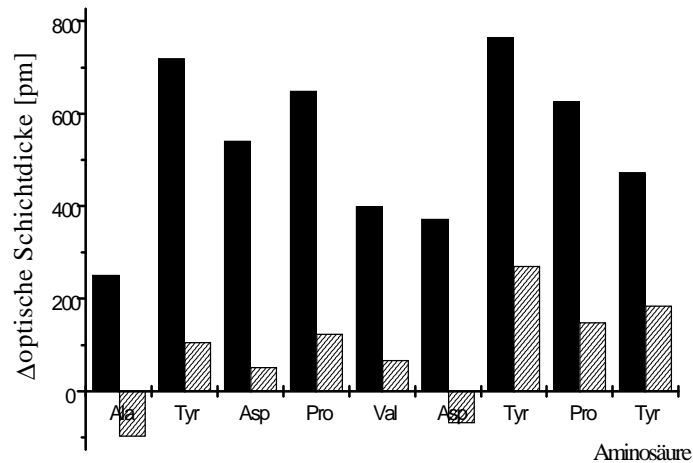


Abbildung 4-19 Schichtdickenzunahmen bei den Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren. Ausgefüllt: nach Kupplung, schraffiert: Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe.

Vor der Wechselwirkung mit dem Antikörper müssen noch die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten werden. Wie in Kapitel 2.3.2 (siehe auch Abbildung 2-9) beschrieben, wird hierfür Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, wobei im Unterschied zur üblichen polymer-trägerbasierten Synthese das Peptid nicht von der Oberfläche abgespalten wird, da keine säurelabile Ankergruppierung verwendet wurde. Auch die TFA-Abspaltung wurde unter online-Kontrolle durchgeführt. Hier war zunächst ein stark negativer Sprung beim Wechsel von DMF auf TFA zu beobachten, der auf die deutlich verschiedenen optischen Eigenschaften ( $n_D(\text{DMF}) = 1,431$ ;  $n_D(\text{TFA}) = 1,300$ ) zurückzuführen war. Anschließend nahm das Signal weiter ab, durchlief ein Minimum und stieg danach wieder leicht an. Beim Wechsel auf DMF fand wieder ein Sprung der optischen Schichtdicke statt, die residuale Schichtdicke ist um 1,3 nm niedriger als vor der Reaktion mit TFA.

Zur Erklärung der leicht ansteigenden Signale wurde eine Kontrollmessung mit einem unmodifizierten Transducerchip durchgeführt (siehe Abbildung 4-20). Man erkennt hier wieder einen negativen Schichtdickeneffekt beim Wechsel auf TFA, gefolgt von einem Anstieg der optischen Schichtdicke. Dieser Effekt kann mit der Aufnahme von TFA durch den Dichtungsring erklärt werden. HPLC-Messungen mit diesem Material als stationäre Phase zeigten eine deutliche Retention<sup>5</sup> von TFA. Das heißt, im Falle der Seitenschutzgruppen-abspaltung wurde ein überlagertes Signal beobachtet.

Die Abnahme um 1,3 nm liegt über dem Nettozuwachs bei der Aminosäurenkupplung. Daher wurden unter gleichen Bedingungen DAPEG modifizierte Transducer mit TFA behandelt.

<sup>5</sup> Diese Auskunft wurde von Manfred Berndt, Agilent Technologies, Waldbronn erhalten

Auch hier wurden Schichtdickenänderungen von ca. 1 nm erhalten. Vermutlich setzt sich die beobachtete Schichtdickenabnahme also zum einen aus Effekten aufgrund der Seitenkettenschutzgruppenabspaltung und zum anderen aus der Abnahme aufgrund von Einflüssen der Polyethylenglycolschicht zusammen, wie z. B. einer teilweisen Abspaltung von DAPEG oder Desorption nur adsorbierten Polymers.

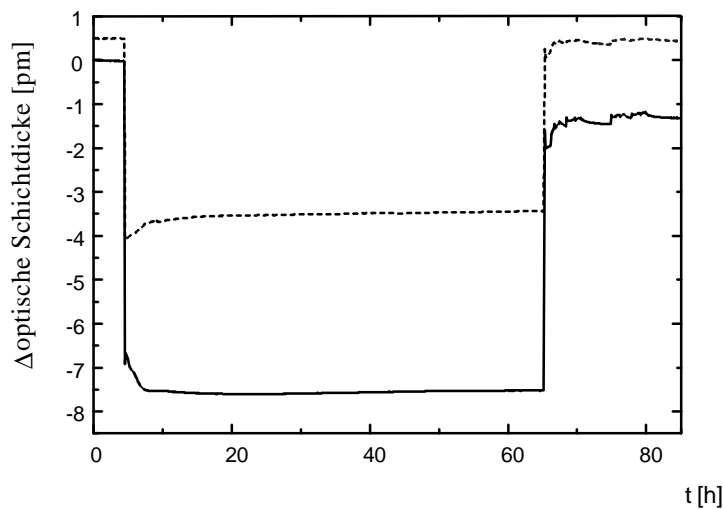


Abbildung 4-20 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA. Durchgezogen: DAPEG mit HA-Peptid inkl. Seitenschutzgruppen. Gestrichelt: reine SiO<sub>2</sub>-Oberfläche

Die Meßzelle mit dem entschützten Peptid wurde in einen RIFS-Aufbau mit Standard-FIA überführt. Nach gründlichem Spülen mit Trägerpuffer wurde zunächst die unspezifische Wechselwirkung mit Ovalbumin und Rinderserumalbumin überprüft. Für das erste Protein wurden weniger als 50 pm optische Schichtdickenzunahme erhalten, für das zweite 180 pm, von denen nach längerem Spülen etwa 100 pm übrig blieben.

Anschließend wurde eine Lösung von 1 µg/ml monoklonalem anti-HA Antikörper injiziert (Abbildung 4-21). Man erkennt eine Schichtdickenzunahme, die im Injektionszeitraum (mit A gekennzeichnet) etwa 550 pm beträgt. In der anschließenden Auswaschphase (B) findet eine leichte Dissoziation statt, die aufgrund der Avidität der Antikörperbindung relativ schwach ist. Die Injektion von 20 mM Salzsäure (C) und Acetonitril/Propionsäure/Wasser (49:2:49) (D) führt zur vollständigen Regeneration der Oberfläche. E kennzeichnet die Basislinie unter Trägerstrom nach der Regeneration.

In einem weiteren Experiment wurde die doppelte Antikörperkonzentration injiziert, diese führt zu einer Zunahme der optische Schichtdicke von ca. 650 pm. Um zu überprüfen, ob die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche spezifisch ist, wurde in einem dritten Schritt eine

Lösung des Antikörpers mit 100  $\mu\text{M}$  Lösung des HA-Peptids (synthetisiert an einem Polymerharz und mit MS charakterisiert) vorinkubiert und injiziert. Die entsprechende Meßkurve in Abbildung 4-21 zeigt nur noch eine sehr leichte Bindung an die Oberfläche, d. h. die Antikörper wurden weitestgehend inhibiert, was eine spezifische Bindung belegt. Die restliche Bindung konnte auch durch die zehnfache Menge an Antigen nicht weiter inhibiert werden. Dies deutet auf eine relativ hohe Dissoziationsratenkonstante des Antikörper-Peptidkomplexes hin, wie auch die deutliche Dissoziation nach Injektion der höheren Antikörperkonzentration zeigt. Diese hohe Dissoziationsratenkonstante führt dazu, daß im oberflächennahen Bereich ein Teil der Antigen-Antikörper-Komplexe im dynamischen Gleichgewicht zerfällt und an das immobilisierte Antigen bindet.

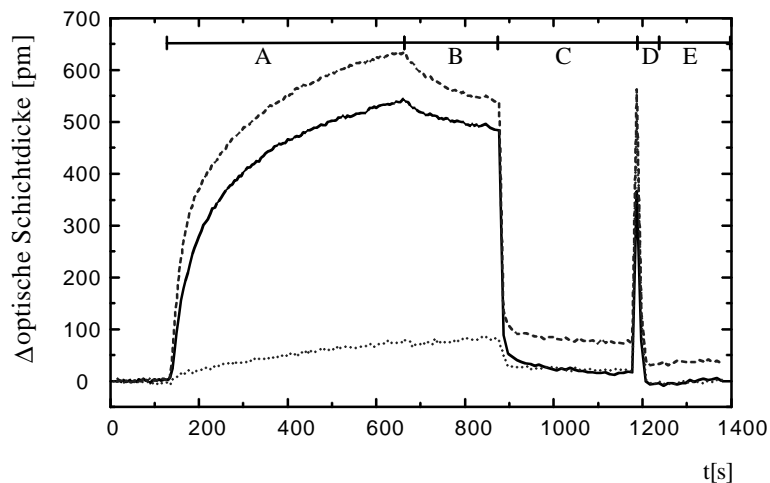


Abbildung 4-21 Injektion von monoklonalem anti-HA-Antikörper. Durchgezogen: nur 1  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper, gestrichelt: 2  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper; gepunktet: 1  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper in 100  $\mu\text{M}$  Lösung des HA-Peptids.

Die Synthese eines Peptids aus den ersten 8 Aminosäuren (vom C-terminalen Ende gezählt) auf der Oberfläche mit anschließender Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen, ergab eine Oberfläche auf der der Antikörper kaum band. Während der Injektion des Antikörpers über die Oberfläche mit dem um einen Tyrosinrest verminderten HA-Peptid ergab sich eine Schichtdickenzunahme von lediglich 40 pm im gleichen Zeitraum wie in Abbildung 4-21.

Um die Schichtdickeneffekte besser quantifizieren zu können, wurde die Anzahl der Bindungsstellen durch folgendes Vorgehen deutlich erhöht: Zunächst wurde dreimal die Aminosäure Lysin gekuppelt, bei der sowohl die  $\alpha$ -Aminogruppe als auch die  $\epsilon$ -Aminogruppe mit Fmoc geschützt waren. Bei der Entschützung mit Piperidin entsteht damit bei jedem Schritt theoretisch die doppelte Anzahl an Bindungsstellen, wodurch sogenannte Lysin-

Bäumchen erhalten werden. Dementsprechend erhöhen sich die Schichtdickenzunahmen in den ersten drei Schritten (siehe Abbildung 4-22).

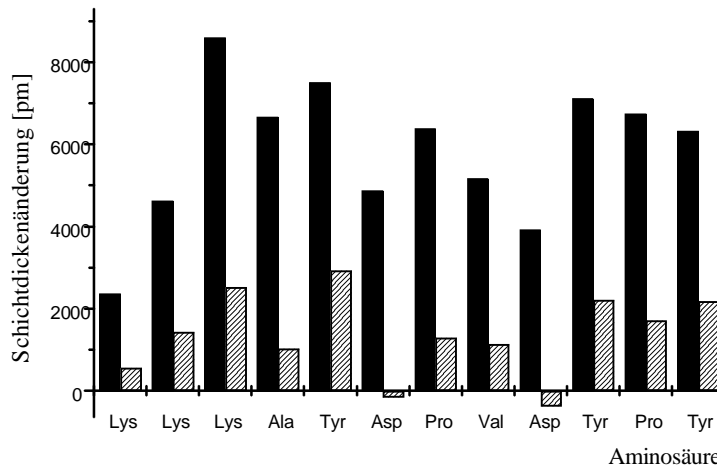


Abbildung 4-22 Schichtdickenzunahmen bei den Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren. Ausgefüllt: nach Kupplung, schraffiert: Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe.

Interessant ist, daß auch hier die Kupplung der beiden Asparaginsäurereste zu residual negativen Änderungen der optischen Schichtdicke führt. Insgesamt verblieben bei diesem Experiment residual 16,45 nm Schichtdickenzunahme. Die anschließende Behandlung mit TFA führte zu einer Abnahme der Schichtdicke um 3,16 nm. Das heißt die Seitenschutzgruppenabspaltung führt zu einer Schichtdickenabnahme um 19%, bzw. wenn man 1 nm Abnahme aufgrund der oben beschriebenen Effekte der Polymerschicht berücksichtigt, von 13%. Allerdings könnte die sehr hohe Belegung der Oberfläche mit Peptid zu einem niedrigeren Ausmaß der Effekte auf die DAPEG-Schicht führen. Als Näherung erster Ordnung können die reinen Massenänderungen bei diesem Schritt herangezogen werden. Man erhält einen Massenquotienten aus Molmassen der Seitengruppen und des Peptids mit Seitengruppen von 18%. Diese Abschätzung stellt natürlich eine sehr vereinfachte Näherung dar, da mit RIfS nicht Änderungen in der gebundenen Masse, sondern der Polarisierbarkeit detektiert werden.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Die komplette Synthese eines Nonapeptids einschließlich Abspaltung der Seitenschutzgruppen mit TFA konnte durch RIfS verfolgt werden.
- ⇒ Die verbleibenden Schichtdickeneffekte nach Fmoc-Abspaltung können nur zum Teil signifikant von Instabilitäten im Signal unterschieden werden.

- ⇒ Die inhibierbare Wechselwirkung mit einem spezifischen Antikörper beweist, daß auf der Oberfläche tatsächlich das Peptid synthetisiert wurde. Schon eine fehlende Aminosäure reduziert die Affinität zur Oberfläche so stark, daß fast keine Bindung beobachtet werden kann.
- ⇒ Die Verwendung der seiten- und endgruppengeschützten Aminosäure Lysin erlaubt das Aufbauen eines Lysinbäumchens und damit eine Erhöhung der Bindungsstellendichte. Damit erhält man größere Signale, die zu signifikanteren Schichtdickeneffekten führen.
- ⇒ Damit konnte die Abnahme der Belegung bei Abspaltung der Seitenschutzgruppen mit TFA bestimmt werden. Es ergab sich ein Wert von 19% (13% unter Annahme eines vergleichbaren Effekts auf die DAPEG-Schicht), die Abschätzung mit einer Näherung erster Ordnung über die Massenverhältnisse ergibt einen Wert von 17%.

#### 4.1.6 Referenzanalytik

Wie im Kapitel 2.3.1 ausgeführt, sind die Substanzmengen bei den durchgeführten Peptidsynthesen so niedrig, daß fast alle denkbaren Analysenmethoden für eine Referenzanalytik ungeeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden als Referenz herangezogen: zum einen die spektrale Ellipsometrie, die wie RfS Änderungen der Belegung einer Oberfläche über die Änderung der optischen Eigenschaften detektiert und zum anderen ein Sequenzierungsverfahren.

Tabelle 4-2 Modell zur Auswertung der Ellipsometriemessungen

Schicht	Brechungsindex/Dispersion
Luft	1
Peptid	1,4 (abgeschätzt)
SiO <sub>2</sub>	Dispersion aus Parameterfile des Ellipsometers
Si	Dispersion aus Parameterfile des Ellipsometers

Zur Referenzierung mit spektraler Ellipsometrie wurde ein oxidiertes Siliziumwafer mit GOPTS und Diaminopropan modifiziert und anschließend vermessen. Auf diesem Wafer wurde schrittweise das HA-Peptid aus den 9 Aminosäuren aufgebaut. In Abbildung 4-23 sind die Verläufe der ellipsometrischen Winkel  $\tan \Phi$  und  $\cos \Delta$  vor und nach der Peptidsynthese dargestellt.

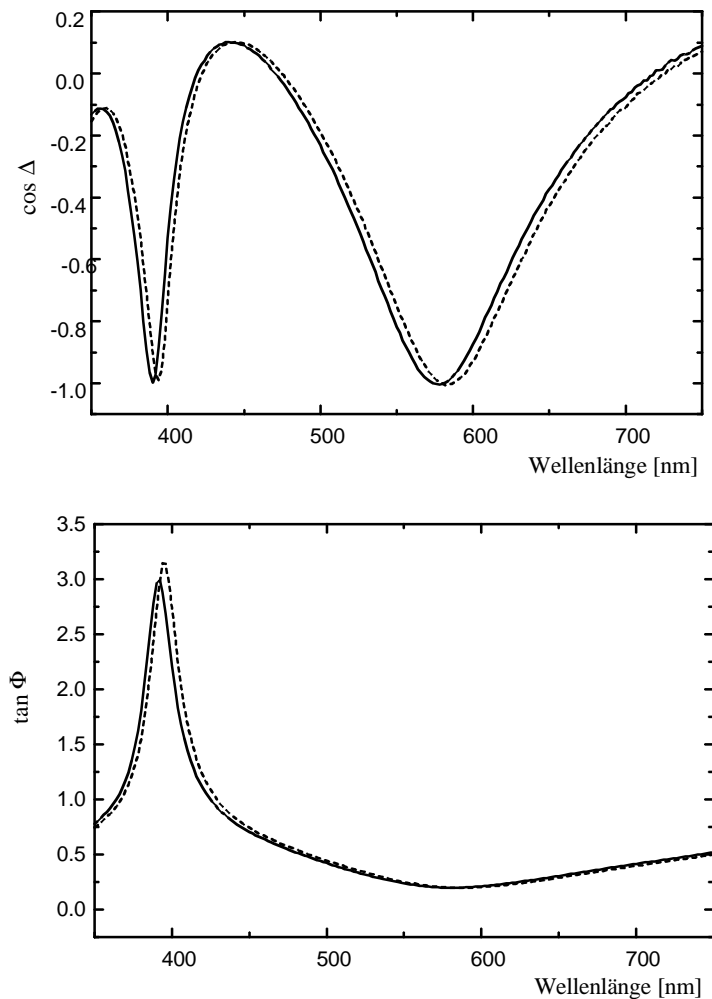


Abbildung 4-23 Ellipsometrische Winkel des Wafers (durchgezogen) und nach Synthese des Peptids (gestrichelt)

Durch Modellbildung kann aus den ellipsometrischen Winkeln die Peptidschichtdicke abgeschätzt werden. Aufgrund der sehr geringen Schichtdicke sind bei diesen Messungen Schichtdicke und Brechungsindex so stark korreliert, daß zur Auswertung der Brechungsindex der Peptidschicht konstant gehalten werden muß. Das angewendete Modell ist in Tabelle 4-2 aufgeführt. Zu beachten ist, daß die Peptidschicht in trockenem Zustand und nach Abspaltung aller Fmoc-Schutzgruppen vermessen wurde, weshalb der Brechungsindex deutlich niedriger ist als die in Abschnitt 4.1.1 angegebenen Werte.

Eine Anpassung an die gemessenen ellipsometrischen Winkel ergab eine Peptidschichtdicke von 3,14 nm. Anschließend wurde der Wafer mit einer TFA Lösung versetzt und nach Spülen und Trocknen erneut ellipsometrisch vermessen. Die Anpassung des Modellschichtsystems an die Meßwerte ergab eine Schichtdicke von 2,48 nm. Damit läßt sich der Beitrag durch die abgespaltenen Seitengruppen zu 21% berechnen, in guter Übereinstimmung sowohl mit der Abschätzung aus den Massenquotienten als auch aus den RfS-Daten (siehe Abschnitt 4.1.5).



Die zweite Referenzmethode, die Sequenzierung wurde in Vorversuchen an controlled pore glass (cpg)-Kügelchen getestet, das über eine deutlich größere Oberfläche verfügt. Nachdem diese erfolgreich waren, wurde auf Deckplättchen eine Peptidsequenz (Phe-Ala-Leu-Lys-Lys) synthetisiert. Die Deckplättchen wurden gewählt, da RfS-Transducer nicht in die Probenzelle des Sequenzers paßten, die Deckplättchen jedoch auch eine silikatische Oberfläche aufweisen.

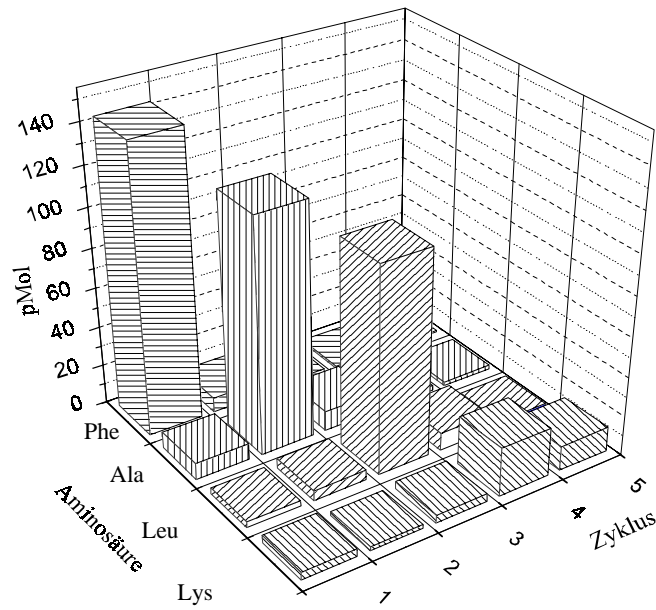


Abbildung 4-24 Sequenzierung des Peptids Phe-Ala-Leu-Lys-Lys.

In Abbildung 4-24 sind die von einer Fläche von ca. 170 mm<sup>2</sup> abgespaltenen Mengen an Aminosäurederivaten für die 5 Sequenzierzyklen aufgetragen. In allen Zyklen wurden hauptsächlich die erwarteten Aminosäuren gefunden. Für die beiden Lysinreste wurden wie zu erwarten niedrigere Mengen gefunden, da beim Kuppeln jedes Lysins wie oben beschrieben die Anzahl der Bindungsstellen an der Oberfläche verdoppelt wurde. Rechnet man die gefundenen Molmengen auf die Fläche der Deckgläschen um, so erhält man eine Stoffmengendichte von ca. 0,1 - 0,8 pMol/mm<sup>2</sup>. Diese liegt deutlich unter dem in Abschnitt 4.1.1 berechneten Maximalwert von 1,67 pMol/mm<sup>2</sup>, besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der obere Grenzwert für die 5. Aminosäure (Phenylalanin) erhalten und wie beschrieben durch die Verwendung von zweifach Fmoc-geschütztem Lysin in den ersten beiden Kupplungsschritten die Bindungsstellenzahl erhöht wurde. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem in Abschnitt 4.1.4 gefundenen Werten von 16 bzw. 19% des berechneten Maximalwerts.

### *Schlußfolgerungen*

- ⇒ *Durch eine Referenzmessung mit spektraler Ellipsometrie konnte die Schichtdicke des HA-Peptids unter Annahme eines Brechungsindex für die trockene Peptidschicht von 1,4 zu 3,14 nm bestimmt werden.*
- ⇒ *Nach Abspaltung der Seitenschutzgruppen resultierte eine Schichtdicke von 2,48 nm, damit ergibt sich eine Abnahme der Belegung um 21%, in guter Übereinstimmung mit den RfS-Daten.*
- ⇒ *Durch Sequenzierung von auf Glas synthetisierten Peptidschichten konnte nicht nur für cpg-Kügelchen sondern auch für Deckgläschen der Syntheseerfolg nachgewiesen werden.*
- ⇒ *Die erhaltenen Mengen an Phenylthiohydantoinaminosäuren liegen in der Größenordnung, die aus den RfS-Messungen für die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren bestimmt wurden.*

#### **4.1.7 Syntheseverfolgung bei nicht-peptidischen Festphasensynthesen**

Als Beispiel für die Reaktionsverfolgung nicht-peptidischer Festphasensynthesen wurde die Synthese von 2 Triazinderivaten untersucht. Substituierte Triazine bilden eine wichtige Pestizidklasse. Einzelne Derivate wie Atrazin oder Propazin wurden und werden noch in großen Mengen in der Landwirtschaft verwendet und spielen daher eine große Rolle im Bereich der Umweltanalytik. Aus diesem Grund sind verschiedene polyklonale und monoklonale Antikörper gegen diese Pestizide verfügbar. Damit kann auch bei diesem Testsystem wie beim HA-Peptid die Wechselwirkung zwischen auf der Oberfläche synthetisiertem Triazin und Antikörper untersucht werden.

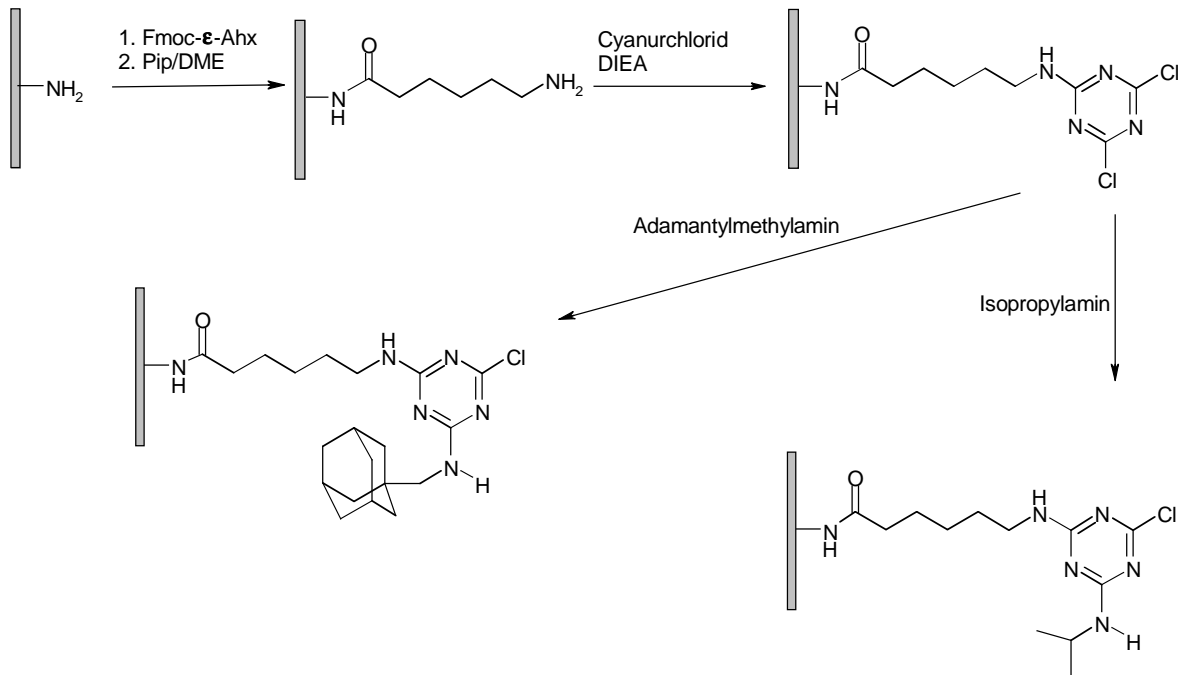


Abbildung 4-25 Syntheschema für die Synthese der Triazinderivate

Das Syntheschema ist in Abbildung 4-25 gezeigt. Zunächst wurde die ε-Aminocapronsäure mit DIC gekuppelt, gefolgt von einer Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin. Im zweiten Reaktionsschritt reagiert Cyanurchlorid durch nukleophile Substitution eines Chloratoms mit den freien Aminogruppen an der Transduceroberfläche. Durch Zugabe eines Amins (hier entweder Isopropylamin oder Adamantylmethylamin) wird ein zweites Chloratom am Triazinring ersetzt. Eine Substitution des dritten Chloratoms würde erst bei höheren Temperaturen stattfinden (Stankova und Lebl, 1996).

Der Verlauf der optischen Schichtdicke für das Isopropylaminderivat ist in Abbildung 4-26 dargestellt. Der erste Teil ist analog zur in Abbildung 4-10 gezeigten Bindungskurve. Die Zunahme der optischen Schichtdicke im Verlauf der Kupplung betrug 1060 pm, nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe verblieben residual 470 pm. Die anschließende Injektion von Cyanurchlorid führte zu einer Sättigungskurve und einer Schichtdickenzunahme von 440 pm. Der dritte Schritt der Reaktion, die Umsetzung mit Isopropylamin, ergab einen Schichtdickenzuwachs von 180 pm. Damit konnte die gesamte Synthese des Triazinderivats online verfolgt werden. Bei Wiederholungen dieses Experiments wurden wiederum unterschiedliche Signalzunahmen für die einzelnen Schritte detektiert, wie dies schon im Abschnitt 4.1.3 beschrieben wurde. Für das Adamantylmethylderivat wurden vergleichbare Bindungskurven erhalten, wobei bei der Kupplung des Amins etwas größere Schichtdickenzunahmen resultierten.

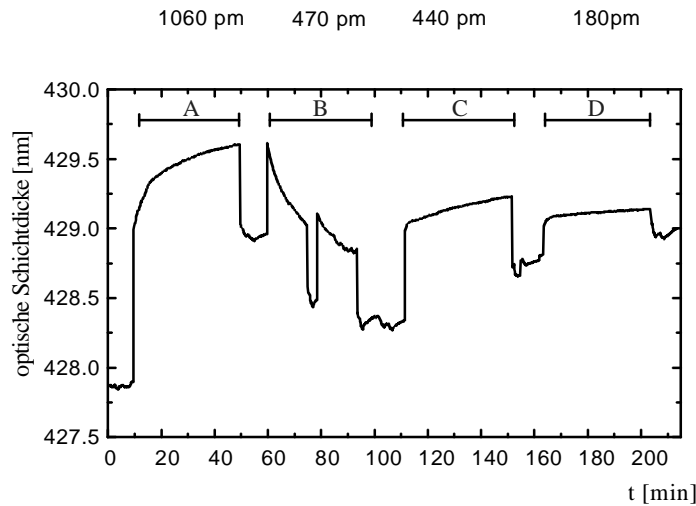


Abbildung 4-26 Synthese des Isopropylaminderivats. A: 0,2 M Fmoc-Aminohexansäure/DIC, B: 2x 20%Piperidin, C: 0,1 M Cyanurchlorid, D: 0,2 M Isopropylamin.

Der Erfolg der Synthese wurde wie im Beispiel des HA-Peptids mit Antikörpern gegen das synthetisierte Molekül überprüft. Dazu wurde über die Oberflächen mit dem Isopropylamin- bzw. Adamantylmethylaminderivat 1  $\mu\text{g/ml}$  eines monoklonalen Antikörpers injiziert (Abbildung 4-27). Die Steigung der Bindungskurve betrug dabei 2,9 pm/s für das Isopropylaminderivat und 1,8 pm/s für die Oberfläche mit dem Adamantylmethylaminderivat.

Im nächsten Schritt wurde jeweils die gleiche Antikörperkonzentration mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Atrazin (400facher Überschuß) versetzt über die Probe gegeben. Die Atrazincapronsäure blockiert dabei alle Antikörperbindungsstellen, daher resultiert für beide Oberflächen die Steigung null. Die geringere Steigung der nicht inhibierten Antikörper für die Adamantylderivatoberfläche spricht für eine langsamere Kinetik der Bindung, so daß es zu einem gemischten Bindungsverlauf (Massentransporteinfluß und Kinetikeinfluß) kommt.

Die unterschiedlichen Affinitäten des Antikörpers gegen die beiden Triazinderivate sollte gemäß Gleichung (18) zu unterschiedlichen Gleichgewichtsbeladungen führen. Dies wurde durch Injektion einer Lösung von 5  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper überprüft.

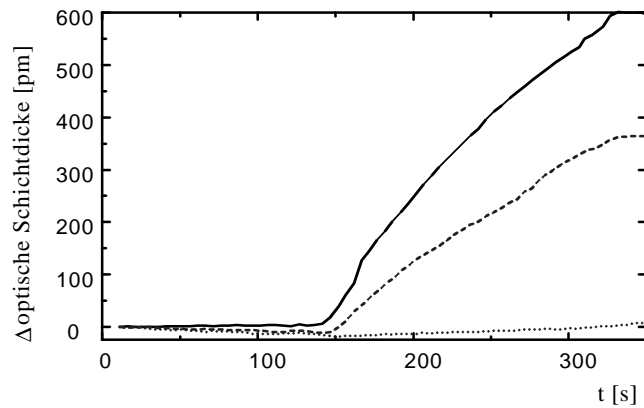


Abbildung 4-27 Injektion von 1  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper K4E7 (durchgezogen: Isopropylderivat, gestrichelt: Adamantylmethylderivat auf der Oberfläche) sowie 1  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper K4E7 inhibiert mit 1000  $\text{ng/ml}$  Atrazin (gepunktet), gezeigt ist hier nur die Kurve für das Adamantylmethylderivat, auf der Oberfläche mit dem Isopropylderivat wurde ebenfalls keine Bindung beobachtet.

Wie aus Abbildung 4-28 hervorgeht, ist tatsächlich die Gleichgewichtsbeladung für diese Antikörperkonzentration für das Isopropylderivat etwa doppelt so hoch wie für das Adamantylmethylderivat. Da der Antikörper über zwei Bindungsstellen an die Oberfläche binden kann, kann aus den Gleichgewichtsbeladungen aufgrund dieser Avidität keine Affinitätskonstante bestimmt werden.

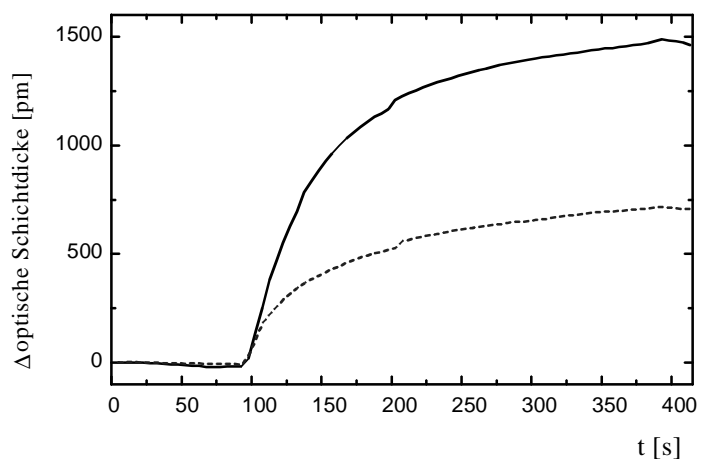


Abbildung 4-28 Injektion von 5  $\mu\text{g/ml}$  monoklonaler anti-Atrazin-Antikörper K4E7. Durchgezogen: Bindung an das Isopropylderivat, gestrichelt: an das Adamantylmethylderivat

Auch der zweite monoklonale Antikörper zeigt unterschiedliche Gleichgewichtsbelegungen für die beiden unterschiedlichen Oberflächen, wie die Bindungskurven in Abbildung 4-29 beweisen.

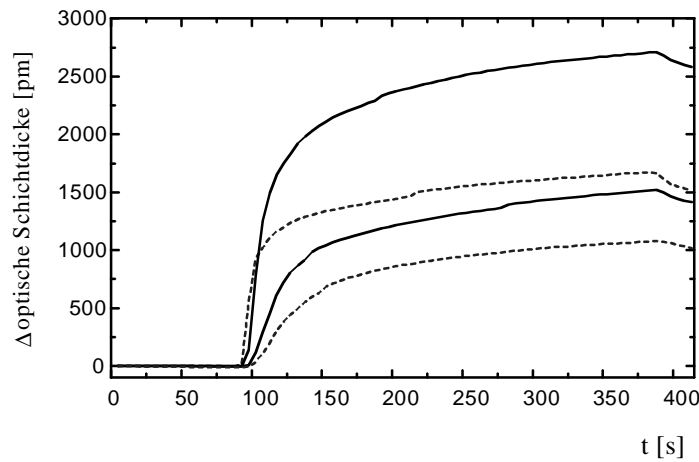


Abbildung 4-29 Injektion von 50 und 10  $\mu\text{g/ml}$  monoklonalem anti-Atrazin-Antikörper K4G2. Durchgezogen: Bindung an das Isopropylderivat, gestrichelt: an das Adamantylmethylderivat.

Offensichtlich diskriminiert dieser gegen das Derivat Atrazincapronsäure gebildete Antikörper deutlich weniger zwischen den beiden Derivaten, als dies für den anti-HA-Antikörper gefunden wurde.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Auch nicht-peptidische Festphasensynthesen können mit RIfS zeitaufgelöst beobachtet werden.
- ⇒ Die Substitution des Isopropylaminrests des Triazins durch einen Adamantylmethylaminrest verändert zwar die Affinitäten der verwendeten monoklonalen Antikörper gegenüber dem immobilisierten Triazin, die Diskriminierung ist jedoch schwächer ausgeprägt, als im Falle des anti-HA-Antikörpers.

#### 4.1.8 Zusammenfassende Diskussion

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß auch kovalente Bindungsvorgänge in organischen Lösungsmitteln mit RIfS verfolgt werden können. Der höhere Brechungsindex der meisten organische Lösungsmittel führt zu einer geringeren Modulationstiefe des RIfS-Signals und damit zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Für die eigentliche Beobachtung limitierend sind allerdings eher Driften und zusätzliche Signal-

Instabilitäten aufgrund von Druck- und Quelleffekten der Meßzellendichtung. Durch Kupplung verschiedener Fmoc-geschützter Aminosäuren konnte gezeigt werden, daß sowohl Bindung als auch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe beobachtet werden können. Eine Quantifizierung der gebundenen Stoffmengen nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe ist für kleinere Aminosäuren, bedingt durch die Unsicherheit im Meßsignal, nicht möglich.

Durch die Synthese des HA-Peptids konnte gezeigt werden, daß auch mehrere Kupplungsschritte nacheinander erfolgreich durchgeführt und beobachtet werden können. Auch die Abspaltung der Seitengruppen mit Trifluoressigsäure läßt sich im System online verfolgen, allerdings überlagert von einem Effekt, der vermutlich auf das Quellen der Dichtungen zurückzuführen ist. Mit einem hochaffinen Antikörper gegen das HA-Peptid konnte der Syntheserfolg nachgewiesen werden.

Aufgrund der sehr geringen Stoffmengen auf den Transduceroberflächen, ist eine Referenzanalytik relativ schwierig. Mit spektraler Ellipsometrie wurden auf einem Wafer synthetisierte HA-Peptid-Schichten mit und ohne Seitenschutzgruppen untersucht. Aus dem Unterschied ließ sich ein relativer Anteil der Seitenschutzgruppen von 21% ermitteln. Mit RIfS wurde mit einer Oberfläche, auf der die Bindungstellenzahlen durch dreifache Kupplung von zweifach mit Fmoc-geschütztem Lysin deutlich erhöht wurde, ein Anteil von 13-19% erhalten, eine Abschätzung aus den relativen Massen ergibt einen Wert von 18%.

Mit dem Triazinsystem konnte gezeigt werden, daß auch nicht-peptidische Festphasensynthesen sich verfolgen lassen. Die Signifikanz hängt auch hier von den Änderungen an der Oberfläche hinsichtlich der Menge an polarisierbarer Substanz ab. Reine Umlagerungen oder Umsetzungen mit geringen Änderungen, wie z. B. Hydrierungen, dürften keine oder kaum detektierbare Signale ergeben.

## 4.2 Biospezifische Detektion in der HPLC mit RIfS

In Kapitel 2.4.2 wurden verschiedene Ansätze zur Kopplung von Bioassays mit Flüssigkeits-Chromatographie beschrieben. Die Kopplung von markierungsfreien, Transducer basierten Bioassays mit Flüssigkeits-Chromatographie wurde in der Literatur bisher nur für Proteine gezeigt. Im folgenden werden Arbeiten beschrieben, in denen erstmals die Kopplung von HPLC mit einem markierungsfreien Detektionsverfahren zur biospezifischen Detektion niedermolekularer Verbindungen realisiert wurde. Da Substanzen mit niedrigen Molmassen bei der Detektion mit markierungsfreien Methoden kleine Signale ergeben, werden diese meist in Format des sogenannten Bindungshemmtest nachgewiesen. Dazu wird die Probe mit der Lösung eines entsprechenden Rezeptormoleküls (Antikörper, Enzym, etc.) vorinkubiert und die Konzentration an freiem Rezeptor, die direkt mit der Konzentration an Analyt verbunden ist, bestimmt. Da die Rezeptoren in der Regel große Molmassen aufweisen, sind die detektierten Signale so groß, daß sie problemlos detektiert werden können. Die Nachweisgrenzen für die eigentlichen Analyten hängen dabei neben der Nachweisgrenze für den Rezeptor auch von der Affinität ab. In den häufig verwendeten Immunoassays werden die hohen Affinitätskonstanten von Antikörpern von  $10^6$ - $10^{10}$  l/mol ausgenutzt, um Nachweisgrenzen kleiner Nanogramm/l zu erreichen, ohne die Proben vorbehandeln zu müssen.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Kopplung HPLC-RIfS zur biospezifischen Detektion beschrieben. Als Modellsystem wurden hochkreuzreaktive anti-Isoproturon Antikörper verwendet, um spezifisch Dimethylphenylharnstoffderivate zu detektieren. Die Antikörper wurden zunächst hinsichtlich ihrer Affinitäten zu Isoproturon-Derivaten charakterisiert. Da die bei der Reversed-Phase HPLC verwendeten Eluenten die Affinitäten beeinflussen, wurden diese Einflüsse untersucht. Im Kapitel 4.2.3 wird dann die eigentliche Kopplung HPLC-RIfS beschrieben.

### 4.2.1 Charakterisierung der hochkreuzreaktiven anti-Isoproturon Antikörper

Das Pestizid Isoproturon ist vom Dimethylphenylharnstoffs abgeleitet. Weitere Derivate, die ebenfalls als Pestizide eingesetzt werden, sind in Abbildung 4-30 gezeigt. Gemeinsames Strukturelement dieser Derivate ist die Dimethylphenylharnstoffgruppierung, die am Phenylring und teilweise durch Substituierung einer Methylgruppe variiert wird. Um Antikörper zu erzeugen, die eine möglichst hohe Kreuzreaktivität gegenüber diesen Derivaten aufweisen, wurde das in Abbildung 4-31 gezeigte und an BSA gekuppelt Derivat als Immunogen bei



zwei Kaninchen verwendet. Durch die Bindung über die Carboxygruppe am Phenylring sollten die gebildeten Antikörper möglichst spezifisch die Dimethylphenylharnstoffgruppierung erkennen und damit die in Abbildung 4-30 abgebildeten Pestizide binden.

Dieses Derivat wurde auch zur Modifikation der Aminodextranoberfläche der in allen im folgenden verwendeten RfS-Transducerchips verwendet.

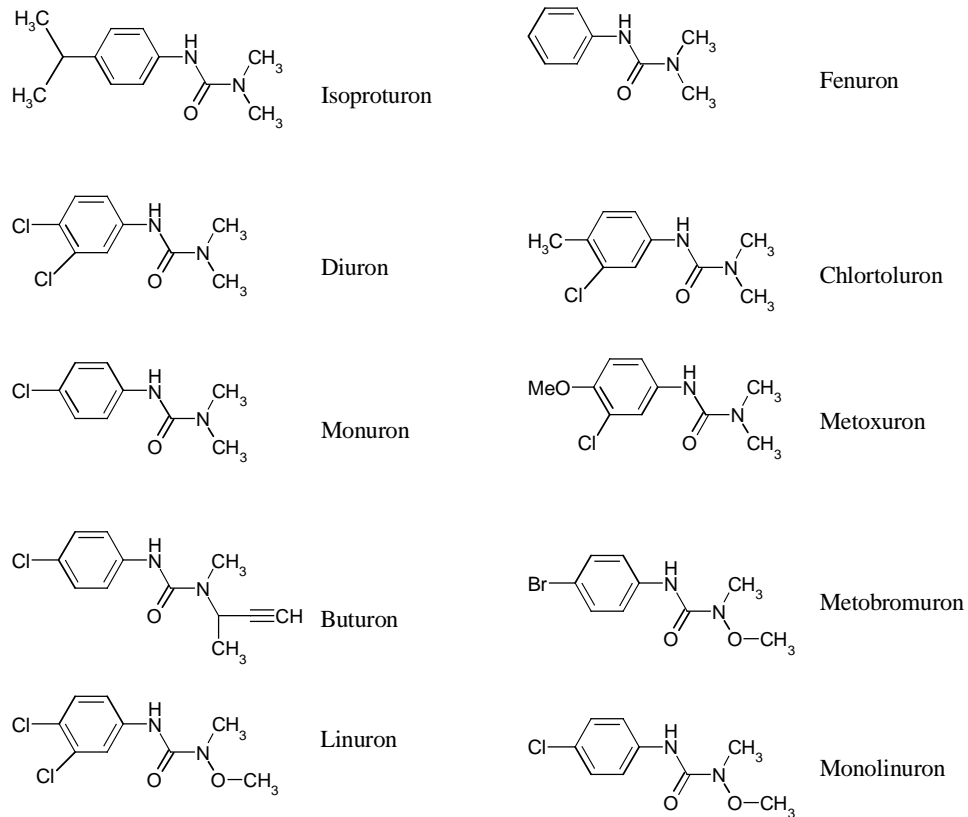


Abbildung 4-30 Isoproturon und Derivate, deren Affinität zu den polyklonalen IP/N-Antikörpern untersucht wurden.

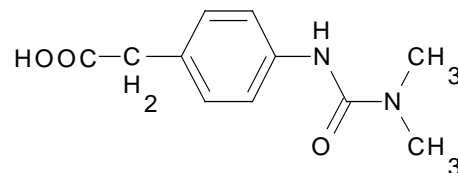


Abbildung 4-31 Strukturen des als Haptent verwendeten Derivates.

Zunächst wurde nach dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Verfahren die Konzentration an aktivem Antikörper für die aus dem Serum der Kaninchen gewonnenen IgG-Fractionen bestimmt. Es ergab sich aus dem Titrationsassay für den monoklonalen Antikörper eine

Empfindlichkeit von  $4,4 \cdot 10^{-3}$  (pm·ml)/(s·ng). Damit ergaben sich für die in den folgenden Arbeiten eingesetzte Antikörperfraktion von Kaninchen R ein Anteil von 37% an aktivem Antikörper, für die verwendete Fraktion von Kaninchen C ein Anteil von 27%.

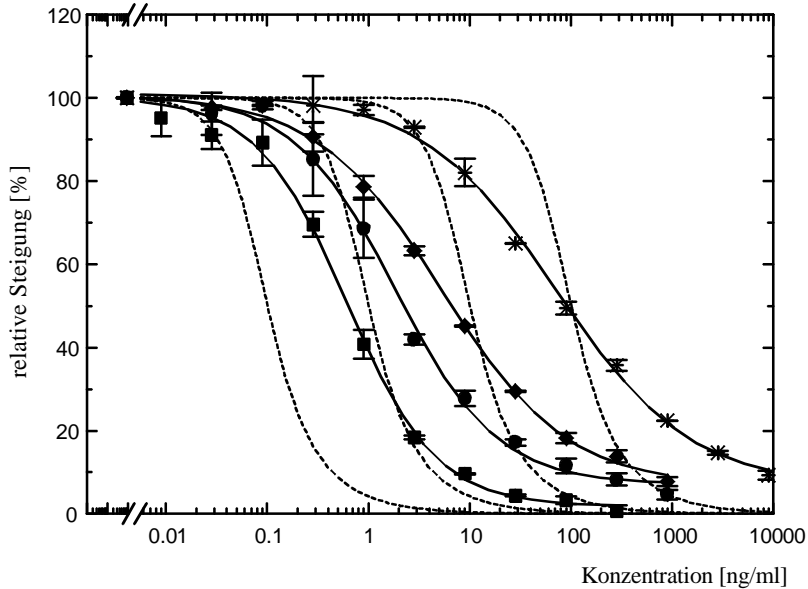


Abbildung 4-32 Titrationskurven für vier Pestizide, 280 ng/ml Antikörper von Kaninchen R. ■: Isoproturon; ●: Monuron; ◆: Fenuron; \*: Monolinuron,  $n = 2$ . Gestrichelt: Berechnete Titrationskurven für monoklonale Antikörper, von links nach rechts: Affinitätskonstanten  $K$  [l/mol] =  $10^{10}$ ;  $10^9$ ;  $10^8$ ;  $10^7$ .

Die Affinitäten der Antikörper gegen die in Abbildung 4-30 angegebenen Pestizide wurde durch Affinitätstitration (vgl. 3.2.3) bestimmt. In Abbildung 4-32 sind beispielhaft die Titrationskurven für die 4 Substanzen Isoproturon, Monuron, Fenuron und Monolinuron gezeigt. An die Meßwerte wurden die logistische Funktion Gl. (29) angepaßt. Zum Vergleich sind Titrationskurven für monoklonale Antikörper für die gleiche Antikörperkonzentration und eine Molmasse von 200 g des Antigens gezeigt.

Man erkennt in der Abbildung, daß die Steigungen, d. h. die Konzentrationen an bindungsfähigen Antikörpern, für die polyklonalen Antikörper deutlich weniger steil abfallen als für die monoklonalen. Verwendet man die Antikörper für analytische Zwecke, so bedeutet dies, daß im Falle der monoklonalen Antikörper ein dynamischer Bereich von einer Größenordnung zur Verfügung steht, während man mit den anti-Isoproturon-Antikörper je nach Analyt zwei bis drei Größenordnungen an Antigenkonzentration detektieren kann. Diesem größeren dynamischen Bereich steht allerdings eine geringere Präzision der

Messungen gegenüber, da die Empfindlichkeit geringer ist, als im Falle der monoklonalen Antikörper.

Da polyklonale Antikörper eine Verteilung der Affinitäten aufweisen, läßt sich nicht eine diskrete Affinitätskonstante bestimmen. Mit Gleichung (23) kann jedoch bei bekannter Antikörperkonzentration aus dem Testmittelpunkt eine mittlere Affinitätskonstante bestimmt werden, die einen Vergleich mit monoklonalen Spezies erlaubt.

Aus Abbildung 4-32 läßt sich weiter entnehmen, daß für das Antigen mit den höchsten Affinitäten, Isoproturon, praktisch kein Offset (Restbindung auch für hohe Antigenkonzentrationen) existiert, während sich für Monuron, Fenuron und Monolinuron ein Offset von 7% ergibt. Für einen solchen Offset gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum einen können in der Antikörpergesamtpopulation Spezies vorhanden sein, die zwar an das immobilisierte Isoproturonderivat nicht aber an den Analyten in der Lösung binden. Zweitens wird ein Offset bedingt durch das Detektionsverfahren auftreten, wenn die Dissoziationsratenkonstante des Antikörper-Antigen-Komplexes so groß ist, daß ein nennenswerter Anteil des Komplexes in der oberflächennahen Schicht dissoziiert, an die Oberfläche bindet und damit einen größeren Anteil an freiem Antikörper in der Lösung vortäuscht.

In Tabelle 4-3 sind die Testmittelpunkte  $x_0$ , die mittleren Affinitätskonstanten  $K$ , die Offsets  $A_0$  und der Exponent  $p$  für die Titrationsen von 280 ng Antikörper von Kaninchen R angeben.

Die mittleren Affinitätskonstanten verteilen sich für die verschiedenen Derivate auf einen Bereich zwischen fast  $10^{10}$  l/mol und weniger als  $10^7$  l/mol. Insbesondere die Affinität gegen Isoproturon zeigt einen für Hapten-Antikörper relativ hohen Wert, die Affinitätskonstanten gegen die nächsten beiden Derivate sind auch noch dem hochaffinen Bereich zuzuordnen. Die Offsets der ersten sechs Substanzen liegen noch deutlich unter 10%, d. h. für diese Antigene spielen nichtbindende Spezies in der Antikörpergesamtpopulation keine Rolle. Wie die Werte für die nächsten drei Substanzen zeigen, ist jedoch kein einfacher Zusammenhang zwischen Affinität und Anteil nichtbindender Spezies gegeben. So zeigt Linuron eine Affinitätskonstante von  $2 \cdot 10^7$  l/mol, und einen Offset von 23%, während bei Metobromuron und Monolinuron die Affinitäten zwar niedriger sind als bei Linuron, gleichzeitig jedoch niedrigere Offsets aufweisen. Buturon schließlich zeigt einen Offset von über 50%, was auf einen erheblichen Anteil nichtbindender Spezies und/oder hohe Dissoziationsratenkonstanten hinweist. Die Exponenten  $p$ , die proportional der Steigung im Testmittelpunkt sind, sind gleichzeitig ein Maß für die Breite des dynamischen Bereichs. Sie nehmen für die hochaffinen Anti-

gene Werte im Bereich von 0,9 - 1 an und sinken auf 0,7 für die Substanzen mit niedrigerer Affinität ab.

*Tabelle 4-3 Testmittelpunkte  $x_0$ , mittlere Affinitätskonstanten  $K$ , Offsets  $A_0$  und Exponent  $p$  für Antikörper von Kanichen R und 10 Isoproturonderivate.*

Substanz	$x_0$ [ng/ml]	$K$ [l/mol]	Offset $A_0$	Exponent $p$
Isoproturon	0.6±0.04	9.0E9	1.8±1.4	1.0±0.1
Diuron	0.9±0.10	2.0E9	3.1±1.8	0.9±0.1
Chlortoluron	1.2±0.10	8.0E8	3.5±1.6	0.8±0.1
Metoxuron	2.4±0.30	3.1E8	4.9±1.9	1.0±0.1
Monuron	2.1±0.20	3.0E8	7.3±1.5	0.9±0.1
Fenuron	5.4±0.40	8.0E7	7.1±1.4	0.7±0.1
Linuron	23.3±4.60	2.7E7	24.1±3.2	0.9±0.1
Buturon	43.4±26.30	1.3E7	62.8±4.3	0.7±0.2
Metobromuron	48.7±8.00	1.3E7	9.9±2.7	0.7±0.1
Monolinuron	81.0±15.30	6.4E6	7.2±3.4	0.7±0.1

Interessant ist der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen, die mit Antikörpern von Kaninchen C erhalten wurden (Tabelle 4-4).

*Tabelle 4-4 Testmittelpunkte  $x_0$ , mittlere Affinitätskonstanten  $K$ , Offsets  $A_0$  und Exponent  $p$  für Antikörper von Kanichen C und 10 Isoproturonderivate.*

Substanz	$x_0$ [ng/ml]	$K$ [l/mol]	Offset $A_0$	Exponent $p$
Isoproturon	0.6±0.0	4.9E9	5.5±0.9	1.05±0.05
Diuron	49.1±14.2	1.2E7	3.7±7.2	0.75±0.10
Chlortoluron	130.1±16.8	4E6	1.0±2.5	0.61±0.03
Metoxuron	307.3±63.9	1.8E6	2.7±4.9	0.74±0.07
Monuron	6.4±0.5	8.2E7	-0.1±1.5	0.74±0.03
Fenuron	5.3±0.8	8.2E7	4.8±2.9	0.72±0.06
Linuron	2202.1±861.3	2.7E5	1.8±9.2	0.62±0.08
Buturon	51.5±3.8	1.1E7	23.0±1.1	0.73±0.03
Metobromuron	38.1±5.0	1.7E7	4.0±2.8	0.85±0.07

Monolinuron	101.6±11.7	5.1E6	4.2±2.4	0.83±0.06
-------------	------------	-------	---------	-----------

Für die Hälfte aller Derivate (Isoproturon, Fenuron, Metobromuron, Buturon und Monolinuron) wurden sehr ähnliche Affinitätskonstanten bestimmt, während für Monuron dieser Wert für die Antikörper von Kaninchen C um eine halbe Größenordnung niedriger, bei den restlichen vier Pestiziden sogar um ca. zwei Größenordnungen (Abbildung 4-33) war.

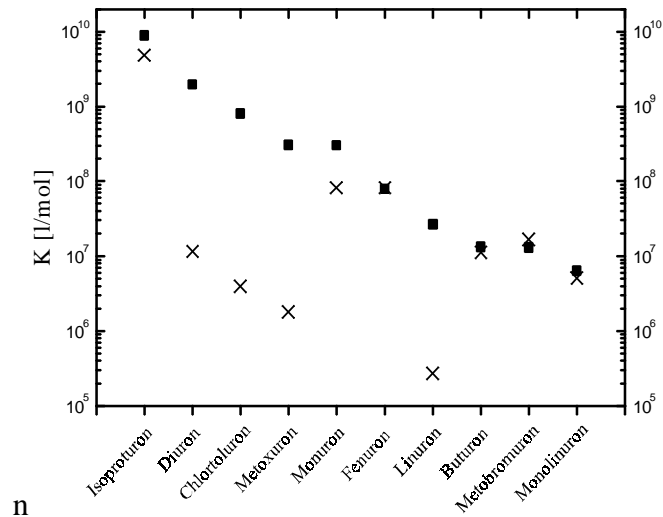


Abbildung 4-33 Affinitätskonstanten für die Antikörper von ● Kaninchen R und × Kaninchen C.

Zur Erklärung für dieses Verhalten können die Strukturen der Substanzen herangezogen werden (Abbildung 4-31). Die Antikörper von Kaninchen R zeigen die höchste Affinitäten zu den Substanzen, bei denen die Dimethylphenylharnstoffgruppe nur am Phenylring substituiert wurde, die Affinitäten sind hier über zwei Größenordnung relativ fein abgestuft verteilt. Die Substitution einer Methylgruppe führt zu deutlich niedrigeren Affinitäten. Im Gegensatz hierzu lassen sich für die Antikörper von Kaninchen C die Affinitäten nicht so leicht mit den Strukturen korrelieren. Diese Antikörper zeigen eine relativ hohe Affinität nur gegenüber Isoproturon.

#### Schlußfolgerungen

⇒ Die beabsichtigte hohe Kreuzreaktivität gegenüber der Dimethylphenylgruppierung wurde im Falle der Antikörper von Kaninchen R tatsächlich erreicht, während die Antikörper von Kaninchen C zwar gegenüber der Substanz mit hoher struktureller Ähnlichkeit zum Immunogen eine hohe Affinität aufweisen, aber alle anderen Derivate deutlich schlechter erkennen.

⇒ *Dementsprechend wurde für die Kopplung mit der HPLC die Antikörper von Kaninchen R verwendet.*

#### 4.2.2 Einfluß von Methanol auf die Affinitäten

Die Affinitäten von Rezeptor-Ligand-Systemen werden durch den Zusatz von organischen Lösungsmitteln beeinflusst, wobei die Effekte sowohl vom Lösungsmittel, als auch vom biochemischen System abhängen. Generell läßt sich feststellen, daß Acetonitril die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen deutlich stärker beeinflusst als Methanol.

*Tabelle 4-5 Affinitätskonstanten  $K$  [l/mol] von Antikörper von Kaninchen R unter Variation des Methanolgehaltes.*

	reines PBS	PBS mit 5% Methanol	PBS mit 10% Methanol
Isoproturon	9.0E9	5.4E8	1.4E8
Monuron	5.2E8	1E8	4.3E7
Fenuron	8.0E7	3.1E7	1.3E7
Monolinuron	7.2E6	2.9E6	1.3E6

Da für die Trennung der Isoproturonderivate Methanol als Modifier eingesetzt wurde, wurde der Einfluß auf die Affinitäten für die vier Pestizide, die für die Versuche zur Kopplung HPLC-RIfS eingesetzt wurden (4.2.4), durch Affinitätstitration untersucht. Dazu wurde zu den Lösungen 0, 5 und 10% Methanol gegeben. In Tabelle 4-5 sind die Affinitätskonstanten für die vier Derivate in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration angegeben. Zunächst fällt auf, daß das für hochaffine System-Antikörper-Isoproturon die Affinitätskonstante am stärksten durch den Modifier beeinflusst wird. Allerdings läßt sich diese Tatsache dadurch erklären, daß der Nenner in Gleichung (23) in dem Fall stark durch eine Änderung des Testmittelpunkts (in Gl. (23)  $c_{0,L}$ ) beeinflusst wird, wenn  $c_{0,L}$  und  $c_{0,R}$  die gleiche Größenordnung besitzen. Dies ist der Fall für das hochaffine System ( $c_{0,L} = 9 \text{ nM}$ ;  $c_{0,R} = 1.9 \text{ nM}$ ).

Daher ist es hier zweckmäßiger, den Einfluß des Modifiers durch Testmittelpunkte zu charakterisieren, die angeben, wie sich der analytisch zugängliche Konzentrationsbereich ändert (Tabelle 4-6). 5% Methanol verschiebt die Testmittelpunkte um ungefähr den Faktor zwei zu höheren Antigenkonzentrationen. Ein Gehalt von 10% bewirkt schon eine Verschiebung um mehr als eine halbe Größenordnung.

Tabelle 4-6 Testmittelpunkte für die Titration von 280 ng/ml Antikörper von Kaninchen R unter Variation des Methanolgehaltes.

	reines PBS	PBS mit 5% Methanol	PBS mit 10% Methanol
Isoproturon	0.7±0.1	1.5±0.2	4.4±0.7
Monuron	2.1±0.2	5.8±0.7	13.1±1.3
Fenuron	5.4±0.4	13.1±1.3	30.1±2.3
Monolinuron	72.9±7.5	181.5±30.6	410.0±49.9

Damit sind die verwendeten Antikörper im Vergleich zu Ergebnissen aus anderen Arbeiten relativ empfindlich gegenüber der Anwesenheit von Methanol. So wurde bei Titrationsassays eines polyklonalen anti-Östron-Antikörpers für die Affinität gegenüber Östron bei Methanolanteilen von 10% und 20% keine Änderungen gegenüber Messungen in reinem Puffer ermittelt. Oosterkamp et al. (1994b) fanden für polyklonale anti-Digoxigenin Antikörper-Fab Fragmente, daß 30% Methanol und 10% Acetonitril praktisch keinen Verlust an Affinität bewirkten. Kröger et al. (1998) untersuchten monoklonale anti-2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Antikörper und fanden Spezies, die 30% Methanol tolerierten. Skladal (1999) beschrieb einen monoklonalen anti-Atrazin-Antikörper, der sogar bei 10% Methanol eine höhere Affinität aufwies als in reinem Puffer und noch in 50% Methanol deutliche Bindungsfähigkeit gegenüber Atrazin zeigte.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Der Einfluß des Elutionsmittels auf die verwendeten Antikörper läßt sich durch Titrationsassays einfach und genau bestimmen
- ⇒ Die verwendeten Antikörper sind im Vergleich zu Ergebnissen aus anderen Arbeiten relativ empfindlich gegenüber der Anwesenheit von Methanol.
- ⇒ Bei der im folgenden beschriebenen RI/S-HPLC Kopplung wurde dies berücksichtigt und der Methanolgehalt durch die Verdünnung des Eluats mit Antikörperlösung deutlich reduziert.

### 4.2.3 Kopplung von HPLC mit RIfS

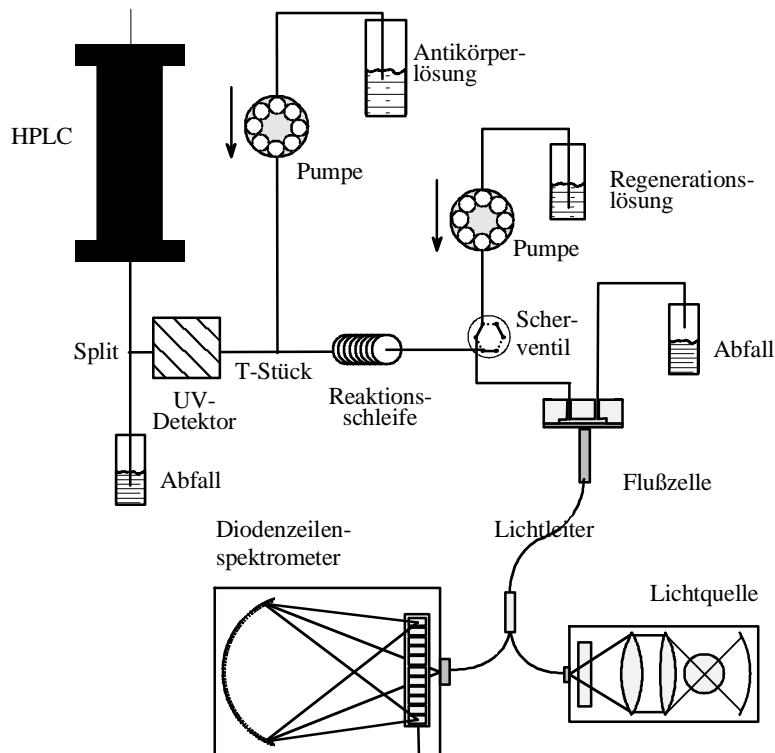


Abbildung 4-34 Aufbau zur HPLC-RIfS-Kopplung

Die Kopplung wurde mit dem in Abbildung 4-34 schematisch gezeigten Aufbau realisiert. Das Eluat aus der HPLC-Säule wurde zunächst durch einen Split im Verhältnis 1:4 geteilt und dann durch ein T-Stück mit der Antikörperlösung vermischt. Durch die Wahl der Flußraten von HPLC-Pumpe und Antikörperpumpe konnte die Konzentration an Methanol in der Lösung eingestellt werden. Als Eluent wurde 37% wäßrige Methanollösung verwendet. Der 20%-Eluatanteil nach dem Split mit einer Flußrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurde mit der Antikörperlösung, die mit 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  gepumpt wurde, vermischt, womit der Methanolgehalt der Eluat-Antikörpermischung auf 7,4% reduziert wurde. Anschließend floß die Mischung durch eine 150  $\mu\text{l}$  Reaktionsschleife (Reaktionszeit 36 s) und schließlich durch die RIfS-Meßzelle, die in den Standard-RIfS-Aufbau integriert war. Durch ein Injektionsventil direkt vor der Meßzelle konnte der Fluß auf Regenerationslösungen umgeschaltet werden, um die Transduceroberfläche zu regenerieren. Für Referenzmessungen wurde zusätzlich ein UV-Detektor (254 nm) in das System integriert.

In Abbildung 4-35 ist die RIfS-Bindungskurve einer gekoppelten HPLC-Trennung gezeigt. 2  $\mu\text{l}$  einer 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fenuronlösung in 37% Methanol wurden auf die Säule gegeben. Die Bindungskurve wurde auf den Injektionszeitpunkt normiert. Zunächst steigt die optische



Schichtdicke durch die massentransportlimitierte Bindung der Antikörper linear an, bis bei ca. 190 s die Bindungsrate abnimmt, da ein Teil der Antikörper durch das eluierte Fenuron inhibiert wird. Bei ca. 280 s hat der Fenuronpeak die Meßzelle passiert, daher erreicht die Steigung der Bindungskurve wieder den gleichen Wert, wie zu Beginn der Messung. Die gestrichelte Linie zeigt den Kurvenverlauf für eine Messung ohne Substanzen, die vom Antikörper erkannt werden. Das parallel aufgezeichnete UV-Chromatogramm ist gepunktet abgebildet. Da sich der UV-Detektor vor T-Stück, Reaktionschleife und Meßzelle befindet, erscheint der Fenuronpeak hier von 145 s bis 220 s.

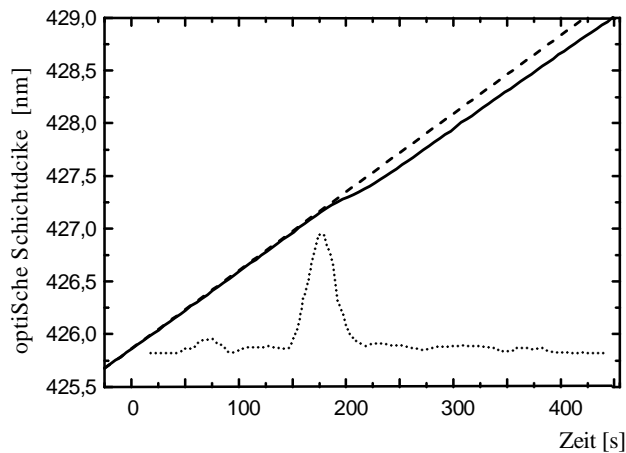


Abbildung 4-35 RI/S-Bindungskurve, gemessen bei Injektion von 3  $\mu\text{g/ml}$  Fenuron. Gestrichelt: Verlängerung der Anfangssteigung, gepunktet: UV Chromatogramm bei 254 nm, willkürliche Einheiten.

Die aufgrund der teilweisen Inhibierung der Antikörper reduzierte Bindungsrate wird noch deutlicher, wenn man die erste Ableitung (Abbildung 4-36) der Bindungskurve betrachtet, die der Steigung der Bindungskurve entspricht und damit proportional der Konzentration an freien Antikörpern ist.

Um den Einfluß des Rauschens in der Bindungskurve zu reduzieren, wurde die Ableitung mittels eines Savitzky-Golay-Algorithmus gebildet (Savitzky und Golay, 1994). Diese Methode wird häufig zur Glättung verrauschter Meßwerte verwendet. Durch lokale Kurvenanpassung an ein Polynom n-ten Grades erhält man dabei nicht nur geglättete Kurvenverläufe sondern gleichzeitig die ersten n Ableitungen. Entscheidend für das Maß der Glättung ist zum einen die Fenstergröße, d. h. die Anzahl an Werten, die für die Anpassung verwendet werden, und zum anderen der Grad des Polynoms. Zur Bildung der Ableitung in Abbildung 4-36 wurde ein Polynom 2. Grades und eine Fenstergröße von 9 Punkten, entsprechend 45 s, gewählt (s. u.).

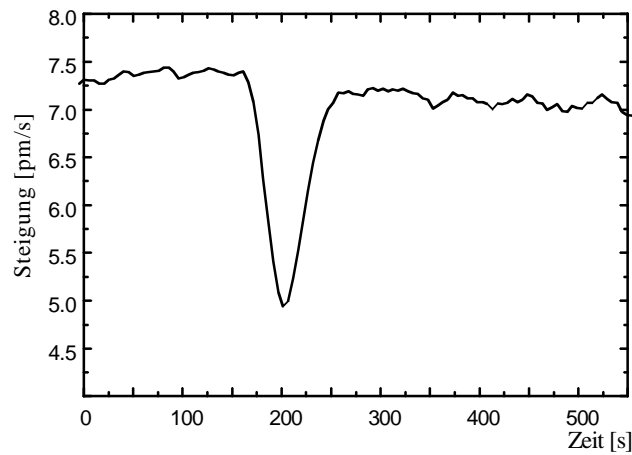


Abbildung 4-36 Ableitung der Bindungskurve in Abbildung 4-35.

Die erste Ableitung in Abbildung 4-36 beginnt mit einem Wert von 7,3 pm/s, der Steigung zu Beginn der Bindungskurve in Abbildung 4-35. Ab 165 s nimmt die Steigung ab und erreicht den Minimalwert von 4,95 pm/s bei 200 s. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fenuronkonzentration in der Mischung maximal.

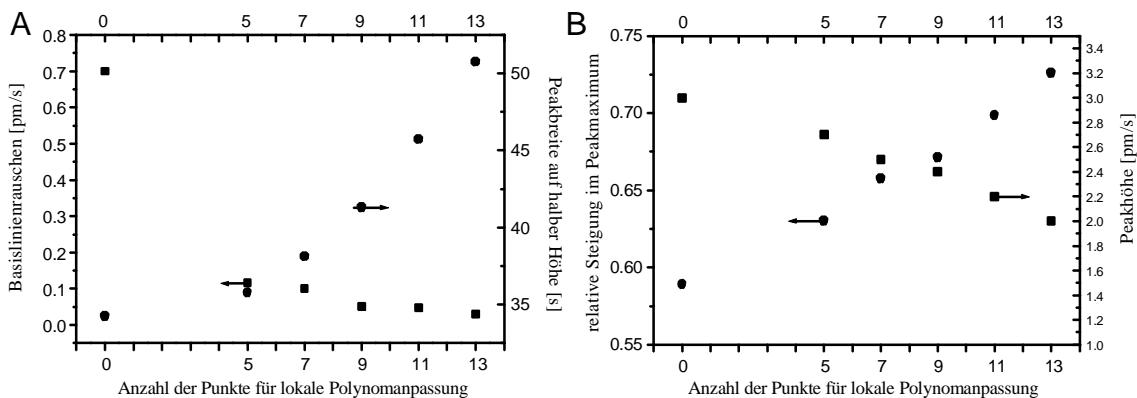


Abbildung 4-37 Abhängigkeit der Peakeigenschaften von der Anzahl der Punkte für die Savitzky-Golay Kurvenanpassung A: ■ Baslinienrauschen und ● Peakbreite. B: ● relative Steigung im Peakmaximum und ■ Peakhöhe.

Der Anteil an freien Antikörperbindungsstellen kann aus dem Verhältnis der Steigungen im Peakmaximum zur Basislinie, d. h. der ungestörten Bindungskurve, bestimmt werden:  $(4,95 \text{ pm/s}) / (7,3 \text{ pm/s}) = 67,8\%$ . Allerdings muß hier berücksichtigt werden, daß der Glättungsalgorithmus, der zum Differenzieren verwendet wurde, abhängig vom Grad der Glättung sowohl den Peak verbreitert als auch die Peakhöhe reduziert. Diese Effekte sind in Abbildung 4-37 für die ungeglättete Ableitung und für die Savitzky-Golay-Glättung mit 5, 7, 9, 11 und 13 Punkten dargestellt. Das Basislinienrauschen der Ableitung für die ungeglättete Ableitung

beträgt 0,7 pm/s und wird je nach Grad der Glättung bis auf 0,03 pm/s reduziert. Abbildung 4-37 B zeigt die Auswirkungen der Glättung auf die Peakhöhe, die (rechte Ordinate) fast linear von 3,2 pm/s auf 2,0 pm/s abnimmt.

Gleichzeitig nimmt die Steigung bezogen auf die Basislinie des Chromatogramms, d. h. der ungestörten Bindungskurve, von 0,59 auf 0,72 zu. Da dieser Wert proportional der Konzentration an freiem Antikörper ist, bedeutet dies, daß der Anteil an inhibierten Antikörpern im Peakmaximum aufgrund der Glättung scheinbar von 41% (nicht geglättet) auf 28% (13 Punkte) sinkt.

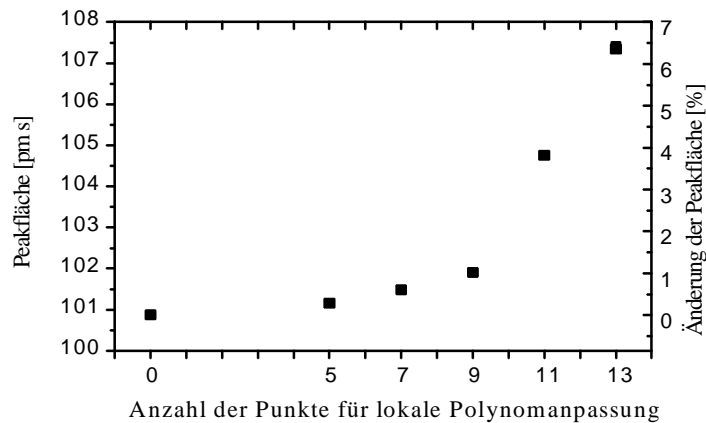


Abbildung 4-38 Abhängigkeit der Peakfläche von der Anzahl der Punkte für die Savitzky-Golay Kurvenanpassung.

Zur quantitativen Auswertung von Chromatogrammen kann auch die Peakfläche einbezogen werden, daher wurde der Einfluß des Savitzky-Golay-Algorithmus auf die Peakfläche untersucht. Da wie beschrieben mit zunehmender Glättung die Peakhöhe ab-, gleichzeitig aber die Peakbreite zunimmt, sollten die Effekte der Savitzky-Golay-Methode auf die Peakflächen kleiner sein, als auf die Peakhöhen. Wie Abbildung 4-38 zeigt, ist dies tatsächlich der Fall. Die Peakfläche nimmt im Vergleich zur ungeglätteten Ableitung um bis zu 6,4% zu, wobei bis zur Einbeziehung von neun Punkten die Peakfläche lediglich um 1% zunimmt.

Wie im Kapitel 2.4 beschrieben wurde, trägt jeder Detektor zur Bandenverbreiterung bei. Diese ist abhängig vom Detektorvolumen einschließlich der Verbindung mit dem Auslaß der Säule. Für die beschriebene HPLC-RI/S-Kopplung führen daher das T-Stück, die Reaktionsschleife und die Flußzelle zur Bandenverbreiterung, sowie zusätzlich der Glättungsalgorithmus.

In Abbildung 4-39 ist diese zusätzliche Peakverbreiterung in Abhängigkeit vom Grad der Glättung gezeigt. Diese Werte müssen mit den Peaks im UV-Detektor verglichen werden.

Hier beträgt der Term  $\sigma^2$ , der die Peakbreite von der HPLC und die zusätzliche Verbreiterung durch die UV-Zelle enthält,  $156 \text{ s}^2$ . Der Glättungsalgorithmus führt also je nach Größe des Fensters für die lokale Polynomannpassung zu einem deutlichen Verlust an Auflösung. Dementsprechend sinkt die theoretische Bodenzahl für den Fenuronpeak von 355 (UV) über 261 (ungeglättet) bis auf 119 (13 Punkte). Dabei muß berücksichtigt werden, daß hier die Peakverbreiterung des UV-Detektors in die Gesamtpeakbreite eingeht, die bei einer direkten Kopplung RIfS-HPLC entfällt.

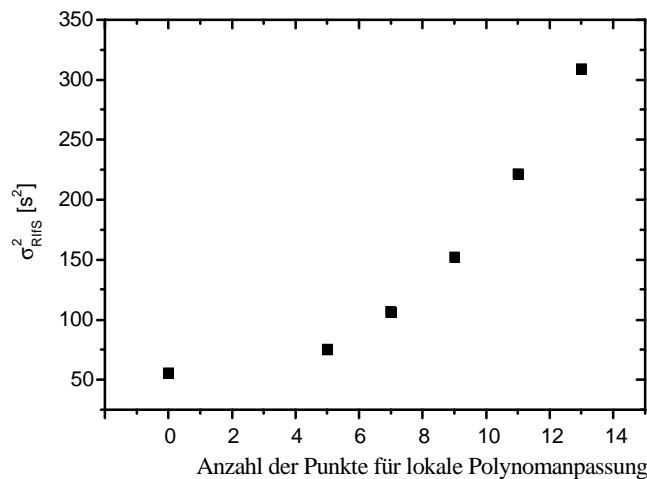


Abbildung 4-39 Peakverbreiterung durch die RIfS-Kopplung gegen Anzahl der Punkte für die Savitzky-Golay Kurvenanpassung.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Injektion der Mischung aus Eluat mit Antikörperlösung über den RIfS-Transducerchip und (partiell) massentransportlimitierten Bedingungen führt zu ansteigenden Bindungskurven, deren Steigung bei Anwesenheit von Antigenen im Eluat aufgrund der geringeren Anzahl bindungsfähiger Antikörper abnimmt.
- ⇒ Durch Ableitung der Bindungskurven („RIfS-Chromatogramm“) werden negative Peaks sichtbar.
- ⇒ Die Anwendung des Savitzky-Golay-Algorithmus zur Differenzierung reduziert das Rauschen der Peaks bei gleichzeitiger Peakverbreiterung.
- ⇒ Für die folgenden Messungen wurde als Kompromiß zwischen Basislinienrauschen und Auflösung ein Savitzky-Golay-Fenster von 9 Punkten (45 s) gewählt.

#### 4.2.4 HPLC-Trennung von Pestiziden mit selektiver Detektion durch RIfS

Aus den 10 untersuchten Isoproturonderivaten wurde 4 Pestizide ausgesucht, die die gesamte Bandbreite der mittleren Affinitätskonstanten der Antikörper von Kaninchen R widerspiegeln.

Die HPLC-Trennung wurde an einer RP2-Phase mit einem Methanolgehalt von 37% realisiert. In Abbildung 4-40 sind die RIfS-Bindungskurve, die geglättete Ableitung und das UV-Chromatogramm gezeigt.

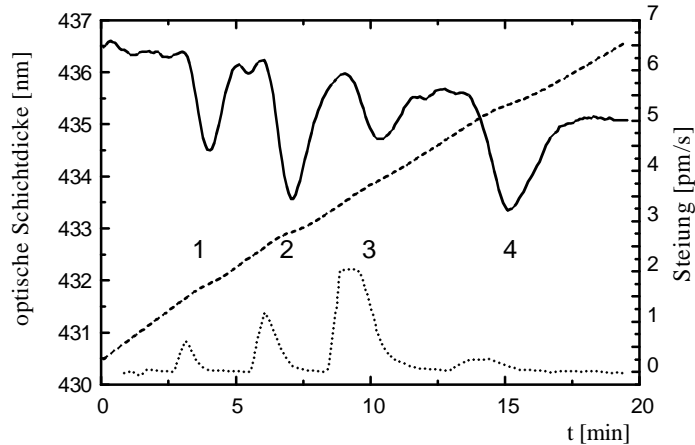


Abbildung 4-40 Bindungskurve (gestrichelt, linke Ordinate) und erste Ableitung (durchgezogen, rechte Ordinate) für die Trennung von 4 Pestiziden: Fenuron  $2 \mu\text{g/ml}$ ; Monuron  $2 \mu\text{g/ml}$ ; Monolinuron  $10 \mu\text{g/ml}$  und Isoproturon  $2 \mu\text{g/ml}$  (von links nach rechts). Gepunktet: UV Chromatogramm bei 254 nm, willkürliche Einheiten.

Die Unterschiede zwischen UV-Chromatogramm und „RIfS“-Chromatogramm zeigen deutlich die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der beiden Detektoren für die vier Substanzen. Während der UV-Detektor für Isoproturon einen sehr kleinen Peak liefert, ist das Signal in der Ableitung der Bindungskurve entsprechend der hohen Affinität der Antikörper zu Isoproturon groß. Das UV-Signal des Monolinuronpeaks hingegen ist größer, als der Dynamikbereich des Detektors, während das RIfS-Signal entsprechend der relativ niedrigen Affinität der Antikörper gegen Monolinuron trotz fünffach höherer Konzentration deutlich kleiner ist, als das der übrigen Pestizide.

Die erste Ableitung in Abbildung 4-40 zeigt zu längeren Retentionszeiten hin eine negative Drift bedingt durch die Abnahme der Bindungsrate der RIfS-Kurve. Dieses Verhalten wird durch eine Abnahme der Bindungsstellendichte auf der Transduceroberfläche bedingt, wodurch die Kinetik der Bindungsreaktion zunehmenden Einfluß gewinnt. Detektiert wird daher eine zunehmende Abweichung von der rein massentransportkontrollierten Bindung, die sich als leichte, aber deutliche Drift im „RIfS-Chromatogramm“ bemerkbar macht, d. h. die Basislinie driftet.

Um die selektive Detektion durch den Antikörper zu überprüfen, wurde eine Mischung aus zwei Substanzen, die durch die Antikörper erkannt werden (Fenuron und Isoproturon) und zwei Substanzen mit völlig anderer Struktur (die Triazine Atrazin und Simazin) injiziert.

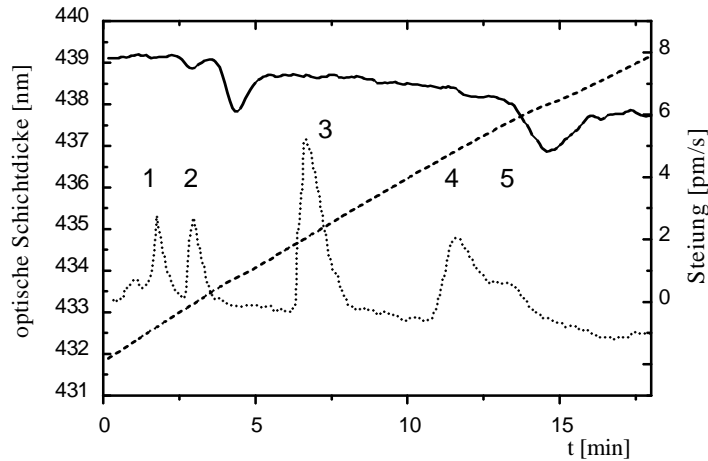


Abbildung 4-41 Bindungskurve (gestrichelt, linke Ordinate) und erste Ableitung (durchgezogen, rechte Ordinate) für die Trennung von 4 Pestiziden: Peaks von links nach rechts: DMF (aus den Stammlösungen), Fenuron 1  $\mu\text{g/ml}$ ; Simazin 10  $\mu\text{g/ml}$ ; Atrazin 10  $\mu\text{g/ml}$  und Isoproturon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (nicht getrennt). Gepunktet: UV Chromatogramm bei 254 nm, willkürliche Einheiten.

In Abbildung 4-41 sind die RfS-Bindungskurve, die geglättete Ableitung und das UV-Chromatogramm dargestellt. In der UV-Spur sind alle Peaks der 4 Substanzen sowie das Solvens DMF der Stammlösungen der Triazine zu erkennen. Die Peaks von Atrazin und Isoproturon überlappen sich deutlich. In der Ableitung der Bindungskurve dagegen sind nur ein kleiner DMF-Peak (vermutlich bedingt durch eine reduzierte Bindungsrate aufgrund des Lösungsmittels), sowie die beiden vom Antikörper erkannten Dimethylphenylharnstoff-derivate zu sehen. Der Isoproturonpeak hat dabei die gleiche Größe, wie in einem Chromatogramm ohne Atrazin.

## Schlußfolgerungen

- ⇒ Die affinitätsabhängige Detektion einer Trennung von 4 Pestiziden wurde gezeigt.
- ⇒ Die Peakgrößen spiegeln bei gleicher Konzentration die unterschiedlichen Affinitäten des Antikörpers gegenüber dem jeweiligen Derivat wider.
- ⇒ Durch die Trennung von je zwei aktiven und inaktiven Substanzen gegenüber dem Antikörper konnte die selektive Detektion gezeigt werden.

## 4.2.5 Quantitative Auswertung der RIfS-Chromatogramme

Wie oben erwähnt, zeigt die Steigung der Bindungskurve für längere Retentionszeiten und damit höheren Beladungen der Oberfläche eine negative Drift. Bei Titrationsassays werden zur Korrektur der Abweichung von einer rein massentransportkontrollierten Bindung die Steigungen der Bindungskurven auf die Steigung von Blanks normiert. Für die Auswertung der RIfS-Chromatogramme wurde eine ähnliche Methode gewählt: Die erste Ableitung wurde mit einer Basislinie normiert, die aus den Abschnitten der Ableitung ohne Peaks durch eine Anpassung eines Polynoms 2. Ordnung erhalten wurde. Um numerisch integrierbare Peaks zu erhalten, wurden die so modifizierten Kurven von eins abgezogen. Damit entsprechen die so errechneten Werte dem Anteil inhibierter Antikörper. Eine vollständige Hemmung würde demnach eine Peakhöhe von eins ergeben.

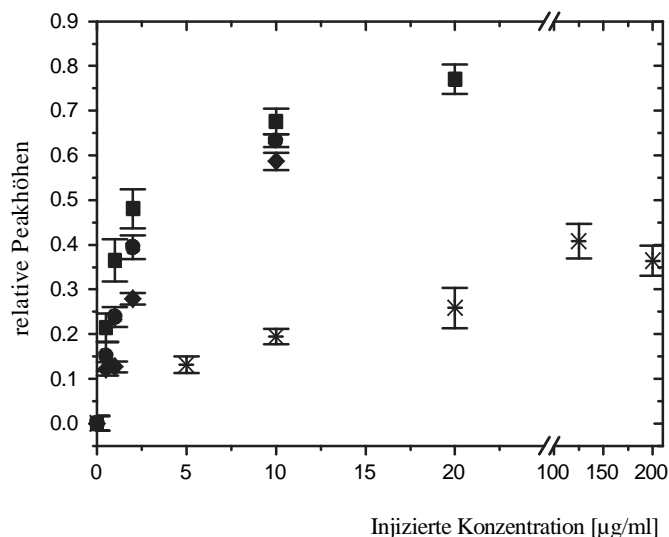


Abbildung 4-42 Peakhöhen in Abhängigkeit von der injizierten Konzentration

■: Isoproturon; ●: Monuron; ◆: Fenuron; \*: Monolinuron,  $n = 3$ .

In Abbildung 4-42 sind die Peakhöhen gegen die injizierten Konzentrationen für die vier Analyte aufgetragen. Dabei werden typische Sättigungsverläufe erhalten, da nur eine bestimmte Menge an Antikörper zur Verfügung steht. Der Verlauf der Kalibrierkurven ist entsprechend den Affinitäten der Antikörper gegenüber den Analyten. Der theoretisch mögliche Wert für die maximale Peakhöhe von eins wird nicht erreicht, da zum einen, wie durch die Affinitätstiteration festgestellt wurde (siehe 4.2.1), auch bei hohen Konzentrationen an inhibierender Substanz für Monuron, Fenuron und Monolinuron, eine residuale Bindung der Antikörper an die Oberfläche zu beobachten ist. Zweitens führt die Glättung zu einer Abnahme der Peakhöhen (siehe 4.2.3). Schließlich ist die Antikörper-Analyt-Mischung beim Erreichen der Meßzelle nicht notwendigerweise im Gleichgewicht.

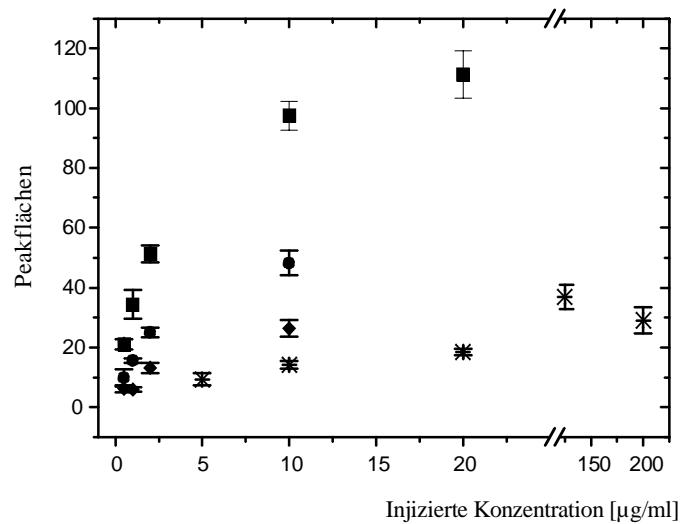


Abbildung 4-43 Peakflächen in Abhängigkeit von der injizierten Konzentration  
 ■: Isoproturon; ●: Monuron; ◆: Fenuron; \*: Monolinuron,  $n = 3$ .

Allerdings ist dieser letzte Punkt kein prinzipielles Problem, da die Flüsse in der HPLC und der FIA sehr reproduzierbar sind und damit auch Nicht-Gleichgewichtszustände zu reproduzierbaren Ergebnissen führen.

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, wirkt sich der Glättungsalgorithmus auf die Peakflächen deutlich geringer aus, da sich die Abnahme der Peakhöhe und die Zunahme der Peakbreite weitgehend kompensieren. In Abbildung 4-43 sind die Empfindlichkeitskurven für die Peakbreiten in Abhängigkeit von der Konzentration der Probenlösung gezeigt. Man erkennt auch hier sowohl den Sättigungsverlauf als auch die Reihenfolge der Affinitäten.



### Nachweisgrenzen

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde aus den linearen Anfangsbereichen der Empfindlichkeitskurven aus Abbildung 4-42 die Empfindlichkeiten ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde aus Messungen von Blanks berechnet, die analog zum oben beschriebenen Vorgehen normalisiert wurden. In Abhängigkeit vom Alter, d. h. von der Anzahl der Regenerationen denen der Transducer ausgesetzt war, wurden für die Standardabweichungen der Basislinie Werte zwischen 0,004 und 0,008 erhalten. Mit dem dreifachen Wert von 0,008 (entsprechend  $3\sigma$ ) wurden die in Tabelle 4-7 angegebenen Nachweisgrenzen erhalten. Zur Berechnung der Nachweisgrenzen in absoluten Stoffmengen wurde das Injektionsvolumen von 2  $\mu\text{l}$  und der Split von 1:4 berücksichtigt.

Tabelle 4-7 Nachweisgrenzen für die 4 Analyte, Details siehe Text.

	Injizierte Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	detektierte Substanzmasse [fmol]
Isoproturon	0.06	75
Monuron	0.09	105
Fenuron	0.12	165
Monolinuron	0.8	930

Die Nachweisgrenzen liegen in der gleichen Größenordnung wie sie in Arbeiten zur Kopplung eines fluoreszenzbasierten Bioassays mit HPLC (Irth *et al.*, 1993) unter Verwendung von anti-Digoxigenin Antikörperfragmenten der Konzentration 1.3 nM bestimmt wurden. Zwar wurde in diesen Arbeiten ein anderes biochemisches System mit anderen Affinitäten verwendet, so daß sich die erhaltenen Nachweisgrenzen nicht direkt vergleichen lassen. Aber der Vergleich zeigt, daß bei der Kopplung von HPLC mit einem RIfS-basierten Bioassay zumindest vergleichbare Nachweisgrenzen wie bei Kopplung mit fluoreszenzbasierten Verfahren möglich sind.

### Schlußfolgerungen

- ⇒ Durch Basislinienkorrektur kann der Einfluß der abnehmenden Bindungsrate aufgrund des zunehmenden Anteils an Reaktionskinetik korrigiert werden.
- ⇒ Sowohl Peakflächen wie auch Peakhöhen zeigen einen Sättigungsverlauf, der durch die begrenzte Antikörpermenge bedingt ist.

- ⇒ Peakflächen und Peakhöhen spiegeln die unterschiedlichen Affinitäten der Derivate gegenüber dem Antikörper wieder.
- ⇒ Die Bestimmung des Rauschens in RI/S-Chromatogrammen und die Auswertung der Peakhöhen erlauben die Berechnung der Nachweisgrenzen.
- ⇒ Ein Vergleich mit Arbeiten mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper zeigen, daß mit dem markierungsfreien Detektionsverfahren vergleichbare Nachweisgrenzen erhalten werden können.

#### 4.2.6 Analyt-Anreicherung mittels Vorsäule

Eine Methode zur Verbesserung der Nachweisgrenzen mit HPLC besteht in der Anreicherung mittels einer Vorsäule. Dabei wird ein größeres Probenvolumen durch die Vorsäule gedrückt, am Füllmaterial dieser Säule werden die Analyte adsorbiert. Anschließend wird adsorbierte Substanz durch eine entsprechende Säulenschaltung durch den Eluenten desorbiert und auf die analytische Säule überführt. Dabei werden alle Analyte, die an der Vorsäule adsorbieren, aus der Probe aufkonzentriert. Dieses Verfahren wurde auch für die HPLC-RI/S-Kopplung eingesetzt. Für die Vorsäule wurde das gleiche Säulenmaterial wie für die der analytischen Säule verwendet, nämlich RP2 (mit Ethylsilan modifiziertes Kieselgel).

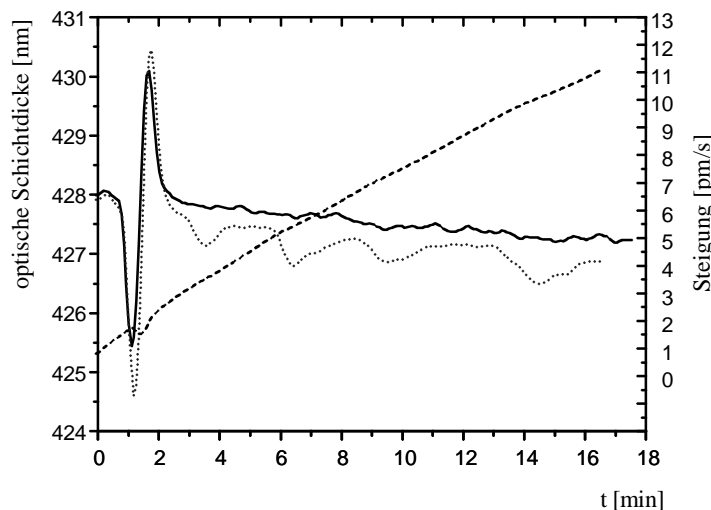


Abbildung 4-44 Bindungskurve (gestrichelt) und RI/S-Chromatogramm eines Blank (durchgezogen) und für die Trennung (gepunktet) mit Vorsäule von Fenuron 5 ng/ml; Monuron 5 ng/ml; Monolinuron 50 ng/ml und Isoproturon 5 ng/ml (von links nach rechts).

In Abbildung 4-44 ist als Beispiel die Aufkonzentrierung und Trennung der 4 Pestizide aus 1 ml Probenvolumen mit Konzentrationen, die mehr als eine Größenordnung unter den Nachweisgrenzen aus Tabelle 4-7 liegen, gezeigt. Der Wasserpeak zwischen 1 und 2 min zeigt zunächst eine negative Steigung der Bindungskurve an. Grund hierfür dürfte das Auftreten eines Brechungsindexeffekts und/oder ein Ansprechen der Dextranmatrix auf die veränderte Zusammensetzung des Eluats sein.

Die Peaks in der Ableitung sind für alle vier Analyte noch deutlich zu erkennen, d. h. im Vergleich zur Trennung ohne Vorsäule werden Konzentrationen, die um den Faktor 12 (Isoproturon) bis Faktor 160 (Monolinuron) unter den Nachweisgrenzen (Tabelle 4-7) der Trennung ohne Aufkonzentrierung liegen, detektiert.

#### *Schlußfolgerung*

⇒ *Durch Analytanreicherung in einer Vorsäule können die erreichten Nachweisgrenzen noch deutlich verbessert werden.*

#### **4.2.7 Limitierende Parameter und Gesamtperformance**

Die Leistungsfähigkeit des gesamten gekoppelten Systems wird durch mehrere Parameter bestimmt. Diese sollen im folgenden in der Reihenfolge ihres Auftretens in Abbildung 4-34 diskutiert werden.

Die erste Komponente ist der Chromatographieteil. Der Einfluß des organischen Modifiers auf die Affinitäten wurde schon im Kapitel 4.2.2 beschrieben. Diese Effekte hängen sowohl vom biologischen System als auch von der Konzentration und Natur des Lösungsmittels ab. Sie können, wie gezeigt, durch eine Affinitätstitration abgeschätzt werden. Dies ermöglicht die Auswahl des günstigsten Modifiers im Hinblick auf Trennung *und* biochemisches System. Die in dieser Arbeit verwendete isokratische Trennung erlaubte eine Detektion unter konstanten Bedingungen, der Einsatz von Gradiententechniken würde aufgrund der veränderten optischen Eigenschaften des Superstrats zu zusätzlichen Effekten auf das RfS-Signal führen. Eine Möglichkeit diese zu reduzieren, wird im Kapitel 4.3 vorgestellt.

Die nächsten Teile im Aufbau sind das T-Stück (Mischer) und die Reaktionsschleife. Eine effiziente Vermischung der beiden Ströme ist die Basis für die Affinitätsreaktion. Die Länge der Reaktionsschleife bestimmt die Reaktionszeit für diese Reaktion, aber auch das Ausmaß der Peakverbreiterung. Wie in der Literatur gezeigt wurde (Oosterkamp *et al.* 1994), muß die Mischung aus Antikörper und Eluat zum Zeitpunkt der Detektion nicht notwendigerweise im Gleichgewicht sein, da das HPLC-FIA-System eine sehr hohe Reproduzierbarkeit zeigt. Das

Optimum zwischen stärkerer Inhibition bei (fast) Gleichgewichtsbedingungen und geringerer Peakverbreiterung bei kürzeren Reaktionszeiten hängt von der Kinetik des Affinitätssystems ab.

Der nächste zu optimierende Parameter ist die Konzentration an Antikörper bzw. Rezeptormolekülen. Eine höhere Konzentration führt zwar zu größeren Steigungen der Bindungskurve und verbessert damit das Signal-Rausch-Verhältnis der Ableitung, auf der anderen Seite werden dadurch die Nachweisgrenzen verschlechtert, da für den gleichen Anteil an inhibierten Antikörpern eine höhere Konzentration an Antigen notwendig ist.

Die Bindungsrate wird außerdem durch die Flußrate durch die Meßzelle beeinflusst. Für reinen Massentransport ist dieser Zusammenhang durch Gl. (19) gegeben. D.h. eine Erhöhung der Flußrate reduziert die Dicke der Diffusionsschicht, damit erhöht sich die Bindungsrate um die dritte Wurzel aus der Erhöhung der Flußrate. Allerdings beträgt die maximale Flußrate mit den verwendeten Flußzellen etwa 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die maximale Konzentration an Rezeptormolekülen wird ferner durch die Bindungskapazität der Oberfläche bestimmt. Typische Werte für Aminodextranoberflächen liegen im Bereich von 15-25  $\text{ng}/\text{mm}^2$  (entsprechend 15-25 nm optischer Schichtdickenänderung).

Die Detektion an einer Oberfläche erfordert die Regeneration der Transduceroberfläche. Bedingt durch die hohe Bindungsstellendichte an der Oberfläche ist diese durch Rückbindung erschwert. Für bivalente Rezeptoren wie die hier verwendeten Antikörper kommen noch Aviditätseffekte hinzu. Daher mußten für die Regeneration relativ drastische Regenerationsbedingungen angewendet werden, die das S/N-Verhältnis der ersten Ableitung bei mehrfach verwendeten Transducerchips verringerten. Gleichzeitig nahm die Bindungskapazität relativ stark ab. Vermutlich liegt dies daran, daß bei der Kupplung des Analytderivates mittels TBTU an die Aminodextranoberfläche neben Amid- auch Esterbindungen mit den Hydroxygruppen des Dextrans entstehen, die unter sauren Regenerationsbedingungen weniger stabil sind.

Eine Fast-Fouriertransformation von Ableitungen der Bindungskurven (Abbildung 4-45) zeigte eine deutlich erhöhte Amplitude bei der Pumpfrequenz der HPLC-Pumpe, die bei mehrfach regenerierten Transducerchips noch stärker erhöht war. Der Einfluß von Pumpereffekten auf das Signal wurde auch für einen SPR basierten kommerziellen Biosensor (BIAcore) beschrieben (Schuck *et al.*, 1998). Die Verwendung einer zusätzlichen Säule zwischen HPLC-Pumpe und Trennsäule brachte eine leichte Verbesserung. Eine deutliche Verbesserung des S/N-Verhältnissen wurde durch den Glättungsalgorithmus erreicht, allerdings auf Kosten einer zusätzlichen Peakverbreiterung (siehe Kapitel 4.2.3).

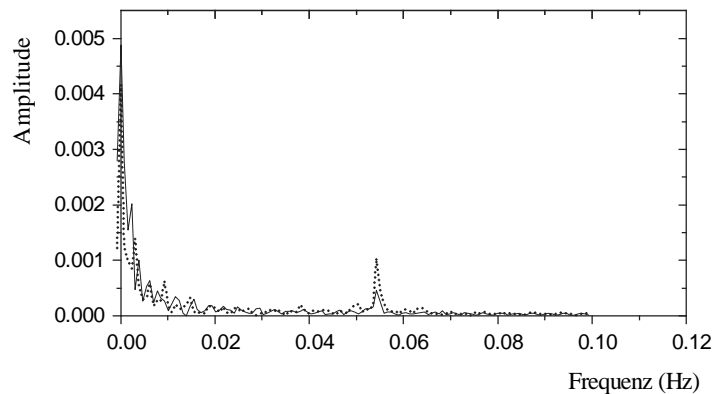


Abbildung 4-45 Fast-Fourier-Transformation von RIfS-Chromatogrammen. Durchgezogen: neue Oberfläche, gepunktet nach einem HPLC-Lauf und Regeneration.

Dieser Glättungsalgorithmus stellt schließlich den letzten zu optimierenden Parameter des Gesamtsystems dar. Die optimale Glättung stellt dann den Kompromiß zwischen höchstem S/N-Verhältnis und minimaler Peakverbreiterung dar.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems hängt von mehreren Faktoren ab, die optimiert werden müssen.
- ⇒ Die Reaktionsschleife und damit die Reaktionszeit muß an die Kinetik des biochemischen Systems angepaßt werden.
- ⇒ Die besonders für bivalente Rezeptoren erforderlichen drastischen Regenerationsbedingungen verschlechtern das S/N-Signal der differenzierten Bindungskurve, was zum Teil durch den Glättungsalgorithmus bei der Differenzierung kompensiert wird. Für monovalente Rezeptormoleküle sind in der Regel mildere Regenerationen ausreichend.

#### 4.2.8 Zusammenfassende Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Kupplung von HPLC mit einem markierungsfreien Bioassay zur selektiven Detektion gezeigt. Durch Verwendung eines Inhibitionstestformats konnten niedermolekulare Substanzen mit einem Modellrezeptor nachgewiesen werden. Dabei wurde die massentransportlimitierte Bindung des Modellantikörpers aus der Mischung mit dem Eluat der HPLC-Säule an die Transduceroberfläche zeitaufgelöst beobachtet. Die Anwesenheit von Substanzen im Eluat führte zu einer reduzierten Bindungsrate. Die Ableitung der Bindungs-

kurve führte zu negativen Peaks, deren Höhe und Fläche sowohl von der Affinität der Antikörper zum Antigen als auch von der Konzentration abhingen. Für die Bildung der Ableitung erwies es sich als günstig, einen Glättungsalgorithmus zu verwenden, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Durch diesen Algorithmus wurde durch die Peakverbreiterung die Auflösung verschlechtert, daher wurde der optimale Glättungsgrad als Kompromiß zwischen Verbesserung des S/N-Verhältnissen und der Verschlechterung der Auflösung gesucht. Dieses Vorgehen ist vergleichbar mit anderen Detektoren, bei denen z.B. die Integrationszeit oder Spaltbreite entsprechend optimiert werden muß.

Die selektive Detektion konnte anhand der Trennung von vier Pestiziden, von denen nur zwei Substanzen durch den verwendeten Antikörper erkannt wurden, gezeigt werden.

Die errechneten Nachweisgrenzen der Trennung von 4 Isoproturonderivaten liegen in der gleichen Größenordnung, wie sie in einer Arbeit mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper erhalten wurde. Zwar handelte es sich dabei um einen anderen Antikörper, weshalb sich diese Ergebnisse nicht direkt vergleichen lassen, sie zeigen aber doch, daß auch mit einer markierungsfreien Methode vergleichbare Nachweisgrenzen erreichbar sind.

Mit der Affinitätstitration steht eine einfache Methode zur Verfügung, um den Einfluß des organischen Modifiers auf das biochemische System zu charakterisieren. Gezeigt wurde die biochemische Detektion einer isokratischen Trennung. Für Gradiententechniken würde ein Aufbau, wie er im Kapitel 4.3 vorgestellt wird, deutliche Vorteile hinsichtlich Basisliniendrift aufgrund der sich ändernden Zusammensetzung des Superstrats bringen.

Als Hauptproblem stellte sich die Regeneration und die notwendige hohe Bindungskapazität der Oberfläche heraus. Beide müssen bei allen oberflächengebundenen Detektionsverfahren für jedes System optimiert werden. Bei Verwendung monovalenter Rezeptormoleküle sind in der Regel milderer Bedingungen möglich.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß die gezeigte Kopplung trotz dieser Einschränkungen ein interessantes Verfahren darstellt, das insbesondere im Screeningbereich für die Analytik von Stoffgemischen, wie z. B. Naturstoffen, attraktiv ist. Hier würden mit einem universellen Detektor die Komponenten im Eluat quantifiziert werden und durch die biospezifische Detektion eine Aussage über die Stärke der Wechselwirkung mit dem eingesetzten Rezeptormolekül getroffen werden können.

### 4.3 Aufbau eines RfS-Systems zur simultanen Detektion

Im folgenden werden zunächst die limitierenden Parameter des RfS-Einkanal-Aufbaus untersucht. Anschließend wird ein Aufbau zur simultanen Referenzierung vorgestellt und charakterisiert. Durch Anwendung des Aufbaus für quantitative Messungen eines im Fermenter produzierten Antibiotikums werden die Leistungsfähigkeit gezeigt und die Grenzen diskutiert.

#### 4.3.1 Untersuchung der limitierenden Parameter des Einkanal-RfS-Aufbaus

An einem im Arbeitskreis und bei Projektpartnern etablierten RfS-Aufbau (Schmitt *et al.* 1997) wurden die limitierenden Parameter des Systems bestimmt. Dazu wurden die zeitabhängigen Effekte der beiden aktiven Elemente Diodenarraydetektor und Lichtquelle untersucht. Abbildung 4-46 zeigt den Dunkelstrom für 6 verschiedene Dioden im typischen Auswertebereich für RfS-Messungen von 500-600 nm über einen Zeitraum von 14 Stunden. Die Ordinatenwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit um 10 (für 2. Diode) bis 50 Counts (6. Diode) versetzt. Man erkennt eine konzertierte Drift, die für alle Dioden beobachtet wird, jedoch kaum spektrale Effekte (Abstände zwischen den Kurven bleiben konstant).

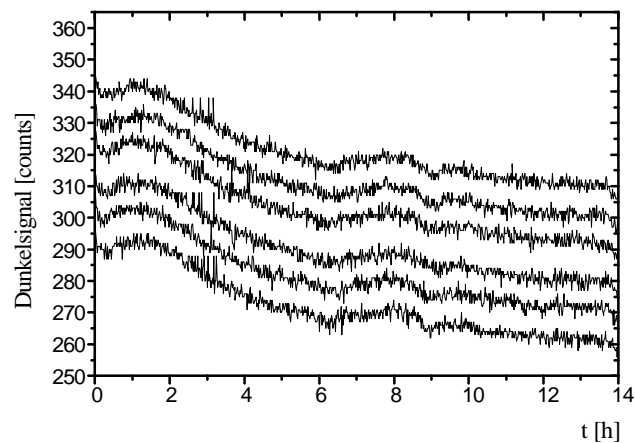


Abbildung 4-46 Dunkelstrom von 6 Dioden, Wellenlängen 502, 522 (10 Counts addiert), 542 (+20 Counts), 561 (+30 Counts), 581 (+40 Counts), 601 nm (+50 Counts).

Neben der Drift des Dunkelstroms wird das RfS-Signal auch durch das Dunkelstromrauschen der Diodenzeile beeinflusst (vgl. Abschnitt 2.1.2). Es wurde als Standardabweichung der Dunkelwerte jeweils für eine Diode über 50 Meßwerte bestimmt. Hierfür wurden unabhängig

von der Integrationszeit Werte von 1,4-1,6 Counts erhalten, die damit etwas schlechter sind, als die Angaben des Herstellers von 1 Count.

Um die Effekte der Lichtquelle zu bestimmen, wurden Messungen im RfS-Aufbau durchgeführt, wobei der Lichtleiter statt gegen den Interferenztransducerchip gegen Luft positioniert wurde. In Abbildung 4-47 sind die relativen Intensitäten wiederum für die gleichen 6 Dioden dargestellt, wobei auf die erste Messung normiert wurde.

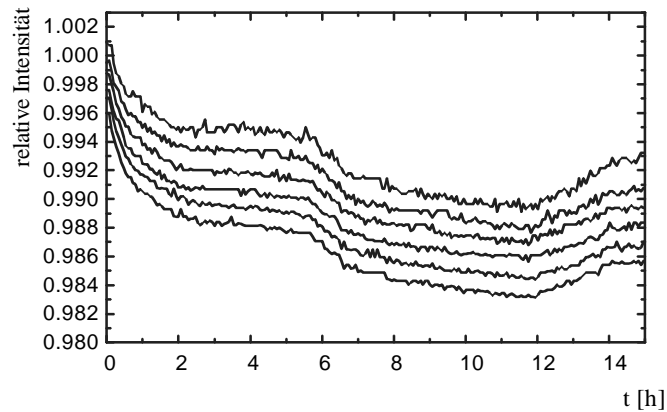


Abbildung 4-47 Relative Intensität der Halogenlampe bei den, Wellenlängen 502, 522 (0,001 subtrahiert), 542 (-0,002), 561 (-0,003), 581 (-0,004), 601 nm (-0,005).

Im Unterschied zu den Dunkelsignalen sind hier zusätzlich zu einer konzertierten Drift des gesamten Spektrums auch spektrale Effekte zu beobachten.

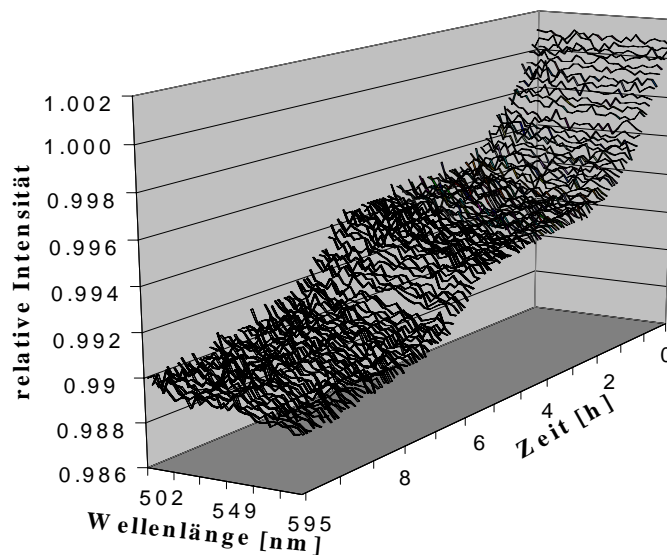


Abbildung 4-48 Verlauf der relativen Intensität der Halogenlampe über 15 h für 31 Dioden zwischen 502 und 595 nm .



Dies ist in der Darstellung der relativen Signale aller Dioden im Auswertebereich (Abbildung 4-48) noch deutlicher zu erkennen. Die relativen Intensitätswerte weichen im Langwelligen stärker vom Wert eins ab als im Kurzwelligen. Dies macht sich als negative Steigung der Linien in Abbildung 4-48 bemerkbar und ist besonders im Bereich zwischen fünf und acht Stunden zu erkennen.

Um die spektralen Effekte zu charakterisieren, wurden in den normalisierten Spektren als erste Näherung die Steigung der Regressionsgeraden über den Diodenbereich bestimmt. Dabei wurden Werte im Bereich von  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  /nm erhalten.

Die Auswirkungen der Effekte des Diodenzeilendetektors, also Dunkelstrom und Dunkelrauschen, sowie der Lichtquelle auf das RIfS-Signal wurden mit Simulationsrechnungen untersucht, denen ein gemessenes Rohspektrum einschließlich der vorab bestimmten Referenz- und Dunkelspektren zugrunde lag. Dieses Spektrum war unter den üblichen Bedingungen, d. h. mit einem Interferenztransducerchip (500 nm SiO<sub>2</sub>) gegen Wasser, und mit der Meßfrequenz 0,2 Hz, d. h. unter Aufsummierung von 70 Spektren mit einer Integrationszeit von 65 ms gemessen worden. Das Spektrum wurde den im folgenden beschriebenen Operationen unterworfen und anschließend wurde aus den erhaltenen simulierten Spektren mit dem Standardprogramm IFZ von Dr. Andreas Brecht zur Auswertung der RIfS-Spektren durch die Anpassung einer Parabel 2. Ordnung im Minimum 2,5 die optische Schichtdickenverläufe bestimmt.

Zunächst wurden die beschriebenen konzertierten Verschiebungen des Dunkelstroms zu den Rohwerten des Spektrums addiert. Hierbei wurden Werte unter 0,05 pm Änderung der optische Schichtdicke erhalten. Zur Charakterisierung des Einflusses des Dunkelrauschens der Diodenzeile wurden mit den oben genannten Werten für Integrationszeit, Aufsummierungen und Meßfrequenz 100 Dunkelspektren gemessen. Für jede Diode wurde der Mittelwert bestimmt und von den Einzelwerten abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden gerundet und jeweils zu den entsprechenden Werten des Rohspektrums addiert. Damit wurde das Rohspektrum mit *gemessenem* Dunkelrauschen manipuliert. Die Auswertung dieser Spektren ergab ein rms-Rauschen der optischen Schichtdicke von 0,8 - 1 pm und damit Werten, die dem Kurzzeitrauschen von Basislinienmessungen entsprechen. Daraus kann geschlossen werden, daß das Rauschen der Signalkurve überwiegend durch das Dunkelrauschen des Detektors begründet ist.

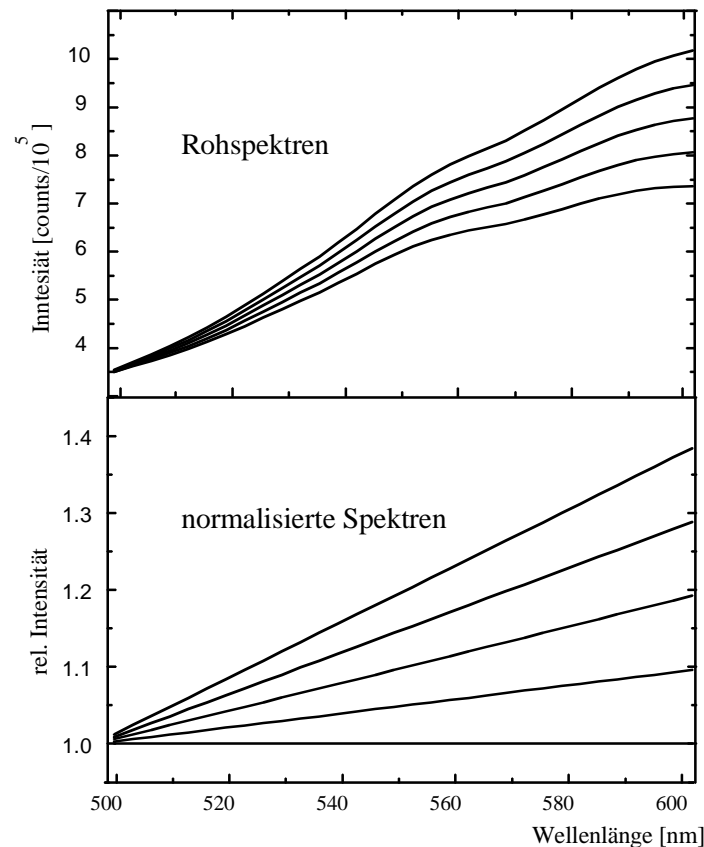


Abbildung 4-49 Rohspektrum multipliziert mit einem linear zu höheren Wellenlängen ansteigenden Faktor. Steigungswerte 0 to  $4 \cdot 10^{-2} / \text{nm}$ . Unterer Teil: Normalisierte Spektren, erhalten durch Division durch das erste Spektrum.

Die Einflüsse der Lichtquelle wurde mit oben erwähntem einfachen Modell einer linearen Steigung über das Spektrum simuliert. Dazu wurde das Rohspektrum modifiziert, indem die Werte für die einzelnen Dioden mit linear mit der Wellenlänge ansteigenden Faktoren multipliziert wurden. In Abbildung 4-49 sind die Auswirkungen auf das Rohspektrum und die normalisierten Spektren gezeigt, wobei die Steigungswerte höher skaliert wurden, um die Effekte graphisch darstellen zu können.

Die Auswirkungen auf die entsprechenden Interferenzspektren sind in Abbildung 4-50 dargestellt, wobei hier die gleichen, überhöhten Werte angewendet wurden. Die Rotverschiebung des Minimums aufgrund dieser Operationen ist deutlich zu erkennen. Bei Modellrechnungen mit spektralen Effekten in den gemessenen Bereichen werden Änderungen der errechneten optischen Schichtdicke von über 50 pm erhalten (Abbildung 4-51).

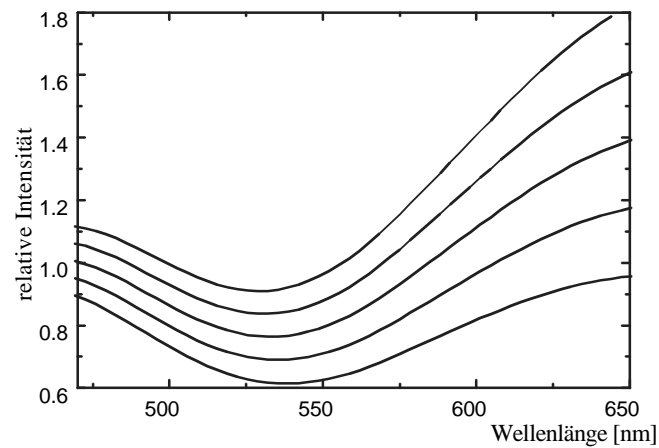


Abbildung 4-50 Auswirkungen der in Abbildung 4-49 beschriebenen Operation auf die Interferenzspektren. Steigungswerte 0 to  $4 \cdot 10^{-2}$  / nm.

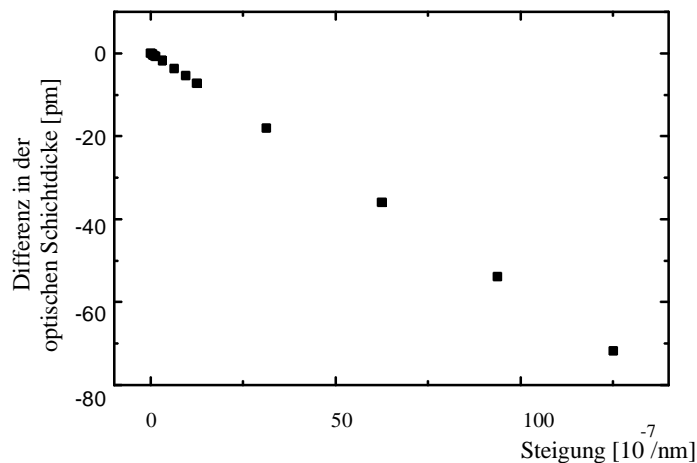


Abbildung 4-51 Verschiebung der errechnete optische Schichtdicke gegen die Steigungswerte der normalisierten Spektren.

Das beschriebene Modell einer linearen Änderung der spektralen Intensitätsverteilung stellt zwar eine sehr einfache Näherung dar, es zeigt jedoch deutlich, daß spektrale Änderungen der Lichtintensität, wie sie z. B. durch Schwankungen in der Spannungsversorgung oder durch Abkühlung der Halogenlampe aufgrund von Luftbewegungen hervorgerufen werden können, massive Einflüsse auf die detektierten RfS-Signale haben.

#### Schlußfolgerungen

⇒ Während das konzentrierte Driften des Dunkelsignals der Diodenzeile einen vernachlässigbaren Einfluß auf das RfS-Signal hat, ist das Dunkelrauschen der Diode offenbar zu einem großen Teil für das Rauschen der optischen Schichtdicke verantwortlich.

⇒ Die spektralen Änderungen der Lichtquelle scheinen dagegen hauptsächlich für niedriger frequente Änderungen des RfS-Signal, d. h. Driften verantwortlich zu sein.

#### 4.3.2 Aufbau eines Zweikanalsystems zur simultanen Referenzierung

Ein Lösungsansatz, um eine höhere Stabilität des RfS-Aufbaus im Hinblick auf zeitliche Fluktuationen zu erzielen, ist die Referenzierung des Lichtquellenspektrums durch einen zweiten Meßkanal. Hierfür wurde eine Elektronik der Firma Tec5 eingesetzt, die bis zu 4 Zeiss-Diodenzeilenspektrometerbausteine ansteuern kann, wobei zwei unterschiedliche Modi zur Verfügung stehen. Im ersten Modus werden die Diodenzeilen nacheinander ausgelesen, während im zweiten jeweils eine Diode der ersten, dann die entsprechende Dioden der zweiten Diodenzeile usw. ausgelesen wird, so daß hier entsprechende Intensitäten bei gleichen Wellenlängen nur einen Zeitversatz entsprechend der Auslesezeit von 4  $\mu$ s aufweisen. Da zeitliche Schwankungen der Lichtquelle für die Stabilität des RfS-Signals wie oben beschrieben eine große Rolle spielen, wurde der zweite Modus gewählt.

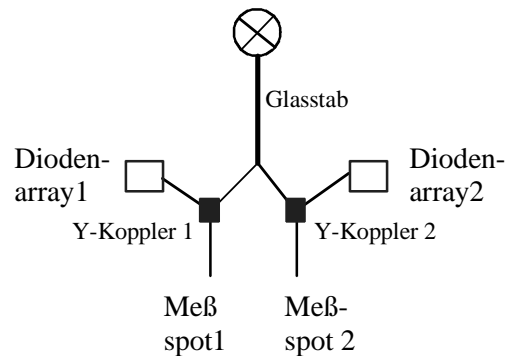


Abbildung 4-52 Schematischer Aufbau für simultan referenzierte Messungen mit zwei Diodenarrayspektrometern.

Abbildung 4-52 zeigt schematisch den Aufbau, der für die im folgenden beschriebenen Arbeiten verwendet wurde. Das Licht der Lichtquelle wurde in einen Glasstab eingekoppelt, an den jeweils ein Ausgang eines von zwei Y-Lichtkopplern in einer Halterung fixiert und angeklebt wurden. Der zweite Ausgang jedes Kopplers wurde jeweils mit einem MMS-Diodenzeilenbaustein verbunden, während die beiden Eingänge auf die beiden Meßspots geführt wurden. Mit dem beschriebenen Aufbau sind 2 verschiedene Arten der Referenzierung denkbar. Zunächst kann die zweite Diodenzeile lediglich zur Referenzierung der Lichtquelle herangezogen werden, hierfür befand sich ein Glaschip ohne Interferenzschicht im Meßspot 2. So war es möglich, anstatt mit einem festen Referenzspektrum, wie bei Einkanal-RfS-Auf-

bau, das reflektierte Spektrum gemäß Gleichung (28) mit einem simultan gemessene Referenzspektrum zu korrigieren. Die erhaltenen Interferenzmuster wurden mit dem üblichen Parabelanpassungs-Algorithmus ausgewertet.

Die zweite Möglichkeit den beschriebenen Aufbau zur Referenzierung heranzuziehen, besteht darin, an beiden Spots Interferenzspektren zu messen, wobei der zweite Spot so modifiziert sein sollte, daß keine spezifische Bindung des untersuchten biologischen Systems stattfindet, jedoch die unspezifischen Bindungseigenschaften möglichst identisch zu denen an Spot 1 sind, an dem einer der beiden Reaktionspartner immobilisiert wurde. Hier können im Idealfall sowohl Änderungen im Signal aufgrund von Lampenschwankungen, der Reflektivität aufgrund von Brechungsindexänderungen im Bulk, Effekte des Adlayers wie Quellung und unspezifische Bindung korrigiert werden.

#### **4.3.3 Referenzierung der Lichtquelle**

Die Verwendung eines zweiten Detektors zur Messung der Referenz führt eine zusätzliche, unabhängige Rauschquelle ein. Dies sollte sich in einem höheren Signalrauschen bemerkbar machen, da, wie oben beschrieben, dieses hauptsächlich durch das Detektorrauschen bestimmt ist. Da die optische Schichtdicke durch eine Parabelanpassung aus dem Spektrum erhalten wird, ist eine Abschätzung dieses zusätzlichen Rauschens über statistische Rechnungen schwierig. Aus diesem Grund wurde wie in Abschnitt 4.3.1 ein Spektrum mit gemessenem Dunkelrauschen modifiziert. Im Unterschied zu den dort durchgeführten Manipulationen wurde nun auch das Referenzspektrum, das gemäß Gl. (28) in die Berechnung des RfS-Spektrums aus dem Rohsignal eingeht, mit Dunkelrauschen modifiziert.

Die Auswertung dieser Spektren ergab ein rms-Rauschen der optischen Schichtdicke von 1 - 1,2 pm das damit etwa 10-20% über dem in Abschnitt 4.3.1 bestimmten Schichtdickenrauschen lag.

Im Vergleich hierzu wurden im beschriebenen Aufbau gemessene Schichtdickenverläufe ausgewertet. Allerdings muß dabei bedacht werden, daß in diesem Aufbau sowohl eine andere Elektronik, andere Diodenzeilenspektrometerbausteine und eine andere Lichtquelle verwendet wurde. Durch eine entsprechende Routine war es dabei möglich, die RfS-Spektren sowohl mit festem, d. h. vorab gemessenem Referenzspektrum, und mit simultan gemessener Referenz zu berechnen. Für die Messungen mit fester Referenz wurden rms-Werte von 1,3-1,5 pm bestimmt, für die entsprechenden Messungen unter Verwendung der simultan gemessenen Referenz 1,1 - 1,3 pm. Dies bedeutet, daß hier das Schichtdickenrauschen nicht mehr primär durch das Dunkelrauschen der Diodenzeilen bestimmt wird, sondern zu einem

bestimmten Anteil die Lichtquelle zum Rauschen beiträgt. Durch die simultane Referenzierung werden diese Anteile verringert und damit eine Verbesserung des Schichtdickenrauschens um 10% erreicht. Für die Bestimmung langsamer Reaktionen an der Oberfläche ist häufig weniger das Signalrauschen, sondern die Basislinienstabilität entscheidend. Eine entsprechende Langzeitmessung über 60 h zeigt Abbildung 4-53.

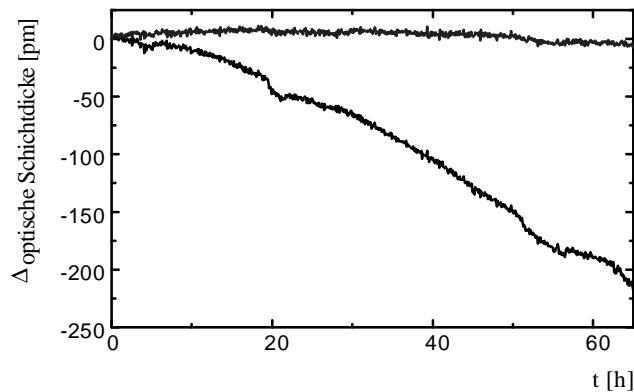


Abbildung 4-53 Parallel gemessene Verläufe der optische Schichtdicke. Obere Kurve: feste Referenz, untere Kurve: simultan gemessene Referenz.

Hier ist eine deutlich höhere Stabilität der Basislinie aufgrund der simultanen Referenzierung zu erkennen. Während das mit der festen Referenz ausgewertete Signal innerhalb des Meßzeitraums um 220 pm driftet, erhält man für die simultan referenzierte Basislinie Schwankungen im Bereich von 20 pm. D. h. die Langzeitstabilität ist um den Faktor 10 verbessert.

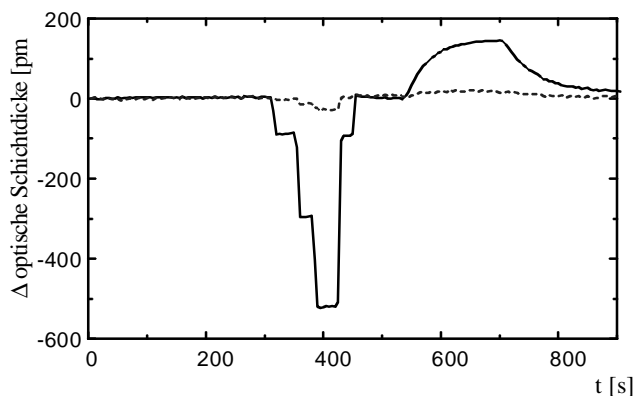


Abbildung 4-54 Parallel gemessene Verläufe der optische Schichtdicke bei Variation der Lampenversorgungsspannung und Kühlung der Lichtquelle. Durchgezogen: feste Referenz, gestrichelt: simultan gemessene Referenz.

Die Effektivität der Lampenreferenzierung wurde durch weitere Experimente überprüft, in denen zum einen die Versorgungsspannung verändert und zum anderen die Halogenlampe durch einen Ventilator gekühlt wurde. Die entsprechenden Effekte werden in Abbildung 4-54 gezeigt. Zunächst wurde dreimal die Versorgungsspannung um je 0,5-1% reduziert und dann auf den ursprünglich Wert erhöht. Auch hier erkennt man um den Faktor 10 reduzierte Schichtdickeneffekte, wie auch beim Einschalten der Ventilatorlüftung (550 s) bzw. beim Abschalten (700 s).

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Im beschriebenen Aufbau hat die Lichtquelle einen gewissen Anteil am Schichtdickengeräuschen, der durch simultane Referenzierung durch einen zweiten Diodenzeilendetektor zumindest deutlich reduziert werden kann.
- ⇒ Die Referenzierung der Lichtquelle kann sehr effektiv die Langzeitstabilität des RfS-Signals verbessern.

#### 4.3.4 Referenzierung durch RfS-Messungen an 2 Spots

Wie oben beschrieben, bietet diese Variante der Referenzierung die Möglichkeit, nicht nur Instabilitäten der Lichtquelle sondern auch Änderungen im Bulk und Effekte des Adlayers zu korrigieren. Durch einen speziellen Halter wurden die beiden Lichtleiter im Abstand von 2,2 mm (gemessen von den Mittelpunkten der Stirnflächen) über dem Kanal einer Flußzelle montiert, so daß zunächst Spot 1 und dann Spot 2 überströmt wird.

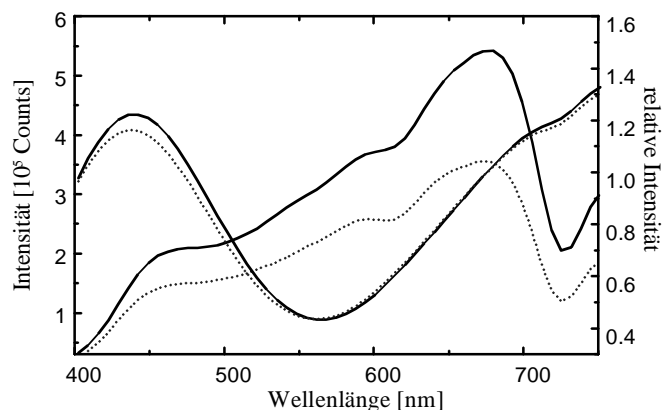


Abbildung 4-55 Parallel gemessene RfS-Spektren, durchgezogen Kanal 1, gestrichelt Kanal 2. Dargestellt sind die Rohspektren (linke Ordinate) und die auf ein Referenzspektrum bezogenen Spektren (rechte Ordinate)

Um die Methode der Referenzierung grundsätzlich zu charakterisieren, wurde für die folgenden Messungen zunächst einheitlich modifizierte Interferenzchips verwendet. Anschließend wird an einem Beispiel die Möglichkeiten und Limitierungen der Referenzierung unspezifischer Bindung durch Messungen an unterschiedlich modifizierten Spots diskutiert.

Abbildung 4-55 zeigt die in beiden Kanälen gemessenen Rohspektren sowie die entsprechenden Interferenzspektren, die durch Korrektur gemäß Gleichung (28) um eine vorab gemessene Referenzmessung mit Glaschips ohne Interferenzschicht erhalten werden. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit des Diodenzeilenbausteins in Kanal 2, wird hier eine geringere Lichtintensität gemessen.

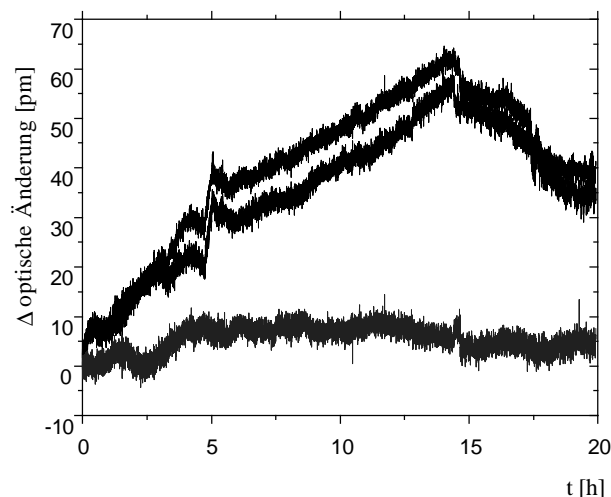


Abbildung 4-56 *Baseline über 20 Stunden gemessen an den beiden Spots mit AMD-Schicht. Von oben nach unten: Schichtdickenänderung in Kanal 1, Kanal 2 und Differenz der beiden Kurven.*

Als erste Charakterisierung wurde eine Basislinie über 20 h gemessen, die in Abbildung 4-56 dargestellt ist. Man erkennt, daß beide Kanäle parallele Driften zeigen, die mit 65 pm/15 h relativ gering ausfallen. Zusätzlich ist die Differenz der Schichtdickenänderungen eingezeichnet, die mit Werten unter 10 pm im gesamten Zeitraum von 20 hochstabil ist. Die Berechnung des rms-Rauschen für die in beiden Kanälen gemessenen Schichtdickenverläufe und der Differenzkurve liefert vergleichbare Werte zu den im fest/simultan-Referenzmodus bestimmten Ergebnissen. In weiteren Experimenten wurde auch in diesem Aufbau der Einfluß von Spannungsänderungen untersucht. Hierzu wurde wieder die Lichtquellenversorgungsspannung leicht verändert. Die Auswirkungen auf die Signale sind in Abbildung 4-57 gezeigt. Beide Kanäle zeigen einen konzertierten Sprung um ca. 150 pm, die Differenz der beiden



Signale verändert sich dabei um weniger als 10 pm. Auch für diese Art der Referenzierung gilt also, daß Signalinstabilitäten, die durch Änderungen im eingestrahlten Licht entstehen, in der Differenzkurve weitgehend eliminiert werden.

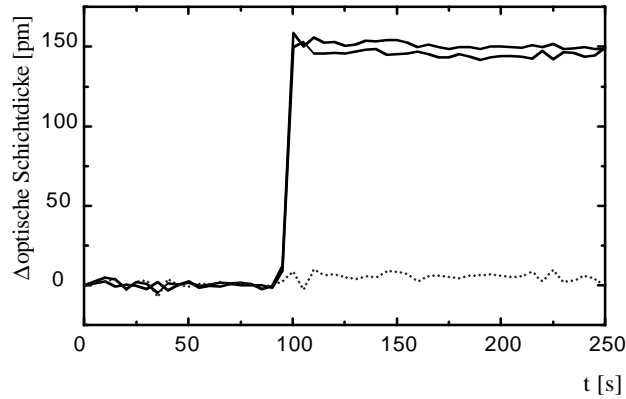


Abbildung 4-57 Zweispotmessung mit Änderung der Spannungsversorgung bei 90 sec.  
Gestrichelt: Differenz der beiden Bindungskurven.

Die Referenzierung von Änderungen im Bulk durch Messung an zwei Spots wurde zunächst mit einem unmodifizierten  $\text{SiO}_2$ -Transducer getestet, indem eine Lösung von 10% Glycerin in Puffer injiziert wurde (siehe Abbildung 4-58). Man erkennt, daß die im Vergleich zum Laufpuffer unterschiedliche Dispersion der Glycerinlösung zu einem Anstieg der gemessenen optischen Schichtdicke um 300 pm führt. An beiden Spots ist der Schichtdickeneffekt gleich, lediglich die kurze Verzögerung, mit der die Lösung Spot 2 überströmt, führt bei der Injektion und beim Spülen mit Puffer zu einem Versatz, der sich jeweils in der Differenz der beiden Signale als „Peak“ bemerkbar macht.

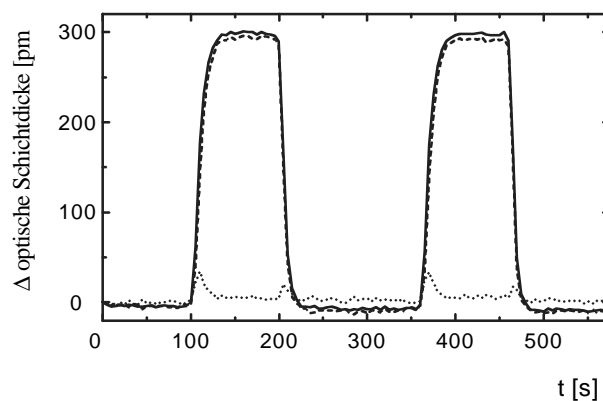


Abbildung 4-58 Injektion von 10% Glycerin in PBS über  $\text{SiO}_2$ -Transducer. Durchgezogen: Kanal 1, gestrichelt Kanal 2, gepunktet: Differenz der beiden Signale.

In einem weiteren Versuch wurde über eine Aminodextranschicht 0,2 mM Salzsäure injiziert. Dabei tritt typischerweise ein negativer Schichtdickeneffekt auf. In Abbildung 4-59 sind die gemessenen Signalverläufe dargestellt. Man erkennt, daß bei der Salzsäureinjektion erst nach ca. 100 Sekunden ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. An beiden Spots ist auch hier der Schichtdickeneffekt gleich, es tritt lediglich wieder der „Verzögerungspeak“ in der Differenz der beiden Signale auf. Dieses Beispiel zeigt, daß durch die Detektion an zwei Spots, auch komplexe Oberflächeneffekte korrigiert werden können.

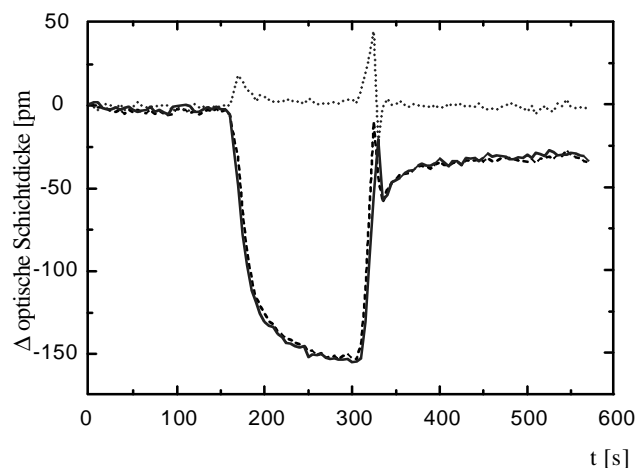


Abbildung 4-59 Injektion von 20 mM HCl über AMD Transducer. Durchgezogen: Kanal 1, gestrichelt Kanal 2, gepunktet: Differenz der beiden Signale.

Die Referenzierung solcher Bulk- bzw. Adlayereffekte sind für viele Anwendungen interessant. Als Beispiele seien neben Messungen sehr kleiner Signale bei kinetischen Affinitätsmessungen zwischen immobilisierter und gelöster Spezies auch die in dieser Arbeit untersuchten Anwendungen des Synthesemonitorings und der HPLC-Kopplung erwähnt. Bei ersterem waren insbesondere Driften, Signalinstabilitäten und Quelleffekte der Dichtung limitierend, die durch zusätzliche Detektion an einer inaktiven Oberfläche (siehe als Bsp. Abbildung 4-16) korrigiert werden könnten. Für die Kopplung ist eine Zweipunkt detektion besonders für HPLC-Trennungen unter Verwendung von Gradientenelution interessant. Hier würden die Veränderungen im Eluat und damit im Bulk zu zusätzlichen Driften führen.

Bei der Detektion von Bindung an die Oberfläche muß beachtet werden, daß für eine massen-transportkontrollierte Bindung die Bindungsrate gemäß Gl. (19) vom Abstand des Meßpunktes zum Anfang des Flußkanals abhängt. D. h. für den vorliegenden Fall einer sequentiellen Überströmung der beiden Detektionspunkte, daß die Bindungsraten unterschiedlich

sind, sofern zumindest teilweise eine Diffusionskontrolle vorliegt. Für den Grenzfall einer rein massentransportkontrollierten Bindung muß nach Gl. (19) für das Verhältnis der Bindungsraten  $d\Gamma_1/dt$  und  $d\Gamma_2/dt$  gelten:

$$\frac{\frac{d\Gamma_1}{dt}}{\frac{d\Gamma_2}{dt}} = \sqrt[3]{\frac{l_2}{l_1}}, \quad (32)$$

wobei  $l_1$  und  $l_2$  die entsprechenden Abstände zum Anfang des Flußkanals sind. Für die Anordnung, die für diese Arbeiten gewählt wurde ergibt sich mit  $l_1 = 1,5$  mm und  $l_2 = 3,7$  mm ein Verhältnis von 1,35. Dies wurde mit einem Aminodextrantransducer, der mit Atrazincapronsäure (ACA) modifiziert wurde, durch Bindungsstudien mit einem anti-ACA-Antikörper überprüft.

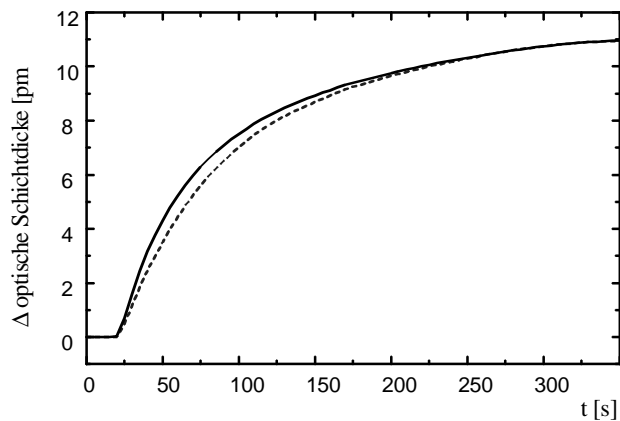


Abbildung 4-60 Injektion von 50 µg/ml Anti-ACA-Antikörper über AMD-ACA-Oberfläche.  
Durchgezogen: Spot 1, gestrichelt Spot 2.

In Abbildung 4-60 sind die Bindungskurven für die Injektion von 50 µg/ml Antikörperlösung dargestellt. Man erkennt, daß zunächst die Bindungsrate am Spot 1 höher ist. Im weiteren Verlauf streben die Kurven gegen das Sättigungssignal von ca. 11 nm, das für beide Spots gleich groß ist. Da es sich um einen einheitlich modifizierten Transducerchip handelt, entspricht diese Beobachtung den Erwartungen.

Das Gleichgewichtssignal von über 11 nm läßt erwarten, daß für niedrigere Beladungen des Transducers die Bindung massentransportkontrolliert ist (vgl. Kapitel 2.2). In Abbildung 4-61 sind die Bindungskurven für die Injektion von 250 ng/ml Antikörperlösung gezeigt. Wiederum ist deutlich zu erkennen, daß an Spot 2 die Bindungsrate deutlich geringer ist.

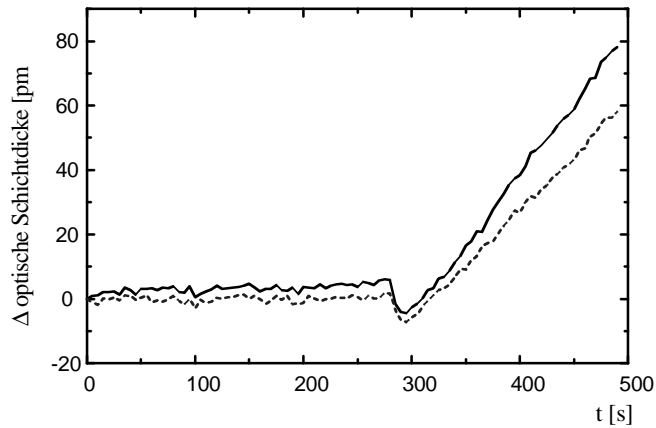


Abbildung 4-61 Injektion von 250 ng/ml Anti-ACA-Antikörper. Durchgezogen: Spot 1, gestrichelt Spot2.

Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt und anschließend die Lichtleiter vertauscht, so daß bei den nächsten drei Injektionen die Auswertungskanäle vertauscht waren. In Tabelle 4-8 sind die durch lineare Regression an die Bindungskurven bestimmten Steigungen angegeben.

Tabelle 4-8 Steigungen der Bindungskurven für die Bindung von 250 ng/ml anti-ACA.

	Spot 1	Spot2
Kanal 1	$0.45 \pm 0.03 \text{ pm/s}$	$0.34 \pm 0.02 \text{ pm/s}$
Kanal 2	$0.44 \pm 0.03 \text{ pm/s}$	$0.33 \pm 0.03 \text{ pm/s}$

Unabhängig vom Detektionskanal werden am jeweiligen Spot die gleichen Sättigungswerte (innerhalb der Standardabweichungen) bestimmt. Für das Verhältnis erhält man einen Wert von 1,32 (Kanal 1) bzw. 1,33 (Kanal 2), was dem oben theoretisch bestimmten Wert von 1,35 sehr nahe kommt. Rechnet man die Abweichung von maximal 0,03 für das Verhältnis der Steigungen in Abweichungen im Abstand der beiden Detektionspunkte um, so ergibt sich ein Wert kleiner 0,1 mm, der innerhalb der Toleranzgrenzen für die in der Institutswerkstatt gefertigten Bauteile liegt.

#### Schlußfolgerungen

- ⇒ Mit dem beschriebenen Aufbau können an zwei Spots optische Schichtdickenverläufe gemessen werden, die stark korrelierte Driften aufweisen.
- ⇒ Änderungen der Lichtintensität, in der Superstratzusammensetzung und komplexere Oberflächeneffekte wirken sich auf beide Signale weitestgehend gleich aus und können daher korrigiert werden.

⇒ Die Gleichgewichtsbelegung eines einheitlich modifizierten Transducerchips war an beiden Spots gleich, bei der Detektion massentransportlimitierter Bindung erhält man unterschiedliche Steigungen, die sehr gut mit den von der Theorie vorhergesagten Werten übereinstimmen.

#### 4.3.5 Anwendung der Zweispotdetektion

Um Effekte wie unspezifische Bindung auszureferenzieren, müssen die beiden Meßspots des Transducerchips unterschiedlich modifiziert werden. Hierzu wurde ein piezoelektrisches Mikrodosiersystem verwendet. Näheres hierzu findet sich bei Stemmler (1999) und Barzen (2000). Vor dem Auftropfen des entsprechenden Liganden mit der Mikropipette wird die Oberfläche aktiviert. Um aminofunktionalisierte Liganden zu binden, haben sich N-Succinimidaktivester als besonders geeignet erwiesen. Dazu werden carboxyfunktionalisierte Oberflächen mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und DIC in DMF versetzt und einige Stunden reagieren gelassen. Nach Abspülen und Trocknen werden auf diese Oberfläche die entsprechenden zu immobilisierenden Liganden mittels Mikropipette aufgetropft, wobei die Transducerchips geheizt werden. Durch dachziegelartiges Übereinanderlegen von Tropfen entsteht eine homogene Beladung mit dem Liganden. Das Heizen führt zur Verdunstung des Lösungsmittels, es kommt zu einer Aufkonzentrierung der Lösung, was die Kupplungseffizienz und -geschwindigkeit erhöht. Überschüssige Aktivester werden mit Ethanolamin umgesetzt, wobei zum Teil Hydrolyse und zum Teil eine Reaktion mit der Aminogruppe des Ethanolamins auftritt. Durch die Hydrolyse entstehen wieder Carboxygruppen, bei der Reaktion Amidbindungen und terminale Hydroxygruppen.

Der Aufbau zur Zweispot-Detektion wurde dazu verwendet, das Antibiotikum Vancomycin zu quantifizieren. Dieses Antibiotikum wird in Fermentern durch den Streptomyzeten *Amycolatopsis orientalis* produziert. Vancomycin bindet spezifisch an Peptide, die terminal zweimal die Aminosäure D-Alanin aufweisen. Dies wurde zur Analytik mittels RfS ausgenutzt, indem die Transducerchips mit entsprechenden Peptiden mit hoher Dichte modifiziert wurden. Dadurch kann Vancomycin unter massentransportlimitierter Bindung nachgewiesen werden.

Das Problem bei Fermenterproben sind die Probenmatrizes, die sehr komplexe Mischungen aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Salzen darstellen. Abbildung 4-62 zeigt beispielhaft die Injektion von vancomycinfreiem Nährmedium über eine DAPEG-Oberfläche, die an einem Spot mit Ac-Lys-D-Ala-D-Ala modifiziert und am Referenzspot nur aktiviert und mit

Ethanolamin deaktiviert wurde. Die unspezifische Bindung am Referenzspot ist um den Faktor drei höher, als am Spot, der mit dem Liganden modifizierte wurde, wobei offenbar beim Spülen mit Puffer der weitaus größte Teil der an den beiden Spots gebundenen Substanz wieder entfernt wird, so daß die residuale optische Schichtdickenänderung gleich groß ist. Bei der anschließenden Regeneration mit Salzsäure werden in beiden Fällen wieder die Ausgangswerte der optischen Schichtdicke erreicht.

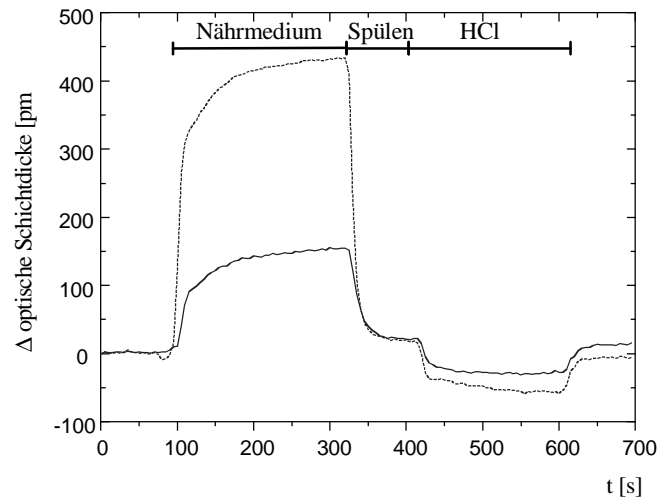


Abbildung 4-62 Injektion eines Fermenternährmediums. Durchgezogen: Spot 1 Ac-Lys-D-Ala-D-ALA, gestrichelt Spot 2 nur aktiviert und deaktiviert mit Ethanolamin.

Soll allerdings die massentransportlimitierte Bindung des Vancomycins zur Bestimmung der Konzentration herangezogen werden, stört das unterschiedliche Ausmaß an unspezifischer Bindung erheblich. Daher wurde, um gleichzeitig eine höhere Bindungsdichte zu erreichen, anstelle des DAPEG ein AMD-Transducer mit spezifischem Liganden (hier L-Ala-D-Ala-D-Ala) am Meßspot 1 und der Referenzspot mit einem Diastereomeren (L-Ala-L-Ala-L-Ala) umgesetzt. Auf den so modifizierten Spots war die unspezifische Bindung mit Nährmedium nur im Bereich von 10% unterschiedlich, eine Verwendung zur Quantifizierung sollte damit möglich sein.

Dies wurde in folgenden Experimenten überprüft. Zunächst wurde 0,5 µg/ml Vancomycin in Puffer gelöst injiziert (gestrichelte Kurven in Abbildung 4-63).

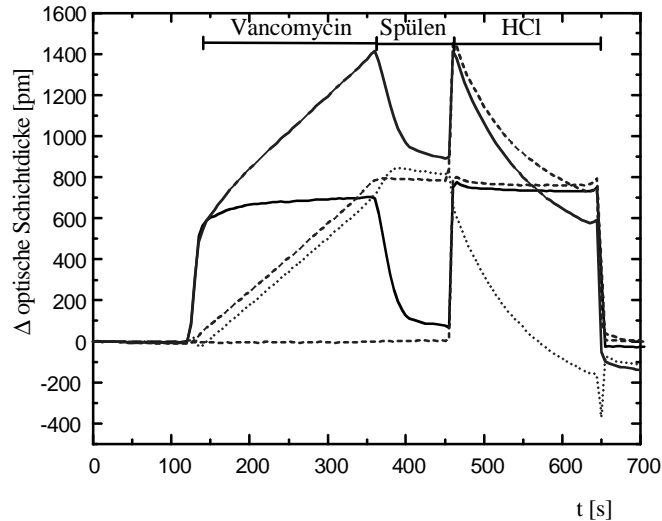


Abbildung 4-63 Messung von 50 ng/ml Vancomycin in Fermenternährmedium (durchgezogen) bzw. Puffer (gestrichelt). Spot 1 D-Ala-D-Ala-D-Ala (jeweils obere Kurve), Spot 2 L-Ala-L-Ala-L-Ala (jeweils untere Kurve). Gepunktet: Differenz der beiden obersten Kurven.

Man erkennt, daß das Antibiotikum nur an Spot 1 band, die Steigung betrug 3,3 pm/s. Beim Spülen mit Puffer dissoziiert fast kein Antibiotikum, daher wurde zum Zeitpunkt 480 s Salzsäure injiziert, wodurch eine vollständige Regeneration der Oberfläche erreicht wurde. Bei der Injektion von 50% Fermenternährmedium in PBS, das mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Vancomycin gespickt wurde (durchgezogenen Kurven), wurde sowohl am spezifisch modifizierten wie auch am Referenzspot Bindung detektiert. Die Steigung des linearen Bereichs an Spot 1 betrug 3,6 pm/s. Ebenfalls in Abbildung 4-63 eingezeichnet ist die Differenz (gepunktet) der an Spot 1 und Spot 2 gemessenen Kurven, hier beträgt die Steigung 3,3 pm/s, d.h. die unspezifische Bindung konnte vollständig ausreferenziert werden.

Dieses Beispiel zeigt sehr schön, wie die Zweispotdetektion dazu verwendet werden kann, Bindungskurven um unspezifische Bindung zu korrigieren. Notwendig für die Referenzierung ist allerdings eine Modifikation des Referenzspots, die gleichzeitig kein spezifisches und möglichst identisches unspezifisches Bindungsverhalten aufweist. Die einfachsten Methoden sind, entweder ganz auf eine Modifikation des Polymers an der Oberfläche zu verzichten oder, wie anhand der Aktivierung mit NHS/EDC und Deaktivierung mit Ethanolamin gezeigt, alle Modifikationsschritte mit Ausnahme der Immobilisierung des Liganden durchzuführen. Wie das Beispiel der Fermentationslösungen zeigt, können dabei deutlich unterschiedliche unspezifische Bindungen auftreten. Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Immobilisierung hydrophober Liganden, wie z. B. Pestizid- oder Steroidderivate, die aufgrund ihrer

Hydrophobizität die Eigenschaften der Oberfläche insbesondere hinsichtlich der Bindung von Proteinen deutlich verändern. Daher ist die gezeigte Modifikation mit einem möglichst ähnlichen Liganden, der keine spezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor zeigt, die beste Lösung. Jedoch können auch hier für komplexe Matrices, wie z. B. Proben aus einem Fermenter, bestehend aus einer Vielzahl unterschiedlichster Verbindungen, noch Unterschiede hinsichtlich unspezifischem Bindungsverhalten auftreten. Daher müssen unspezifische Wechselwirkungen sorgfältig untersucht werden, bevor die entsprechenden Korrekturen durchgeführt werden.

#### *Schlußfolgerungen*

- ⇒ *Bei den Messungen der Fermenterproben führt die einfache Aktivierung/Deaktivierung zu deutlich höherer unspezifischer Bindung*
- ⇒ *Bei Modifikation der Referenzspots mit einem Diastereomeren des Liganden erhält man eine Oberfläche, auf der das Vancomycin nicht bindet, und deren unspezifische Bindung von Nährmedium vergleichbar ist.*
- ⇒ *Mit diesem Referenzspot konnte die unspezifische Bindung ausreferenziert werden.*

#### **4.3.6 Zusammenfassende Diskussion**

Zunächst wurde der Standard-RIFS-Aufbau hinsichtlich limitierender Parameter charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß das Rauschen der optischen Schichtdicke hauptsächlich durch Dunkelrauschen der Diodenzeile bestimmt wird, während Drifteffekte auf die Lichtquelle zurückzuführen sind. Ein verbessertes Signal-Rauschverhältnis könnte dementsprechend durch verbesserte Detektoren (z.B. gekühlte Varianten) und durch eine höhere Lichtintensität erhalten werden. Verbesserungen im Dunkelrauschen würden sich direkt auf Schichtdickenrauschen auswirken, höhere Lichtintensitäten würden hingegen das Messen bei kürzeren Integrationszeiten und damit eine höhere Anzahl  $n$  an Mehrfachmessungen erlauben. Dies würde das Signal-Rauschen-Verhältnis um die Wurzel  $n$  verbessern.

Insbesondere für die Detektion langsamere Reaktionen ist die Driftstabilität häufig eher limitierend, als das Signalrauschen. Daher wurde ein Aufbau erstellt, der eine gleichzeitige Referenzierung der Lichtquelle ermöglicht. Damit konnte die Langzeitstabilität um den Faktor 10 verbessert werden.

Durch die Detektion von RIFS-Signalen an zwei Meßpunkten können zusätzlich Effekte, die auf Änderungen in der Superstratzusammensetzung und komplexere Oberflächeneffekte zurückzuführen sind sehr effektiv korrigiert werden. Zwei Anwendungsbereiche, in denen dies



---

von besonderem Interesse ist, sind die beiden anderen in dieser Arbeit behandelten Gebiete. Sowohl bei der Festphasensynthese als auch bei der HPLC-RfS-Kopplung dürfte eine Korrektur der „Brechungsindexsprünge“ zusätzliche Verbesserungen bedeuten.

Ein weiterer, wichtiger Anwendungsbereich stellt die Korrektur unspezifischer Bindungseffekte durch Messung an einem Referenzspot dar. Dies wurde am Beispiel des Nachweises von Vancomycin in Fermenternährmedium gezeigt. Allerdings ist eine solche Korrektur nicht unproblematisch. Zum einen muß die Modifikation des Referenzspots sehr sorgfältig überprüft werden, zum anderen zeigt die in Abbildung 4-61 dargestellte Messung, daß es bei serielltem Überströmen der beiden Spots und Vorliegen massentransportlimitierter Bindung zu Verarmung der Lösung und dementsprechend zu unterschiedlichen Signalen kommt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie auf zwei neuen Gebiete angewendet. In einem dritten Teil wurden zunächst die Limitierungen der Methode bestimmt und dann ein Aufbau mit einer höheren Stabilität des RIfS-Signals erstellt.

Da die optischen Eigenschaften des Superstrats und damit des Lösungsmittels, in dem die Festphasenreaktion stattfindet, einen großen Einfluß auf das RIfS-Signal hat, mußte zunächst dieser Effekt charakterisiert werden. Die Berechnung von RIfS-Spektren für verschiedene Brechungsindizes des Superstrats ergab eine Abnahme der Modulationstiefe mit steigendem Brechungsindex. Durch experimentelle Messungen mit verschiedenen Lösungsmittel wurde der gleiche Verlauf mit etwas niedrigeren Modulationstiefen erhalten, da in den Rechnungen Rückwandreflex und Übersprechen des Lichtleiterkopplers nicht berücksichtigt wurden. Mit abnehmender Modulationstiefe wurde ein zunehmendes Schichtdickenrauschen ermittelt. Für die Verfolgung der Synthesen jedoch als limitierend erwiesen sich nicht das Signal-Rausch-Verhältnis, sondern Driften und Effekte, die bei Injektionen in die Meßzelle auftraten. Diese waren im Vergleich zu Messungen in wäßrigem Milieu um etwa eine Größenordnung erhöht. Erste Messungen zur Verfolgung von Festphasensynthesen wurden im Lösungsmittel Dimethoxyethan durchgeführt, das einen relativ niedrigen Brechungsindex und damit eine größere Modulationstiefe aufweist. Dabei konnte sowohl die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminohexansäure als auch die Abspaltung der Schutzgruppe verfolgt werden. Durch wiederholte Injektionen von Kupplungslösung konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Sättigungsverlauf nicht auf eine Verarmung der Lösung sondern auf den Reaktionsverlauf zurückzuführen war. Die Wiederholung des Experiments führte zu folgenden Ergebnissen: Die gekuppelte Menge an Aminosäure schwankt relativ stark, eine Korrelation mit dem Alter der Schichten läßt einen Alterungsprozeß der Oberfläche wahrscheinlich erscheinen. Die Anpassung der Kinetik eines einfachen 1:1 Modells ergab Ratenkonstanten, die um den Faktor zwei streuten.

Messungen im Lösungsmittel DMF ergaben selbst für die kleinste Fmoc-geschützte Aminosäure noch signifikante Bindungskurven, die residuale Schichtdicke nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe liegt jedoch für Glycin unterhalb der zuvor bestimmten Schwankungsbreite für reine Drift- und Injektionseffekte. Bei seitenkettengruppengeschütztem Arginin waren hingegen sowohl Kupplung als auch residuale Schichtdickeneffekte signifikant detektierbar.

Durch Injektion von Kupplungslösung auf eine mit Acetylchlorid gecappte Oberfläche, bei der keine Schichtdickenänderungen beobachtet wurden, konnte ein weiterer Beweis erbracht werden, daß die gemessenen Schichtdickenverläufe auf die Reaktion von freien Aminogruppen an der Oberfläche zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse stellten damit erstmals die prinzipielle Eignung von RfS zur Messung in *organischen* Lösungsmittel unter Beweis.

Durch Synthese eines Nonapeptids konnte gezeigt werden, daß auch Mehrfachkupplungen beobachtbar sind. Auch die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit Trifluoressigsäure konnte im Aufbau verfolgt werden, war allerdings von einem Effekt überlagert, der vermutlich auf das Quellen des O-Rings mit TFA zurückzuführen ist. Da gegen das auf der Oberfläche synthetisierte Peptid ein Antikörper kommerziell erhältlich ist, konnte mit diesem Modellsystem das Ziel Syntheseverfolgung *und* Beobachtung der Wechselwirkung mit einem Targetprotein durch die gleiche Methode realisiert werden. Die Injektion von Antikörperlösung über die Oberfläche mit dem synthetisierten Antigen führte zu einer deutlichen Bindung, die durch das freie Peptid gehemmt werden konnte. Die Injektion von Antikörper über eine Oberfläche mit einem Peptid, das über eine Aminosäure weniger als das eigentliche Antigen verfügt, zeigte nur noch eine schwache Bindung. Diese Resultate belegen, daß auf der Oberfläche tatsächlich das gewünschte Peptid synthetisiert werden konnte.

Durch zwei Referenzmethoden, die spektrale Ellipsometrie und die Sequenzierung von der Oberfläche, konnte die mit RfS erhaltenen Daten für die Oberflächenbelegung bestätigt werden.

Schließlich wurde mit einer nicht-peptidischen Synthese von Triazinderivaten gezeigt, daß auch solche Reaktionen mit RfS beobachtbar sind. Dabei wurde deutlich, daß die Methode in der Form, in der sie eingesetzt wurde, für die Detektion der Bindung sehr kleiner Gruppen, an ihre Grenzen stößt. Hier könnte ein Aufbau, wie er im dritten Teil der Arbeit vorgestellt wurde, sehr hilfreich sein, da damit Drift- und Injektionseffekte referenziert werden könnten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde erstmals eine markierungsfreie Methode zur biospezifischen Detektion *kleiner* Moleküle in der HPLC etabliert. Dazu wurde das Eluat der Säule mit einer Lösung des Rezeptormoleküls gemischt und nach einer Reaktionszeit über einen RfS-Transducerchip mit hoher Bindungskapazität für den Rezeptor geleitet und die Abnahme der Bindung an die Oberfläche bei Anwesenheit einer aktiven Substanz detektiert.

Zunächst wurde die Wechselwirkung des verwendeten Modellsystem eines Pestizidantikörpers mit verschiedenen Derivaten durch Affinitätstitration charakterisiert und der Einfluß des Eluenten untersucht. Aus diesen Ergebnissen wurde ein günstiges Mischungsverhältnis

zwischen Eluat und Antikörperlösung ermittelt. Ein Kopplungsaufbau einschließlich Referenzdetektor wurde erstellt und zunächst nach Injektion von Fenuron auf die HPLC-Säule Bindungskurven aufgenommen. Diese Bindungskurven zeigten eine Abnahme der Signalsteigerung aufgrund der Anwesenheit des Antigens im Eluat. Durch Differenzierung der Bindungskurve wurde ein negativer Peak erhalten. Die Verwendung eines Ableitungsalgorithmus nach Savitzky-Golay verbesserte das Signal-Rauschverhältnis bei gleichzeitiger Peakverbreiterung. Durch Veränderung der Größe des Anpassungsfensters der lokalen Polynom-Anpassung wurden die optimalen Parameter für den Anpassungsalgorithmus bestimmt.

Als Modelltrennung wurde die Separation von vier Derivaten mit unterschiedlicher Affinität des Antikörpers zur entsprechenden Substanz gewählt. Alle 4 Substanzen konnten im „RIfS-Chromatogramm“ detektiert werden, wobei die Peakgrößen die Affinität des Antikörpers zur entsprechenden Substanz widerspiegeln. Eine Trennung zweier aktiver und zweier nicht-aktiver Substanzen bezüglich des Antikörpers führte zu einem RIfS-Chromatogramm mit nur zwei Peaks.

Die Aufnahme von RIfS-Chromatogrammen bei fünf unterschiedlichen Konzentrationen je Substanz zeigte den aufgrund der limitierten Antikörpermenge zu erwartenden Sättigungsverlauf. Aus den Peakhöhen und dem Basislinienrauschen konnten die Nachweisgrenzen für alle vier Analyte berechnet werden. Ein Vergleich mit Arbeiten, die mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durchgeführt wurden, lieferte ähnliche Nachweisgrenzen. Zwar sind diese Arbeiten nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche biochemische Systeme verwendet wurden, es zeigt jedoch, daß mit der markierungsfreien Detektion vergleichbare Nachweisgrenzen wie mit fluoreszenzbasierter Detektion erreichbar sind.

In exemplarischen Messungen unter Verwendung einer Vorsäule zur Aufkonzentrierung konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode Konzentrationen noch bestimmbar sind, die deutlich unter den ermittelten Nachweisgrenzen des Aufbaus ohne Vorsäule liegen.

Als problematisch im Rahmen der durchgeführten Messungen erwies sich die starke Abhängigkeit der maximalen Bindungskapazität und des Signal-Rausch-Verhältnisses von der Regeneration der Transduceroberfläche. Die Gründe hierfür liegen zum einen in den für bivalente Rezeptoren notwendigen drastischen Regenerationsbedingungen und zum anderen vermutlich im Anteil an Liganden, die über Esterbindungen an das Dextran gebunden wurden, und damit eine deutlich geringere Stabilität gegenüber den sauren Regenerationsbedingungen aufweisen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die limitierenden Parameter des etablierten Einkanal-RIfS-Aufbaus untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das Schichtdickenrauschen hauptsächlich durch das Dunkelrauschen der Diodenzeile bestimmt wird, während Drifteffekte auf Instabilitäten der Lichtquelle zurückzuführen sind. Durch einen Aufbau zur simultanen Detektion mit zwei Diodenzeilen konnte die Langzeitstabilität um eine Größenordnung verbessert werden. Der Aufbau bietet neben dieser direkten Referenzierung der Lichtquelle auch die Möglichkeit, an zwei Spots RIfS-Signale zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, daß damit sehr effektiv sowohl Instabilitäten der Lichtquelle als auch Änderungen in der Zusammensetzung des Superstrats korrigiert werden können. Bei geeigneter Modifikation des Referenzspots können auch unspezifische Bindungseffekte zumindest zum Teil korrigiert werden. Hierbei ist allerdings eine sorgfältige Untersuchung dieser Effekte notwendig, um nicht zusätzliche Fehlerquellen einzuführen. Mit Quantifizierungsmessungen eines in einem Fermenter produzierten Antibiotikums konnte die Möglichkeit, auch in komplexen Medien unspezifische Bindungen zu referenzieren, gezeigt werden.

## 5.2 Ausblick

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, daß Festphasensynthesen mit RIfS zeitaufgelöst beobachtet werden können. Sobald die Nachweisgrenzen, die mit dem parallelen System erreicht werden, ausreichend zur Quantifizierung der Schichtdickenänderungen sind und lösungsmittelkompatible RIfS-Mikrotiterplatten zur Verfügung stehen, können Untersuchungen im parallelen System durchgeführt werden. Diese werden zeigen, inwieweit ein Monitoring von Festphasensynthesen im Rahmen eines Screenings und damit die Beobachtung und Quantifizierung der Wirkstoffsynthesen mit RIfS möglich sind. Der im dritten Teil dieser Arbeit erstellte Aufbau sollte durch Messungen an einem Referenzspot eine deutliche Reduzierung störender Drift- und Injektionseffekte ermöglichen. Mit der mit Acetylchlorid gecappten Oberfläche steht eine geeignete Referenzoberfläche zur Verfügung.

Eine interessante Weiterführung der Arbeiten zur HPLC-RIfS-Kopplung könnte die Umsetzung eines nicht-immunobasierten Rezeptorassays zu Detektion sein. Auch eine Miniaturisierung des Aufbaus stellt eine interessante Aufgabe dar, da damit der Verbrauch an Rezeptorproteinen reduziert würde. Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Kopplung der gezeigten Detektion mit weiteren Trennmethoden wie der Kapillarelektrophorese. Durch Verwendung der Zweispotdetektion könnten elegant Probleme, die sich aus dem Einsatz von Gradiententechniken ergeben, gelöst werden.

Damit wurden schon zwei interessante Anwendungsgebiete des aufgebauten Zweikanalsystems benannt. Die höhere Signalstabilität ist jedoch auch für die Untersuchung von langsamen Kinetiken von großer Bedeutung. Die Referenzierung von Effekten unspezifischer Bindung und Änderungen des Superstrats ermöglicht die Detektion kleinerer Bindungseffekte. Da zur Ausschaltung des Massentransporteinflusses bei der Detektion von Kinetiken die Bindungskapazitäten der Oberfläche möglichst niedrig sein müssen und damit die zu detektierenden Signale klein sind, bietet eine solche Referenzierung auch in diesem Bereich ein großes Potential.

## 6 Literatur

- Anderson R. C., Jarema M. A., Shapiro M. J., Stokes J. P., Ziliox M., Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry: MAS CH Correlation in Solvent-Swollen Resin, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 2650-2651.
- Atherton E., Cameron L., Meldal M., Sheppard R. C., Self-indicating activated esters for use in solid phase peptide synthesis. Fluorenylmethoxycarbonyl amino acid derivatives of 3-hydroxy-4-oxodihydrobenzotriazine, *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1986** 1763-1765.
- Barzen, C., Optimierung eines Fluoreszenz-Immunosensors für den flexiblen Multianalyt-Nachweis, Dissertation, Universität Tübingen 2000.
- Bergmann L., Schaefer C., Lehrbuch der Experimentalphysik, 9.Auflage 1993, Verlag de Gruyter, Berlin.
- Benz H., The Role of Solid-Phase Fragment Condensation (SPFC) in Peptide Synthesis, *Synthesis* **1994** 337-358.
- Birkert, O., Haake, H.-M., Schütz, A. Brecht, A., Mack, J., Jung, G., Gauglitz, G., A Streptavidin-Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, eingereicht.
- Böcker, J., Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vogel Verlag, Würzburg 1997.
- Bracewell, D. G., Gill, A., Hoare, M., Lowe, P. A., Maule, C. H., An optical biosensor for real-time chromatography monitoring: Breakthrough determination, *Biosensors & Bioelectronics* **13** (1998) 847-853.
- Brecht A., Ingenhoff J., Gauglitz G., Direct monitoring of antigen-antibody interactions by spectral interferometry, *Sens. Act. B.* **6** (1992) 96-100.
- Brecht A., Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen, Dissertation, Universität Tübingen 1993.
- Brecht, A., Gauglitz, G., Optimised layer system for immunosensors based on the RIfS transducer, *Fresenius J. Anal. Chem.* **349** (1994) 360-366.
- Brecht A., Gauglitz G., Optical Probes and transducers, *Biosens. Bioelectron.* **10** (1995) 923-936.
- Brecht A., Abuknesha R., in Vorbereitung 2000.

- Brockman, J. M., Frutos, A. G., Corn, R. M., A Multistep Chemical Modification Procedure To create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8044-8051.
- Cameron L., Meldal M., Sheppard R. C., Feedback Control in Organic Syntheses. A system for Solid Phase Peptide Synthesis with True Automation, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987** 270-272.
- Carpino L. A., Han G. Y., The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 5748-5749.
- Dandliker W. B., Schapiro H. C., Meduski J. W., Alonso R., Feigen G. A., Hamrick J. R. (Jr.), Application of fluorescence polarisation to the antigen-antibody reaction. Theory and experimental method, *Immunochem.* **1** (1964) 165-171.
- Danishefsky S. J., McClure K. F., Randolph J. T., Ruggeri R. B., A strategy for the solid-phase synthesis of oligosaccharides, *Science.* **260** (1993) 1307-1309.
- De Feijter J. A., Benjamins J., Veer F.A., Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of synthetic and biopolymers at the air-water interface, *Biopolymers* **17** (1978) 1759-1772.
- Eddowes M. J., Direct immunochemical sensing: Basic chemical principles and fundamental limitations, *Biosens.* **3** (1987) 1-15.
- Egner, B. J., Langley, G. D., Bradley, M., Solid Phase Chemistry: Direct Monitoring by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. A Tool for Combinatorial Chemistry, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 2652-2653.
- Eigen M., Rigler R., Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** (1994) 5740-5747.
- Eisen H. N., Karush F., The interaction of purified antibody with homologous haptens. Antibody valence and binding constant, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 363-364.
- Emneus, J., Marko-Varga, G., Biospecific detection in liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **703** (1995) 191-243.
- Fischer, M., Tran, CD., Investigation of solid phase peptide synthesis by the near-infrared multispectral imaging technique: A detection method for combinatorial chemistry, *Anal. Chem.* **71** (1999) 2255-2261.
- Fox J. E., Newton R, Stroud C. H., A new detector for fully automatic peptide synthesis, *Int. J. Peptide Protein Res.* **38** (1991) 62-65.



- Früchtel J. S., Jung G., Organische Chemie an fester Phase, *Angew. Chem.* **35** (1996) 17-42.
- Gait J. M., Solid Phase Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach; IRL, Oxford, 1989.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W., Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators B* **11** (1993) 21-27.
- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, in: Baltes H., Göpel W., Hesse J. (Heraus.), Sensors Update Band 1, Verlag Chemie, Weinheim 1996, 1-35.
- Glaser, R. W., Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics, *Anal. Biochem.* **213** (1993) 153-161.
- Gordon E.M., Barrett R.W., Dower W. J., Fodor S.P., Gallop M. A., Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 1385-1401.
- Haake, H-M., Schütz, A., Gauglitz, G., Label-free Detection of Biomolecular Interaction by Optical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (2000) 576-585.
- Haake, H-M., de Best, L., Irth, H., Abuknesha, R., Brecht, A. Label-free Biochemical Detection in Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* im Druck.
- Hecht E., Siemsen F. (Übers.), Optik, Adison-Wesley, Bonn, München 1989.
- Hehl, K. Untersuchung dünner polymerer Filme und deren Wechselwirkung mit Analyten mit spektraler Ellipsometrie, Dissertation Universität Tübingen 1998.
- Hodges R. S., Merrifield R. B., Monitoring of solid phase peptide synthesis by an automated spectrophotometric picrate method, *Anal. Biochem.* **65** (1975) 241-272.
- Ikegawa, S., Hirabayashi, N., Yoshimura, T., Tohma, M., Maeda, M., Tsuji, A Determination of conjugated bile acids in human urine by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr.* **577** (1992) 229-238.
- Ingle J. D., Crouch S. R., Spectrochemical Analysis, Prentice Hall, London 1988.
- Irth H., Oosterkamp A.J., van der Welle W, Tjaden U.R, Van der Greef J., On-line immunochemical detection in liquid chromatography using fluorescein-labelled antibodies, *J. Chromatogr.* **633** (1993) 65-72.
- Israelachvali, J. Intermolecular and surface forces, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, San Diego 1992.

- Jung G. (Hrsg.), *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- Jung G. (Hrsg.), *Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**
- Kaiser, E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.* **34** (1970) 594-598.
- Karlsson, R., Roos, H., Fägerstam, L., Persson, B., Kinetic and concentration analysis using BIA technology, *A Companion to Methods in Enzymology* **6** (1994) 99-110.
- Karlsson, R., Ståhlberg R, Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors, *J. Immunol. Meth.* **200** (1997) 121-133.
- Karlsson, R., Fält A., , Surface Plasmon Resonance Detection and Multispot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low-Molecular-Weight Analytes and Determination of Low Affinities, *Anal. Biochem.* **228** (1995) 274-280.
- Kiba, N., Shitara, K., Furusawa, M., Post-column oligosaccharide dehydrogenase reactor for coulometric detection of malto-oligosaccharides in a liquid chromatographic system, *J. Chromatogr.* **537** (1990) 443-448.
- Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D., 1,1,3,3-Tetramethyluronium compounds as coupling reagents in peptide and protein chemistry, *Proc. Eur. Pept. Symp., 21<sup>st</sup>* (1990) 62-64.
- Kröger, S., Setford, S. J., Turner, P. F., Immunosensor for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Aqueous/Organic Solvent Soil Extracts, *Anal. Chem.* **70** (1998) 5047-5053.
- Lang G., Entwicklung und Optimierung eines optischen Immunoassays zur Pestizidanalytik in aquatischen Medien, Dissertation, Tübingen 1997.
- Langmuir I., Schäfer V. J., Built-up films of proteins and their properties, *Science* **85** (1937) 76-80.
- Langmuir I., Schäfer V. J., Optical measurement of the thickness of a film adsorbed from a solution, *J. Am. Chem. Soc.* **59** (1937) 1406.
- Marrack J., Smith F. C. Quantitative aspects of immunity interactions: the combination of antibodies with simple haptens, *Br. J. Exp. Pathol.* **13** (1932) 394-402.
- Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide , *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2149- 2154.

- Nopper, D., Gauglitz, G., Enhanced stability of RfS-Sensors for the determination of hydrocarbons in water by covalent immobilisation, *Fresenius J. Anal. Chem.* **362** (1998) 114-119.
- Ober, R. J., Ward, E. S., The Choice of Reference Cell in the Analysis of Kinetic Data Using BIAcore, *Anal. Biochem.* **271** (1999) 70-80.
- Ober, R. J., Ward, E. S., The Influence of Signal Noise on the Accuracy of Kinetic Constants Measured by Surface Plasmon Resonance Experiments, *Anal. Biochem.* **273** (1999) 49-59.
- Oosterkamp A.J., Irth H., Tjaden U.R, Van der Greef J., On-line Coupling of Liquid Chromatography to Biochemical Assays Based on Fluorescent-Labeled ligands, *Anal. Chem.* **66** (1994) 4295-4301.
- Oosterkamp, A.J., Irth, H., Beth, M., Unger, K. K. U.R, Van der Greef, J., Bioanalysis of digoxin and its metabolites using direct serum injection combined with liquid chromatography and on-line immunochemical detection, *J. Chromatogr.* **653** (1994) 55-61.
- Oosterkamp, A.J., Villaverde Herraiz, M.T., Irth, H., Tjaden, U.R, Van der Greef, J., reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled On-Line to Receptor Affinity, Detection Based on the Human Estrogen Receptor, *Anal. Chem.* **68** (1996) 1201-1206.
- Ortega, F., Dominguez, E., Burestedt, E., Emneus, E., Gorton, L., Marko-Varga, G., Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds, *J. Chromatogr.* **675** (1994) 65-78.
- O'Shannessy D. J., Determination of kinetic rate and equilibrium constants for macromolecular interactions: A critique of the surface plasmon resonance literature, *Curr. Opin. Biotechnol.* **5** (1994) 65-71.
- Piehler, J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin, M., Maul, C., Thiericke, R., Grabley, S., Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.* **294** (1997) 94-102.
- Piehler, J., Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G., Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *J. Immunol. Meth.* **201** (1997) 189-206.
- Piehler, J., Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation, Tübingen 1997.
- Piehler, J., Schreiber, G., Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor ifnar2, *J. Mol. Biol.* **294** (1999) 223-237.

- Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., Gauglitz, G., A High-Density Poly(ethylene Glycol) Polymer Brush for Immobilization on Glass-Type Surfaces, eingereicht.
- Pivonka D. E., Russell K., Gero T., Tools for Combinatorial Chemistry: In Situ Infrared Analysis of Solid-Phase Organic Reaction, *Applied Spectroscopy* **50** (1996) 1471-1478.
- Pursch, M., Schlotterbeck G., Tseng L., Albert K., Rapp W., Monitoring the reaction progress in combinatorial chemistry: <sup>1</sup>H MAS NMR investigations on single macro beads in the suspended state, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **35** (1997) 2867-2868.
- Reichl, D., Krage, R., Krummel, R., Gauglitz, G., Sensing of volatile organic compounds using a simplified reflectometric interference spectroscopy set up, *Applied Spectroscopy*, in press.
- Rothmund M., Schütz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Gräfe D., Label free binding assay spectroscopic detection of pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.* **359(1)** (1997) 15-22.
- Rothmund M., Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche, Dissertation Universität Tübingen 1999.
- Saleh B. E. A., Teich M. C., Fundamentals of Photonics, John Wiley & Sons, Inc., New York 1991.
- Savitzky, G., Golay, M. J. E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, *Anal. Chem.* **36** (1964) 1627-1638.
- Schmitt, H-M, Aufbau eines interferometrischen Meßsystems zur markierungsfreien Beobachtung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, Diplomarbeit Universität Tübingen, 1995.
- Schmitt, H-M., Brecht, A., Gauglitz, G. An Integrated System for Microscale Affinity Measurements, *Analytical Methods & Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS 96* (1996) 104-109.
- Schmitt, H-M., Brecht, A., Piehler, J., Gauglitz, G., An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosensors & Bioelectronics* **12(8)** (1997) 809-816.
- Schobel, U, Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina, Dissertation, Tübingen, 1999.

- Schuck P., Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor: I. A computer simulation of the influence of mass transport, *Biophys. J.* **70** (1996) 1230-1249.
- Schuck, P., Millar, D. B., Kortt, A., Determination of Binding Constants by Equilibrium Titration with Circulating Sample in a Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Anal. Biochem.* **265** (1998) 79-91.
- Schwedt, G., Chromatographische Trennmethode: theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen, Thieme Verlag Stuttgart 1986.
- Seemann, J., Methoden zur Referenzierung von Reflektometrisch-Interferometrischen Sensoren, Diplomarbeit Universität Tübingen 1995.
- Sjölander S., Urbaniczky C., Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis, *Anal. Chem.* **63** (1991) 2338-2345.
- Skladal, P. Effect of methanol on the interaction of monoclonal antibody with free and immobilized atrazine studied using the resonant mirror-based biosensor. *Biosens Bioelectron.* **14** (1999) 257-63.
- Stankova M, Lebl M, Library generation through successive substitution of trichlorotriazine, *Molecular Diversity* **2** (1996) 75-80.
- Stemmler, I., Miniaturisierte Affinitätsanalytik - Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion, Dissertation Universität Tübingen 1999.
- Stiebel, C., Ellipsometrische Charakterisierung biologischer Membrane, Dissertation Universität Tübingen 1998.
- Tom-Moy, M, Doherty, T. P., Baer, L. R., Spira-Solomon, D., Use of an Acoustic Wave Device as a Liquid Chromatography Detector, ACS Symposium Serie No. **613** (1995) Chapter 2.
- Ullman E. F., Schwarzberg M., Rubenstein K. E., Fluorescent Excitation Transfer Immunoassay, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 4172-4178.
- Velick S. F., Parker C. W., Eisen H. N., Excitation energy transfer and the quantitative study of the antibody hapten reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46** (1960) 1470-1482.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., Lin, L.-N., Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter, *Anal. Biochem.* **179** (1989) 131-137.

Yao, T., Wasa, T., High-Performance Liquid Chromatographic detection of L- and D-Amino Acids by Use of Immobilized Enzyme Electrodes as Detectors, *Anal. Chim. Acta* **209** (1988) 259-264.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ACA	Atrazincapronsäure = 4-Chloro-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)-capronsäure
AMD	Aminodextran
BIA	engl. <i>Biomolecular Interaction Analysis</i>
BSA	Bernsteinsäureanhydrid
DAPEG	Diaminopolyethylenglykol
DIEA	Diisopropylethylamin
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EDC	Ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
FIA	Fließinjektionsanalyse
GC	Gaschromatographie
GOPTS	Glycidyoxypropyltrimethoxysilan
HTS	engl. <i>High Throughput Screening</i>
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP(MS)	Inductively Coupled Plasma (Mass Spectrometry)
LIGA	Lithographie Galvanoformung und Abformung
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
OVA	Ovalbumin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PMMA	Polymethylmetacrylat
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SAM	engl. <i>Self Assembled Monolayer</i>
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat

## 7.2 Publikationen

Hans-Martin Schmitt, Andreas Brecht, Günter Gauglitz, An Integrated System for Microscale Affinity Measurements, *Analytical Methods & Instrumentation*, Special Issue  $\mu$ TAS 96 (1996) 104-109.

Hans-Martin Schmitt, Andreas Brecht, Jacob Piehler, Günter Gauglitz, An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosensors & Bioelectronics* 12 (1997) 809-816.

Dieter Reichl, Hans-Martin Schmitt, Günter Gauglitz, Development of Measurement Software using Testpoint<sup>TM</sup> - advantages and limitations, *TrAC* 17 (1998) 397-401.

Günter Gauglitz, Andreas Brecht, Hans-Martin Haake, Matthias Rothmund, Matthias Sauer, Uwe Schobel, Armin Schütz, Ivo Stemmler, Array configurations based on read-out techniques, *SPIE* Vol. 3570, 1998, 80- 86.

Hans-Martin Haake, Leonie de Best, Hubertus Irth, Ram Abuknesha, Andreas Brecht, Label-free Biochemical Detection in Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, im Druck.

Hans-Martin Haake, Armin Schütz, Günter Gauglitz, Label-free Detection of Biomolecular Interaction by Optical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 576-585.

Oliver Birkert, Hans-Martin Haake, Armin Schütz, Andreas Brecht, Jürgen Mack, Günter Jung, Günter Gauglitz, A Streptavidin-Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, eingereicht



### 7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, G. Gauglitz, J. Gelinek†, W. Göpel†, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S., K. Kemmler-Sack†, B. Koppenhöfer, A. Kovar, D. Krug, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, H. Oberhammer, D. Oelkrug, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, C. Ziegler.

#### 7.4 Lebenslauf

Name: Hans-Martin Haake geb. Schmitt

Geburtsdatum: 3. August 1968

Geburtsort: Heidelberg

Familienstand: verheiratet mit Dagmar Haake, Tochter Sophie

1975-1979 Grundschule Todtnau

1979-1984 Gymnasium Schönau

1984-1988 Markgraf-Ludwig-Gymnasium Baden-Baden  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst 1988-1990 in der Heimstätte am Grambker See in Bremen

Studium: April 1990 - Dezember 1995 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Diplomprüfung: Mai 1995

Diplomarbeit: Juni - Dezember 1995 bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen.  
Titel: „Aufbau eines interferometrischen Meßsystems zur markierungsfreien Beobachtung von Protein-Protein-Wechselwirkungen“

Promotion: Januar 1996 - April 2000 unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen.  
Titel:  
Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie