

**Entwicklung von Assaysystemen für die
parallele Detektion biomolekularer Interaktionen
an peptidfunktionalisierten Sensoroberflächen**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Kerstin Kröger

„If a man will begin with certainties, he shall end up in doubts;
but if he will be content to begin with doubts, he shall end up in certainties.”
Francis Bacon

Tag der mündlichen Prüfung:

05. März 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe anzufertigen, für das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie die Möglichkeit an vielen Tagungen teilzunehmen. Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Allen Kollegen sowohl der Biogruppe als auch der Chemogruppe danke ich für die nette Aufnahme in den Kreis der Chemiker und ihr fröhliches und hilfsbreites Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Seidel für die hervorragende Zusammenarbeit beim Nuklease Assay im Projekt nanoMAP und vor allem der vielen interessanten fachlichen und privaten Diskussionen. Frau Dr. Sabine Reder danke ich besonders für die Zusammenarbeit im PIWAS-Projekt sowie ihrer stete Erklärungsbereitschaft bei TIRF-Fragen.

Bei Frau Dr. Kerstin Länge und Herrn Dr. Oliver Birkert bedanke ich mich für die Einführung in Methode und Theorie von RfS und Oberflächenchemie. Herrn Dipl. chem. Alexander Jung danke ich für die einführenden Hilfen bei DNA und PNA Messungen sowie für die rechnerische Betreuung.

Bei Herrn Dipl. chem. Dieter Fröhlich möchte ich bedanken für seine nächtlichen Einsätze am Laser. Für die Ausarbeitung der Simulation danke ich Herrn Dipl. math. Michael Kumpf und Frau Dipl. chem. Tina Mutschler danke ich für die Ellipsometermessungen. Für die Präparation und Charakterisierung nahezu unzähliger Transducer und die gute Zusammenarbeit in vielen Projekten danke ich Herrn Oliver Frank.

Applera Deutschland GmbH danke ich für die Synthese der PNA im Rahmen des Projektes PIWAS.

Im Rahmen des AiF-Projekt Mf-HTS möchte ich mich bei allem Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere Herrn Dipl. chem. Jörg Bauer und Dr. Jörg Rademann im Arbeitskreis von Prof. Dr. Günther Jung sowie dem HSG- IMIT für TopSpot spezifische Fragen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ernst Bayer namentlich Dr. Steffen Englert und Dr. Thomas Freudemann danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die vielen Stunden an der HPLC und CGE.

Der DFG danke ich für die Teilnahme und das Stipendium im Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen.

All denen, die mir privat zur Seite standen, kann ich gar nicht genug danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	4
3	Theoretischer Teil	6
3.1	Biochemische Grundlagen	6
3.1.1	Biomolekulare Wechselwirkungen	6
3.1.2	Antisense-Technologie	7
3.1.3	Peptidnukleinsäure	9
3.1.4	DNA-Chiptechnologie	11
3.1.5	Nukleasen in der DNA-Analytik	12
3.1.6	Einsatz der PNA zur Detektion von Pestiziden und estrogenen Wirkstoffen ..	13
3.1.7	Autoimmunerkrankung Zöliakie	14
3.2	Optische Grundlagen	17
3.2.1	Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie	17
3.2.2	Mehrfachreflexion an dünnen Schichten	19
3.2.3	Reflektometrische Interferenzspektroskopie im Mikrotiterplattenformat	21
3.2.4	Vergleich der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit anderen parallelen markierungsfreien Systemen	23
3.2.5	Miniaturisierung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zum Nano-RIfS	27
3.2.6	Fluoreszenzanregung mit interner Totalreflexion (TIRF)	28
3.2.7	Spektrale Ellipsometrie	30
3.3	Reaktion an Oberflächen und Massentransport	30
3.3.1	Kinetik	30
3.3.2	Thermodynamische Affinitätskonstante in Lösung	33
4	Materialien und Methoden	36
4.1	Materialien	36
4.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	36
4.1.2	Lösungen	38
4.1.3	Verwendete Analyte für die flexible Immobilisierung	38
4.2	Methoden	40
4.2.1	Peptidsynthese	40
4.2.2	Oberflächenchemie	41
4.2.3	Herstellung der DNA-Analytderivatkonjugate	45
4.2.4	Bindungshemmtest	45
4.2.5	Kapillargelelektrophorese (CGE)	46
4.2.6	Flexible Immobilisierung von Analytderivaten	46
4.3	Geräte	47
4.3.1	Einkanal-RIfS	47
4.3.2	Paralleles RIfS	49
4.3.3	RIANA-Aufbau	50
4.3.4	Top-Spot	51
4.3.5	Kontaktwinkelmessungen	52
4.3.6	Optisches Profilometer	53
4.3.7	HPLC	53
5	Ergebnisse und Diskussion	54
5.1	Peptid-DNA-Konjugate	54
5.2	Charakterisierung und Anwendung von Peptidnukleinsäuren als	

Inhaltsverzeichnis

	Ankermoleküle an Sensoroberflächen	58
5.2.1	Immobilisierung der PNA	58
5.2.2	Regeneration und Stabilität der PNA-Oberflächen	59
5.2.3	Signalerhöhung und Vergleich mit Ellipsometrie	64
5.2.4	PNA-Oberflächen für die Beobachtung der enzymatischen Reaktion der Exonuklease III mit Biosensoren	67
5.3	PNA-Oberflächen für die flexible Immobilisierung von Analytderivaten in der Umweltanalytik	74
5.3.1	Charakterisierung mit RIFS	75
5.3.2	Implementierung der flexiblen Immobilisierung auf dem TIRF-Detektor	78
5.4	Entwicklung eines diagnostischen Assays zum Nachweis von Zöliakie auf der Basis einer Peptidoberfläche	85
5.4.1	Peptidimmobilisierung	85
5.4.2	Epitopmapping der Transglutaminase	88
5.4.3	Messung von Antikörpern in Blutserum mit dem parallelen RIFS-System	96
5.4.4	Patientenproben	101
5.5	Miniaturisierung von parallelem RIFS	105
6	Zusammenfassung und Ausblick	116
7	Literaturverzeichnis	120
8	Anhang	129
8.1	Abkürzungen	129
8.2	Publikationen	131
8.3	Akademische Lehrer	132
8.4	Lebenslauf	133

1 Einleitung

Die Entwicklung von Biosensoren ist gerade in den letzten Jahren intensiviert worden. Nach erfolgreichem Einsatz des Glucosesensors sind jetzt auch andere medizinischen Anwendungsbereiche des Biosensors von der Industrie aufgegriffen worden. So werden für DNA-Chips nach der Analyse des US-Unternehmens Front Line Strategie Consulting in den nächsten fünf Jahren Umsätze von 3.5 Milliarden \$ und für Proteinchips bis zum Jahre 2005 nach der Analyse des US-Konzerns Frost & Sullivan Umsätze von 5.8 Milliarden \$ erwartet. In Zukunft werden Biosensoren neben der medizinischen Analyse vor allem in der Lebensmittelanalyse eine Rolle spielen.

Ein Biosensor ist ein selbstständig arbeitendes, integriertes System bestehend aus den drei Komponenten: biologisches Rezeptorelement, Signalwandler (Transducer) und elektrische oder optische Ausleseeinheit [Thevenot_1999]. Die Rezeptoren sind mit dem Transducerelement direkt über chemische Immobilisierung oder indirekt durch Membraneinschluss verbunden. Durch die Wechselwirkungen von Molekülen mit der Rezeptorschicht entstehen Signale, die durch die Änderung von Schichtdicke, Brechungsindex, Lichtabsorption oder elektrische Ladung hervorgerufen werden. Diese Signale wandelt der Transducer in physikalisch erfassbare elektrische oder optische Signale um. Die Biosensoren sind einfach aufgebaut und damit geeignet für automatisierte Verfahren. Der Hauptvorteil von Biosensoren im Vergleich zu anderen klassischen Analysesystemen wie z.B. HPLC/GC ist die kurze Analysezeit. Damit ist ein Biosensor für eine Online-Überwachung in der Prozessanalyse oder als portables Umweltüberwachungssystem geradezu prädestiniert. Im Vergleich zu Chemosensoren erreichen Biosensoren auf Grund der biomolekularen Erkennung eine sehr hohe Selektivität und Sensitivität. Allerdings nimmt durch die Verwendung von Biomolekülen die Stabilität und die Reversibilität des Sensors ab. Nach Membransensoren und Immunosensoren ist mit der Entwicklung der 3. Generation der Biosensoren [Scheller_1989], der Biochips, das Potenzial der Biosensortechnologie auf die Gebiete der Erforschung von Krankheitsbildern und das Auffinden potentiellen Targets durch Expressionsanalyse, funktionelle Genomics und Proteomics erweitert worden [Hoheisel_1999] [Joos_2000]. Mit Biochips wird eine hohe Informationsdichte von bis zu 250000 Datenpunkten/cm² erreicht [Limieux_1998]. Für Applikationen im Bereich der DNA-Analytik werden jedoch Chips mit geringerer Dichte bevorzugt, da diese eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erreichen. Um diese Anforderungen an ein DNA-

Analysesystem zu erfüllen, werden zurzeit verschiedene Verfahren basierend auf der direkten Messung des Hybridisierungsereignisses oder aber indirekt über enzymatische Reaktionen z.B. Nukleasen entwickelt. Letztere versprechen eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit [Beier_2002],[Cho_2002]. In der Microarraytechnologie werden viele Spots auf einer kleinen Oberfläche beobachtet. Nur eine Probe kann analysiert werden. Die Entwicklung von miniaturisierten Systemen, mit denen mehrere Proben parallel auf einem Chip untersucht werden können, ist auf Grund von Schwierigkeiten bei der Mikrodosierung und der Notwendigkeit der Verwendung von Well-Strukturen noch nicht weit fortgeschritten. Die traditionelle 96er Mikrotiterplatte wird zwar inzwischen durch 384-Well Platten ersetzt, aber schon bei der Verwendung von 1536-Well Platten treten im kontinuierlichen Screening Probleme bei der genauen Quantifizierung auf. Systeme mit Volumina kleiner als 1 µl und einer Anzahl von 3456 Wells für den industriellen Einsatz sind in der Entwicklung [Schullek_1997][Mere_1999][Burbaum_1997].

Die Grundlage jedes Screening-Assays bilden spezifische Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Biologische Assays im High-Throughput sind bislang auf der Basis markierter Systeme z.B. mit radioaktiven oder fluoreszierenden Label entwickelt worden (Radioimmunoassay (RIA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Resonanzenergietransfer-Assay (RET-Assay)). Die biomolekulare Wechselwirkung kann jedoch durch die Markierung einer am Wechselwirkungsprozess beteiligten Komponente gestört werden. Bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen kann der Label z.B. die Struktur des Proteins verändern oder aber die Bindungsstelle blockieren. Somit können potentielle Kandidaten im pharmazeutischen Screening übersehen oder aber als zu gering affin eingestuft werden. Von besonderem Interesse sind daher Methoden, die Wechselwirkungen ohne Markierung von Protein oder Substrat nachweisen und außerdem miniaturisiert und hochparallel durchführbar sind. Der in dieser Arbeit verwendete markierungsfreie optische Sensor, die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), steht kurz vor der Markteinführung. Bei der Verwendung von markierungsfreien Biosensoren entfallen die aufwendige und kostspielige Synthese des Labels sowie die Markierung einer Komponente. In diesem System sind keine Wasch- und Blockierungsschritte nötig, so dass eine schnellere Assayoptimierung möglich wird. Weiterhin entfallen Probleme wie Quenchingeffekte oder auch Photobleaching.

Mit markierungsfreien optischen Biosensoren insbesondere der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie ist man in der Lage, hochparallel markierungsfrei biomolekulare Wechselwirkungen zu untersuchen. Damit können markierungsfreie Biosensoren im High-

Throughput Screening für die Suche nach Leitstrukturen eingesetzt werden [Birkert_2001]. Nachdem über die rasanten Fortschritte in der Molekularbiologie eine große Anzahl von Targetmolekülen gefunden wurden, kann über die Kombinatorische Chemie schnell eine Vielzahl von synthetisch hergestellten Verbindungen verschiedener Substanzklassen zur Verfügung gestellt werden. Von besonderem Interesse sind dabei Peptidbibliotheken und Bibliotheken von kleinen organischen Molekülen [Jung_1999] die sowohl für die Leitstruktursuche als auch für die Leitstrukturentwicklung eingesetzt werden. Somit ist die Entwicklung biologischer Assaysysteme auf Peptidbasis ein elementarer Bestandteil bei der Suche nach Leitstrukturen. Eine Voraussetzung zur gezielten Entwicklung von neuen pharmakologisch wirksamen Substanzen ist die Identifizierung der Bindungsstellen (Epitope) auf dem Target für z.B. einen Antikörper oder einen Liganden. Dazu führt man ein Epitopmapping durch, bei dem verschiedene Peptidsequenzen in bestimmter Anordnung auf Bindung des Antikörpers untersucht werden.

Da hier besonders bei den kleinen Peptidsequenzen eine Markierung einen starken Einfluss auf das Ergebnis haben kann, werden in zunehmendem Maße markierungsfreie Systeme nach dem Prinzip eines Bindungshemmtestes eingesetzt. Die eigentliche Erkennungsreaktion findet in Lösung ohne Markierung statt. Die restlichen nicht gebundenen Biomoleküle werden detektiert. So wurden viele Epitopstudien inzwischen mit Hilfe des BIAcore-Systems durchgeführt, mit dem vier Proben gleichzeitig vermessen werden können [Fängerstam_1990],[Johne_1993],[Nice_1993],[Laricchia_2001],[Wegner_2002]. Die markierungsfreie Methode der RIFs bietet sich hierzu besonders an, da diese Methode bereits parallelisiert werden konnte. Ist das Epitop eines Targets gefunden, kann ein diagnostischer Test auf der Basis der gefundenen Peptidsequenz entwickelt werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung der kurzen Peptidsequenzen als einziger Erkennungsstruktur im diagnostischen Assay ist das Vorliegen eines linearen Epitops. Ist das Epitop nicht durch die Sequenz, sondern durch die 3D-Struktur des Targetmoleküls festgelegt, können keine einfachen Peptidsequenzen verwendet werden. Bei einem solchen konformationellen Epitop müssen größere Strukturen, welche die strukturelle Form der Bindungsstelle simulieren, zum Einsatz kommen.

In neuerer Zeit werden auch Proteinchips erfolgreich für die Autoimmundiagnostik eingesetzt. Von Joos et al. wurde ein auf ein Microarray übertragener ELISA etabliert [Joos_2000]. Von Robinson wurde ein auf Peptiden basierender Chip zur schnellen Identifizierung von mit Autoantikörpern assoziierten Antigenen für die frühe Diagnose und zur Charakterisierung der Spezifität, Diversität und Epitopverteilung der Autoantikörper entwickelt [Robinson_2002]

Wenn ein Assaysystem auf Peptidbasis auf einem markierungsfreien Biosensor entwickelt werden soll, wird in der Regel das Peptid als das kleinere Molekül an der Oberfläche immobilisiert. Das Peptid kann über eine einfache Immobilisierungsstrategie und mit hoher Bindungskapazität an die Oberfläche kovalent gebunden werden. Das größere Targetmolekül, in der Regel ein Protein, kann dann für die Detektion genutzt werden, womit eine wesentlich größere Sensitivität erzielt wird. Eine wichtige Voraussetzung ist daher die Entwicklung von stabilen, regenerierbaren, hoch sensitiven und selektiven Peptidsensoroberflächen insbesondere im Hinblick auf den Einsatz peptidfunktionalisierter Sensoroberflächen für die Diagnostik.

Da sich Peptide und damit auch Peptidoberflächen als sehr stabil erwiesen haben, finden auch peptidähnliche Strukturen immer weitere Anwendung in der Biosensorik. Mit der Peptidnukleinsäure (PNA), welche 1991 von Nielsen synthetisiert wurde [Nielsen_1991] steht ein Peptidmolekül zur Verfügung, welches in biologischen Assays und auf Sensoroberflächen die DNA ersetzen kann. Es wird erwartet, dass mit der Verwendung von PNA auf Grund ihrer Struktur selektivere und stabilere Oberflächen anstelle der instabilen DNA-Oberflächen zur Verfügung stehen. Damit sind dann in Zukunft auch die DNA-Diagnostik und die Expressionsanalyse auf der Basis von Peptidstrukturen möglich. Im Weiteren lassen sich PNA-Moleküle auch zur Stabilisierung und Flexibilisierung eines Sensors in der Umweltanalytik einsetzen.

2 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der dargestellten Situation sollten Assaysysteme auf peptidfunktionalisierten Oberflächen entwickelt werden, die in der DNA-Analytik, Umweltanalytik sowie der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden können. Dazu sollten prinzipiell zwei Peptidmolekülstrukturen verwendet werden.

Die Peptidnukleinsäure sollte im BMBF Projekt nanoMAP (FKZ:0312001B) zur Entwicklung eines DNA-Analyse-Systems eingesetzt werden. Nukleasereaktionen sollten genaue Quantifizierungen des Hybridisierungsereignisses ermöglichen. Da die PNA im Gegensatz zur DNA von Nukleasen nicht angegriffen wird, sollte mit Hilfe der PNA eine stabile und zum mehrfachen Einsatz geeignete Oberfläche entwickelt und charakterisiert werden. Anschließend sollte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung des Hybridisierungsereignisses mit diesem Assaysystem möglich ist. Gleichzeitig sollte die entwickelte PNA-Oberfläche im

BMBF-Projekt PIWAS (FKZ:02WU0243) eingesetzt werden, um über eine flexible Immobilisierung durch Hybridisierung unterschiedlicher DNA Konjugate die Erfassung von vielen Analyten mit der gleichen Oberfläche in der Umweltanalytik zu gewährleisten. Hierzu musste die entwickelte Oberfläche auf den nach dem TIRF-Prinzip arbeitenden Wasseranalysator übertragen und darauf der Assay zur Detektion unterschiedlicher Analytderivate etabliert werden.

Ebenfalls auf der Basis von Peptidoberflächen sollte im AiF-Projekt MF-HTS (FKZ:13130N/1) mit RIfS ein zweiter diagnostischer Assay zur Detektion von Antikörpern, welche in Zusammenhang mit der Autoimmunkrankheit Zöliakie stehen, entwickelt werden. Mit einem Epitopmapping sollte die Bindungsstelle für einen Antikörper auf dem Targetmolekül der Transglutaminase identifiziert werden. Dafür sollte das parallelisierte RIfS-System eingesetzt und die Aussagesicherheit des Systems überprüft werden. Auf der Basis dieses Systems sollte dann der Nachweis von Antikörpern in Blutseren erfolgen. Zur Erfassung aller in Patientenseren vorkommenden Antikörper gegen Transglutaminase sollte das Enzym selbst kovalent an die Oberfläche gebunden und Blutseren vermessen werden. Für das Screening von vielen Patientenseren auf der Basis einer Peptidoberfläche ist nach der Parallelisierung von RIfS eine konsequente Miniaturisierung von RIfS in Well-Strukturen unumgänglich. Das miniaturisierte System basierend auf Kavitätenstrukturen sollte in dieser Arbeit aufgebaut und erste Messungen sollten gezeigt werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Biochemische Grundlagen

3.1.1 Biomolekulare Wechselwirkungen

In der Natur und damit auch beim Menschen basieren viele biochemische Prozesse auf der nicht kovalenten Wechselwirkung von Biomolekülen miteinander. Im Gegensatz zur kovalenten Bindung sind die nicht kovalenten biomolekularen Wechselwirkungen in der Regel reversibel. Die Reversibilität dieser Wechselwirkungen ist ein Grundprinzip, ohne das kein Leben existieren kann. Zusätzlich sind die biomolekularen Wechselwirkungen sehr spezifisch. Bei Nukleinsäuren zeigt sich die Spezifität der Bindung durch die exakte Erkennung einer Basenreihenfolge. Beim Austausch einer Base sinkt die Affinität der Bindung sehr stark. Bei Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen werden nur wenige Liganden (niedermolekulare Verbindungen, z.B. ein Peptid) mit ähnlicher räumlicher Struktur von einem Rezeptor (Protein) erkannt. Die Substratspezifität gibt an, wie gut der Rezeptor genau einen Liganden von anderen unterscheiden kann. Eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung mit einer sehr hohen Substratspezifität ist die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung.

Die biomolekularen Wechselwirkungen teilt man in verschiedene Bindungstypen ein (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Attraktionskräfte biomolekularer Wechselwirkungen und Bindungsenergien (ΔH) in wässriger Umgebung [Alberts_1990]

<i>Attraktionskraft</i>	<i>Abstandsabhängigkeit</i>	<i>Energie [kJ/mol]</i>	<i>Beispiel</i>
Elektrostatische Coulomb-Wechselwirkungen (ionische)	r^{-2}	12.5	konjugierte Systeme
Wechselwirkung induzierter Dipole (Van der Waals Kräfte)	r^{-10}	0.4	
Wasserstoffbrückenbindungen	r^{-6}	4	Nukleotide
Hydrophobe Wechselwirkungen	Keine diskrete Abhängigkeit-	-	Alkylketten z.B. in Fettsäuren
Zum Vergleich : kovalente Bindungen	-	200- 500	C-C

Im Vergleich zur kovalenten Bindung sind die Bindungsenergien der biomolekularen Wechselwirkung nicht sehr stark. Die Summe der nicht kovalenten Kräfte ermöglicht jedoch trotzdem eine sehr starke Bindung, die z.B. im Falle des Ligand-Rezeptorpaars Biotin-

Avidin mit einer Affinitätskonstante von $K = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [Livnah_1993] und einer Bindungsenergie von ca. 88 kJ/mol [Richards_1990] fast an eine kovalente Bindung heranreicht.

Bei der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor müssen aber auch repulsive Kräfte überwunden werden. Die abstoßenden Kräfte entstehen zum einen durch die nach Pauli zur Durchdringung von Elektronenhüllen in unbesetzte Orbitale notwendige Anregungsenergie, die in einer räumlichen Distanz von r^{-9} bis r^{-12} wirkt, sowie durch die in wässriger Umgebung vorliegenden Abstoßungen hydrophiler solvatisierter Moleküle. Die Abstandsabhängigkeit besonders der Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Kräfte zusammen mit den repulsiven Kräften erzwingt eine räumlich genau komplementäre Wechselwirkungsfläche der beiden Bindungspartner. Bei einer bestimmten sterischen Anordnung sind die repulsiven Kräfte minimal und die attraktiven Kräfte maximal. Die Bedingung der genau passenden Raumstruktur führt zur hohen Selektivität der biomolekularen Wechselwirkung.

Hydrophobe Wechselwirkungen treten in wässriger Umgebung z.B. bei Protein-Protein-Interaktionen durch die Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche auf, wodurch eine Entropiezunahme im System durch Orientierungsverlust der verdrängten Wassermoleküle entsteht. Auf ionischen Wechselwirkungen beruhende Interaktionen sind sehr stark von der Ionenstärke und damit dem pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig. Veränderungen des Mediums, pH-Wert Änderungen oder auch die Änderung der Hydratisierung z.B. durch chaotrope Substanzen senken die Bindungsstärke der biomolekularen Wechselwirkung und erleichtern die Trennung der Bindungspartner.

3.1.2 Antisense-Technologie

Die Spezifität und Reversibilität als das Ergebnis der Summe der biomolekularen Wechselwirkungen bilden die Grundlage für die Prozesse der Transkription und Translation der Proteinbiosynthese. Bei Krankheiten wie z.B. Krebs kann durch einen Eingriff in die Proteinbiosynthese eine Weiterentwicklung der Krankheit gestoppt bzw. eine Heilung erzielt werden. In der Antisense-Technologie werden hierfür synthetische Oligonukleotide verwendet.

Dabei werden im Prinzip zwei Methoden verfolgt:

1. Durch die Applikation von Antisense-Nukleotiden wird im Cytoplasma der Translationsprozess und damit die Bildung von am Krankheitsgeschehen beteiligten Proteinen durch die Hybridisierung der Antisense-Nukleotide an die mRNA verhindert. Als möglicher weiterer Mechanismus kann dann eine Aktivierung der

RNaseH durch die Bildung des RNA/DNA-Hybrides erfolgen, wodurch die DNA/RNA-Hybride durch die RNaseH katalytisch gespalten werden.

2. Oligonukleotide, die spezifisch für die weniger mit Proteinen besetzten Promotorregion von am Krankheitsgeschehen beteiligten Genabschnitten ausgewählt werden, binden an die doppelsträngige DNA im Zellkern unter Ausbildung von Triplex-Strukturen und verhindern so die Transkription. Hier wird vor allem die Bindung von Transkriptionsfaktoren und der DNA-Polymerase unterbunden.

Das Ziel der Antisense-Technologie liegt vor allem in der Verhinderung von Tumorwachstum sowie in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen und viralen Infektionen, wie z.B. HIV. Um diese Ziele zu verwirklichen, sind verschiedene pharmakologisch relevante Faktoren zu untersuchen:

Pharmakodynamik:

1. Selektivität und Affinität zu den Target-Sequenzen,

Pharmakokinetik:

2. metabolische Stabilität der Antisense-Nukleotide,
3. Aufnahme der Antisense-Nukleotide in die Zelle.

Die Selektivität ist durch die Targetsequenz gegeben. In den letzten 20 Jahren ist sehr viel Forschungspotenzial in die Entwicklung von modifizierten Nukleotiden geflossen, die eine hohe Affinität und metabolische Stabilität der Antisense-Nukleotide gewährleisten. Natürliche DNA oder RNA wird von Nukleasen abgebaut und lässt sich nur schwer von Säugetierzellen absorbieren. Drei Generationen von modifizierten Oligonukleotiden wurden synthetisiert: 2'-Desoxyoligonukleotid Phosphothioate, 2'-Desoxyoligonukleotid Methylphosphonate und Peptidnukleinsäuren (PNA).

Phantheo (Copenhagen, Dänemark) hat eine Sublizenz von ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, CA) für die Entwicklung von Antibiotika auf der Basis von Antisense-PNA erhalten. Klinische Studien sind in Planung. Das Problem ist die schwierige Pharmakokinetik. Jedoch wurde im Gegensatz zu anderen Antisense-Entwicklungen der mögliche Einsatz von PNA im Bereich der Erkrankungen des Zentralen Nervensystems in Aussicht gestellt, da das Passieren der Blut-Hirnschranke nachgewiesen wurde [During_1999].

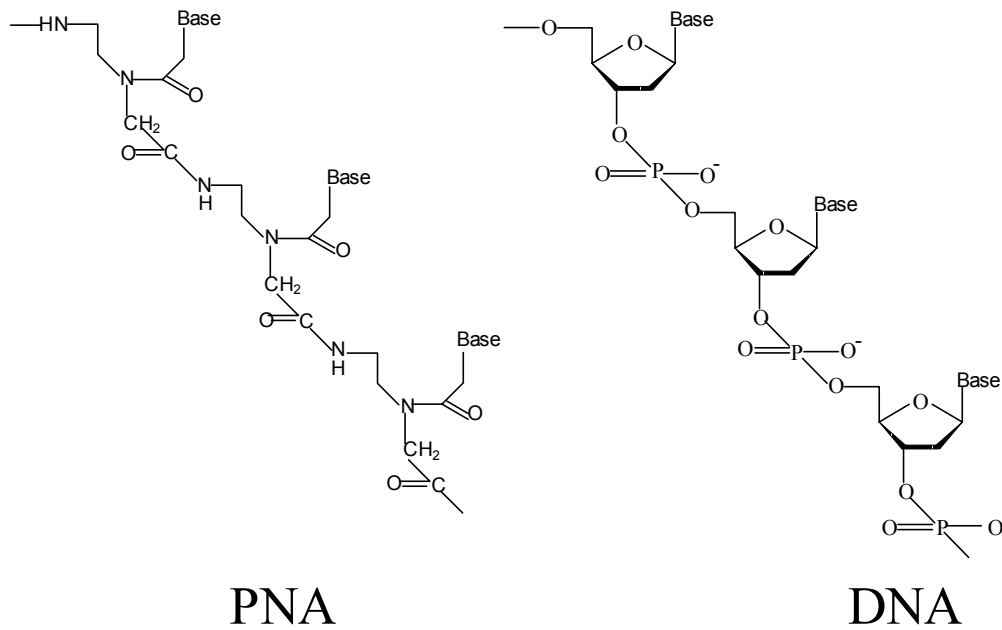
Um die Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide in die Zelle zu gewährleisten, sind ebenfalls verschiedene Strategien untersucht worden. Die Modifizierung von Nukleotiden mit Poly-L-Lysin ist eine Möglichkeit der unspezifischen adsorptiven Endocytose, die modifizierten Nukleotide sind jedoch in einigen Fällen toxisch. Peptide mit Poly-L-Lysin Abschnitten sind in ähnlicher Weise geeignet, Nukleotide in die Zelle einzuschleusen

[Bongardt_1999]. Solche Signal-Sequenz-Oligonukleotid-Konjugate sind möglicherweise in der Lage, unter Ausnutzung von Transmembran- und intrazellulären Transportmechanismen die Einschleusung von Antisense-Oligonukleotiden in die Zelle zu verbessern. Gleichzeitig bieten die Peptide einen Schutz vor Nukleasen.

Nach anfänglicher Euphorie ist in der Antisense-Technologie die Realität eingeleitet. Antisense-Wirkstoffe der ersten Generation wirken nicht über die spezifische Blockade von DNA-Sequenzen, sondern hauptsächlich über Cytosin-Guanidin Dinukleotide, welche vermehrt in viralen und bakteriellen Sequenzen vorkommen. Mit der Applikation dieser Antisense-Sequenzen wird unspezifisch das Immunsystem stimuliert. Dennoch sind inzwischen viele Wirkstoffe in die klinischen Phasen 2 bzw. 3 eingetreten. Die neueste Entwicklung sind interferierende RNA-Sequenzen (RNAi). Diese vermindern effektiv und spezifisch die Bildung einer bestimmten mRNA, wobei der Mechanismus noch unbekannt ist. Kurze (short) RNAi-Sequenzen zwischen 21 und 23 Basenpaaren (siRNA) lassen sich jetzt auch in Säugetierzellen einsetzen [Elbashir_2001],[Dove_2002].

3.1.3 Peptidnukleinsäure

In Kapitel 3.1.2 wurde die Herkunft der PNA aus der Antisense Technologie erklärt. Die Vorteile der PNA mit ihrem Peptid-Rückgrat lassen sich jedoch nicht nur als mögliche Therapeutika, sondern auch in der DNA-Chiptechnologie [Wang_1999] und als Anker-moleküle allgemein in der Biosensorik nutzen. In der Entwicklung von DNA-Arrays auf der Basis von PNA sei hier auf die Arbeiten in der Gruppe des Krebsforschungszentrums Heidelberg von Prof. Dr. J. Hoheisel verwiesen [Matysiak_2001]



PNA

DNA

Abbildung 1: Chemische Struktur eines Ausschnitts aus einem PNA- und einem DNA-Einzelstrang zum Vergleich

Die PNA wurde zuerst 1991 von Peter Nielsen synthetisiert [Nielsen_1991],[Nielsen_1994]. Sie verfügt statt des Zuckerphosphatrückgrates der DNA, wie Abb. 1 zeigt, über ein Rückgrat, bestehend aus N-(2-aminoethyl)-Glycin Einheiten. Die Monomere sind über Peptidbindungen verknüpft. Die Basen sind über einen Acetat-Linker an dieses Rückgrat gebunden. Hybridisierungsstrukturen von DNA und PNA in homogener Phase sind vielfach untersucht worden. Eine Kristallstruktur liefert [Vlassov_1997]. PNA/DNA Hybride bilden eine ähnliche Struktur aus wie doppelsträngige DNA.

Die Vorteile des Einsatzes der PNA, die sich aus der chemischen Struktur ergeben, sind:

1. Auf Grund ihres rein synthetischen Charakters wird die PNA weder von Nukleasen noch von Proteasen angegriffen.
2. Die Affinitätskonstante der PNA/DNA Hybridisierung ist in Abhängigkeit von der Länge und der Sequenz um bis zu einen Faktor 10 größer als die der DNA/DNA Hybridisierung gleicher Sequenz [Kröger_1998].
3. Auf Grund der höheren Affinität können höhere Hybridisierungstemperaturen gewählt werden. Die Schmelztemperatur T_M eines PNA/DNA Hybrides ist pro Base etwa um 1°C höher im Vergleich zu einem DNA/DNA Hybrid [Beier_1999]. Dies macht stringenter Hybridisierungsbedingungen möglich, und damit wird eine bessere Unterscheidung von Perfect Match zu Mismatch (Diskriminierung) möglich.
4. Auch unter gleichen Hybridisierungsbedingungen ist die Diskriminierung der PNA/DNA besser.

5. Die PNA kann auch in salzarmer Umgebung wegen fehlender Rückgratladung im Gegensatz zur DNA oder RNA noch Hybride ausbilden [Egholm_1993]. Die Hybridisierung bei niedrigen Salzkonzentrationen öffnet potenzielle Sekundärstrukturen innerhalb der Target-Moleküle und ermöglicht so den Zugang zu sonst verborgenen Sequenzen. Dies geschieht durch Ausbildung von Triplexstrukturen über so genannte Hoogsteen Basenpaarungen [Lottspeich_1998].
6. Auf Grund der höheren Affinität ist die direkte Hybridisierung mit doppelsträngigen Amplikons aus der Polymerasekettenreaktion (PCR) ohne vorherige Denaturierung der Doppelstränge möglich. Dies erspart umfangreiche Reinigungsschritte nach der PCR [Sawata_1999]. Weiterhin wird insbesondere in der Impedanzspektroskopie [Albers_2000] oder adressierbaren Biochips [Gilles_1999] versucht, die DNA-Hybridisierung an eine PNA über die Veränderung der Ladung zu detektieren.

3.1.4 DNA-Chiptechnologie

Mit dem Abschluss der Human Genom-Projektes (HUGO), den ersten Sequenzierungen des Mausgenoms [Gregory_2002], sowie von bakteriellen Genomen [Tomb_1997] stehen viele Sequenzdaten zur Verfügung, von denen allerdings nur ein geringer Prozentsatz einer genauen Funktionalität zugeordnet werden kann. Mit der Entwicklung der DNA-Chips, welche schon in den achtziger Jahren von Fa. Roche forciert wurde, wurde ein Tool entwickelt, mit dem sich viele Fragestellungen hinsichtlich der Funktionalität beantworten lassen. DNA-Chips sind in der Regel planare Glas-Objektträger, auf denen bekannte DNA-Sequenzen (Expressionstags (ESTs)) aufgespottet werden. Hier wird zwischen „high-density“- und „low-density“- Microarrays unterschieden. Erstere werden vorzugsweise für die Genexpressionsanalyse eingesetzt. Bei der Genexpressionsanalyse wird das An- und Abschalten der Gene beobachtet, z.B. wird eine Krebszelle mit einer gesunden Zelle verglichen, um die Gene zu identifizieren, welche an der Krebsentstehung beteiligt sind. Nach der Hybridisierung der Proben-DNA auf dem Chip und anschließenden Waschschritten erhält man ein Muster von hybridisierten und nicht hybridisierten Spots. Um zusammenhängende Gene zu erkennen, ist es nötig, eine möglichst hohe Anzahl von unterschiedlichen Sequenzen auf einen Objektträger aufzuspotten und diesen mit einer Probe zu hybridisieren. Um nun eine gesicherte Aussage über eine Regulation der Genexpression zu erhalten, wäre es wünschenswert, die RNA aus der Zelle zu isolieren und direkt zu vermessen. Dies ist zwar für einige biologische Systeme, wo eine große Anzahl von Zellen im gleichen Zustand vorhanden sind, möglich. Jedoch für besonders relevante z.B. regulatorische Gene ist diese Methode

noch nicht geeignet, da der Expressionslevel zu niedrig ist. Deshalb wird eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zwischengeschaltet. Die Quantifizierung des Expressionslevels einzelner Gene ist nur mit einer quantitativer PCR möglich, die erst seit drei Jahren mit den Systemen des Lightcyclers von Roche und des Taqman Systems von Applied Biosystems (siehe unten) zur Verfügung steht.

Die „low-density“ Microarrays werden für diagnostische Zwecke eingesetzt. Hier sind die Gene und ihre Mutationen, die am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, bekannt. Bei diesen Systemen ist eine sehr genaue quantitative Aussage nötig. Obwohl aus ethischen Gründen heftig umstritten, wird viel Geld und Zeit in die Entwicklung dieser Analysesysteme investiert, um in Zukunft eine schnelle Krankheitsanalyse aber auch bessere medikamentöse Abstimmungen zu erzielen. Hier sind vor allem die Probleme der Genauigkeit, Wiederholbarkeit und Richtigkeit der Experimente noch nicht gelöst. Zudem sollen möglichst viele Patientenproben gleichzeitig auf verschiedene Gensequenzen getestet werden. Dafür reichen einfache planare Objektträger nicht mehr aus. Es sind Systeme gefordert, die zuverlässig mit kleinen Probenmengen viele Proben auf viele Sequenzen testen.

3.1.5 Nukleasen in der DNA-Analytik

Die natürliche Funktion von Nukleasen ist die Zerschneidung und damit Zerstörung von Fremd-DNA oder RNA in einem Lebewesen. Die Molekularbiologie hat sich die Eigenschaft des spezifischen Schneidens von Nukleasen zu Nutze gemacht. So sind die Nukleasen heute eines der wichtigsten Werkzeuge eines jeden Molekularbiologen/Molekulargenetikers bei der Klonierung/Proteinexpression sowie der DNA-Analytik. Viele Assaysysteme in homogener Phase sind beschrieben worden, in denen Nukleasen spezifisch für Sequenzunterscheidung und Quantifizierung eingesetzt werden [Shifman_2002]. Im Taqman-System werden sie für die genaue Quantifizierung von PCR Amplikons eingesetzt. In diesem 5'-Nuklease Assay wird die Exonukleaseaktivität der für die PCR eingesetzten Taq-Polymerase genutzt, um Sonden-DNA während der Polymerasereaktion hydrolytisch zu zerschneiden. Die Sonden-DNA trägt ein FRET-Donor-Akzeptorpaar [Livak_1995]. Für jeden neu entstandenen DNA Strang wird eine Hybridisierungssonde zerschnitten und die beiden Farbstoffe voneinander getrennt, so dass ein Fluoreszenzsignal entsteht [Morin_1999].

Bei den ersten Versuchen der Beobachtung von Nukleaseaktivität auf einem Chip wurden ionische Oberflächen eingesetzt, an die die DNA ionisch gebunden war. Zum einen wurde dadurch die Zugänglichkeit der Nukleasen zur immobilisierten DNA erschwert, und zum anderen konnte selbst im Falle eines Schneidereignisses die geschnittene DNA nicht von der

Oberfläche entfernt werden, da sie „kleben“ blieb. Nukleaseaktivität auf einem Chip wurde erstmals von Bier et al. mit einem Sensorsystem beobachtet [Bier_2002]. Hier wurden DNA Moleküle auch als Anker-moleküle an der Oberfläche eingesetzt, so dass nur eine Messung pro Chip erfolgen konnte. Weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Nucleasen führen in den Bereich der Untersuchung von DNA Reperaturmechanismen [Einolf_2000].

Exonuklease III aus *Escherichia coli* ist eines der wichtigsten Reparaturrestriktionsenzyme dieses Bakteriums. Änderungen einzelner Basen, wie sie durch spontane oder enzymatische Entfernung von Uracil oder durch Oxidation durch alkylierende oder ionisierende Substanzen entstehen, werden von der Exonuklease III erkannt und die Nucleotide herausgeschnitten. Anschließend werden die Nucleotide durch neue ersetzt. Die Exonuklease zeigt Funktionen als 3' Reparatur Diesterase, 3'-5' Exonuklease, 3' Phosphomonoesterase und Ribonukleaseaktivität. Die Kristallstruktur wurde von Moll et al. aufgeklärt [Moll_1995]. Das Enzym verfügt über eine konservierte Sequenz, ähnlich der Endonuklease Sequenz von DNA Polymerase I und damit über eine Endonukleaseaktivität. Als divalente Metallionen spielen vor allem Magnesium aber auch Calcium, Zinn und Mangan eine Rolle. Der Angriff der Nuklease auf die DNA ist ein nukleophiler Angriff von Histidin 259 über ein Wassermolekül an die PO_3^- -Bindung. Mg^{2+} als Cofaktor gebunden von Glutamin 34 interagiert mit negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und unterstützt so den nukleophilen Angriff.

3.1.6 Einsatz der PNA zur Detektion von Pestiziden und estrogenen Wirkstoffen

Neben dem Einsatz der PNA in der Expressions- und Mutationsanalyse kann die PNA aber auch als Anker-molekül für eine flexible Immobilisierung auf verschiedenen Biosensoren eingesetzt werden. Dies wird in dieser Arbeit am Beispiel der Umweltanalytik anhand von estrogenen Substanzen und Pestiziden mit estrogenen Wirkung demonstriert. Daher wird hier eine kurze Einführung in Substanzen mit estrogenen Wirkung gegeben.

Endokrine Disruptoren

Chemikalien mit estrogenen Wirkung und ihre schädlichen Eigenschaften sind erst seit etwa 40 Jahren bekannt. Diese sogenannten „endocrine disruptors“ (ED) oder auch Xenoestrogene greifen in bestimmter Weise in den Hormonhaushalt ein, indem sie den Effekt endogener Hormone imitieren (z.B. das synthetische Sexualhormon Ethinylestradiol (Antibaby-Pille)), die Bildung der natürlichen Hormone verhindern oder aber den Abbaumetabolismus der endogenen Hormone stören [Sonnenschein_1998]. Durch die unkontrollierte Freisetzung der endokrinen Disruptoren entstehen gesundheitliche Schäden für Tiere [Gilbertson_1991]. Es

kam bei Frauen, deren Mütter während der Schwangerschaft mit Diethylstilbestrol behandelt wurden, zu Vaginalkrebs [Ben-Jonathan_1998]. Eine Verweiblichung bei Tieren durch in die Umwelt eingeführte estrogene Substanzen wurde bei [Gimeno_1996] aufgezeigt. Inzwischen wird auch ein Einfluss auf den Rückgang der Spermienzahl beim Mann kaum noch abgestritten [Carlsen_1999][Colborn_1996]. Die EDs entfalten ihre schädlichen Wirkungen weit unterhalb der jeweiligen akuten Toxizitätskonzentration. Da die endokrinen Disruptoren wie Hormone wirken, können schon Konzentrationen von 10^{-12} - 10^{-15} g/l Auswirkungen auf den Hormonhaushalt eines Menschen haben. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen mit estrogener Wirkung sind Estron als das natürliche Estrogen, Ethinylestradiol als synthetisches Estrogen und Bisphenol A als Xenoestrogen.

Erreichte Nachweisgrenzen und Richtlinien:

Pestizide:

Der maximale Wert von Simazin als einzelnes Pestizid für Trinkwasser liegt nach der Trinkwasserverordnung von 1998 bei 0.5×10^{-3} μ M (98/83EC). Simazin weist ebenfalls eine schwache estrogene Wirkung auf [Hilscherova_2000].

Endokrine Disruptoren:

Die in Kläranlagen nachgewiesenen Konzentrationen liegen für Estron bei 1-76 ng/l, für Estradiol bei 4-48 ng/l und für Ethinylestradiol bei 0.2-7 ng/l [Desbrow_1998].

In Oberflächen- und Trinkwasser sind die Estrogenkonzentrationen mit unter 5 ng/l etwas niedriger [Kuch_1999].

Mittels Konzentrierung der Proben und anschließender LC/MS/MS konnten eine Nachweisgrenze von 0.3 ng/l im Flusswasser erreicht werden [Tajima_2000]. Mit einem kompetitiven Radioimmunoassay nach Konzentrierung und HPLC wurde eine Nachweisgrenze von 0.107 ng/l für Estradiol erzielt [Snyder_1999].

3.1.7 Autoimmunerkrankung Zöliakie

Zusätzlich zur PNA wurden in dieser Arbeit weitere Peptidoberflächen zur Entwicklung eines Assays zum Nachweis der Autoimmunerkrankung Zöliakie eingesetzt.

Allgemein ist eine Autoimmunerkrankung eine fehlgeleitete adaptive Immunantwort, die sich spezifisch gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) richtet. Bei einer normalen adaptiven Immunreaktion werden die Fremdantigene durch die Zerstörung von virusbefallenen Zellen durch zytotoxische T-Zellen und durch die Bindung der löslichen Antigene durch Antikörper aus dem Körper entfernt. Hingegen sind die meisten Autoimmunerkrankungen chronisch, da die vollständige Entfernung des körpereigenen Autoantigens nicht gelingt. Bekannte

Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, Morbus Basedow, Rheumatoide Arthritis und Insulinabhängige Diabetes. Zur Verhinderung der Selbstreaktivität des Immunsystems sind normalerweise verschiedene Kontrollmechanismen vorhanden. Bei der klonalen Deletion werden autoreaktive T-Zellen deletiert. Zusätzlich gewährleisten Kontrollen wie die extrathymische T-Zell Deletion und Anergie von peripheren T-Zellen die Toleranz gegenüber körpereigenen Stoffen. Erst wenn diese Kontrollmechanismen versagen, kann es zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen kommen, wie es bei etwa 5 % der Erwachsenen in den Industrieländern der Fall ist. Zwar sind bei den meisten Erkrankungen die assoziierenden Autoantigene bekannt wie z.B. ein Immunoglobulin FC in Gelenkkapselmembranen für die Rheumatoide Arthritis oder Insulin und der Insulin-Rezeptor, jedoch ist die Induktion der Krankheit noch nicht geklärt. In Frage kommen immunologische und genetische Faktoren sowie Umweltfaktoren [Deng-1993]. Hormonelle Einflüsse, aber auch Stress, können mögliche Auslöser sein. Verschiedene Hypothesen werden von Bach beschrieben [Bach_1998]. Über ein molekulares Mimikry, bei der beispielsweise Viren die Strukturen von körpereigenen Antigenen imitieren, wird die Immunantwort auf diese körpereigene Struktur gerichtet [Wucherpfennig_1995]. So kann eine mögliche Induktion einer Autoimmunantwort durch eine Infektion mit Krankheitserregern erfolgen.

Eine sehr häufig auftretende Autoimmunerkrankung ist Zöliakie mit der 0.5 % der Menschen in Europa geboren werden, wobei in den skandinavischen Ländern der Prozentsatz noch höher liegt. Zöliakie ist eine chronische Erkrankung des Dünndarms und äußert sich in den nicht sehr spezifischen Symptomen wie Diarrhö, Steatorrhö und Gewichtsverlust, verursacht durch eine Schädigung der Mucosa des Dünndarms, was eine schlechtere Nahrungsaufnahme bewirkt. Zusätzlich kann man eine Infiltration der Lamina propria durch Lymphocyten, Makrophagen und Plasma-Zellen beobachten. Da die Symptome nicht sehr spezifisch sind, kann Zöliakie nur durch Biopsie, den histologischen Befund, nachgewiesen werden [Marsh_1992]. Patienten mit nicht bekannter Zöliakie haben zusätzlich zu den oben beschriebenen Symptomen außerdem ein stark erhöhtes Risiko für Lymphoma, gastrointestinale und ösophagale Karzinome. Therapiemöglichkeiten sind nicht vorhanden. Es ist jedoch in diesem besonderen Fall der Autoimmunerkrankung sowohl das Autoantigen als auch der induzierende Faktor bekannt. Ausgelöst wird die Erkrankung durch die Aufnahme von Glutenprotein aus Weizen und Gerste. Das Auftreten der Erkrankung wurde schon 1888 beschrieben. Der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Getreide und dem Ausbruch der Erkrankung wurde 1950 hergestellt. Durch die Auftrennung der im Weizen vorkommenden Proteinfractionen wurde der Einfluss von Gluten festgestellt, wobei hierin

noch zwei Fraktionen, die alkohllöslichen Gliadine und die alkoholunlöslichen Glutenine unterschiedenen werden. Ein Kennzeichen der Glutenproteine ist der sehr hohe Anteil an Glutamin und Prolin. Trotz der Auslösung von Zöliakie durch einen exogenen Stoff spricht man nicht von einer Allergie, da keine IgE-Immunantwort erfolgt und die Krankheit sehr langsam verläuft. Einen Überblick über die verschiedenen Aspekte der Krankheit und der Rolle der MHC II Moleküle liefert Sollid [Sollid_2000].

Da in der Praxis die Zöliakie im Moment nur durch eine Biopsie (Gewebeentnahme) festgestellt werden kann, wird nach schnelleren und einfacheren Diagnoseverfahren gesucht. Diesem Ziel ist man durch die Identifizierung der Gewebstransglutaminase als Autoantigen einen Schritt näher gekommen [Dieterich_1997]. Im Gewebe katalysiert das Enzym die posttranslationale Bildung eines Isopeptids zwischen Glutaminsäure und Lysin zu einer $\epsilon(\gamma\text{-Glutamy})$ Lysin Bindung. In Abwesenheit entsprechender Substrate katalysiert sie aber auch die Hydrolyse von Glutaminseitenketten, was zu einer spezifischen Deamidierung führt [Molberg_1998].

Die Gewebstransglutaminase wird durch einen Antikörper erkannt. Dabei bildet sich ein antigener Komplex bestehend aus der Transglutaminase, dem Antikörper und dem Gliadinpeptid, der als Ursache für die Zöliakie angesehen wird [Marsh_2000]. Der Antikörper vom Subtyp IgA kommt spezifisch in Patienten mit akuter Zöliakie vor. Es existieren ELISA-Tests, mit denen diese Antikörper mit einer Sensitivität von 95 % und einer Spezifität von 94 % nachgewiesen werden können. Immobilisiert wird in diesem Test die gesamte Transglutaminase, die zuvor durch Expression gewonnen werden muss. Ein Ziel ist, diese mühsame und kostenaufwendige Expression durch einfache Peptidsynthese zu ersetzen. Dazu ist ein Epitopmapping der Transglutaminase mit α -Transglutaminase-Antikörpern nötig, um die entsprechend affine Peptidsequenz der Transglutaminase zu finden. Allerdings muss man beachten, dass *in vivo* Antikörper gegen unterschiedliche Peptidsequenzen auf der Transglutaminase entstehen.

Zusätzlich zu den Antikörpern gegen die Transglutaminase bilden sich im Patienten jedoch auch Antikörper gegen das induzierende Agens, die Gliadinpeptide. Jedoch kommen diese Antikörper auch bei anderen Krankheiten vor, bei denen die Mucosa beschädigt wird. Die Antikörper sind daher nicht sehr spezifisch. Werden die Gliadinpeptide zusammen mit den Peptiden aus der Transglutaminase in einem Assay verwendet, können sie jedoch sehr zur Aussagekraft des Testes beitragen. Es wurden inzwischen deamidierte Peptidsequenzen aus der Familie der γ -Gliadine gefunden, bei denen die Bindung von Antikörpern mit der Erkrankung korreliert [Mülbe_2001].

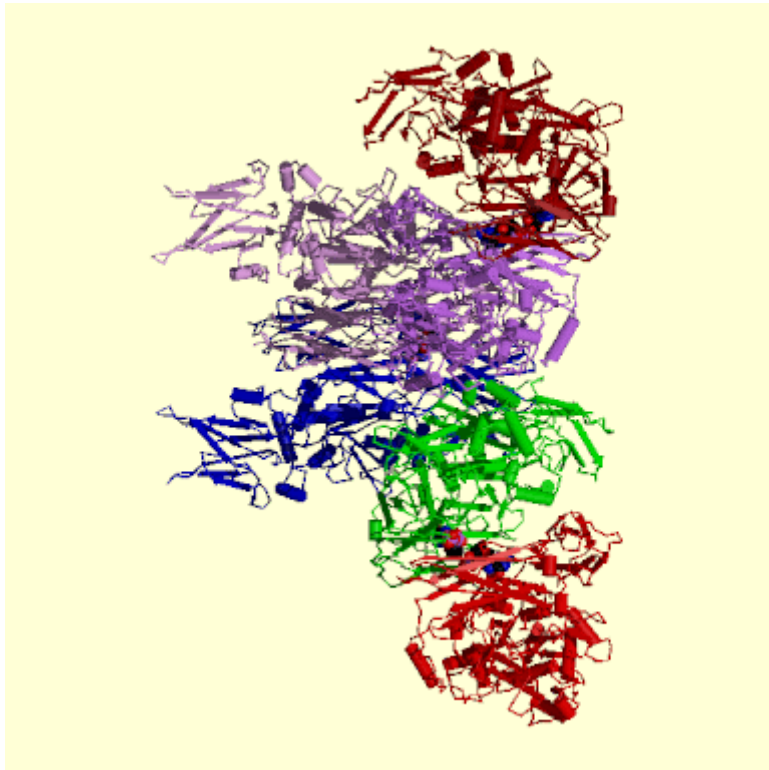


Abbildung 2: Kristallstruktur der menschlichen Transglutaminase gebunden an GDP (entnommen aus PDB Datenbank nach Liu [Liu_2002])

3.2 Optische Grundlagen

3.2.1 Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) wird im ersten Teil dieser Arbeit zur Charakterisierung von Oberflächen, zur Etablierung von Assaysystemen und zur Bestimmung von Affinitätskonstanten verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit wird RIfS im Mikrotiterplattenformat für parallele Messungen zum Epitopmapping eingesetzt und die RIfS im Nanotiterplattenformat aufgebaut. Daher werden hier die optischen Grundlagen erläutert. Auf die Parallelisierung der RIfS im Vergleich zu anderen Systemen und mit Blick auf die Probleme der Miniaturisierung wird ausführlich eingegangen.

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie basiert auf den Interferenzeffekten an dünnen Schichten. Diese Effekte werden zur Beobachtung biomolekularer Wechselwirkungen genutzt.

Ein Lichtstrahl trifft unter dem Einfallswinkel Θ_i auf eine ebene Grenzfläche z.B. auf eine Phasengrenze fest/flüssig. Ein Teil des Lichtes wird transmittiert (Θ_t), ein anderer Teil wird

unter dem Winkel Θ_r reflektiert. Abgeleitet aus dem *Fermatschen Prinzip* (Licht breitet sich stets entlang der kleinsten optischen Weglänge aus), gilt für die Transmission das *Brechungsgesetz von Snellius*:

$$n_i \sin \Theta_i = n_t \sin \Theta_t. \quad (1)$$

Der Lichtstrahl wird dabei beim Übergang vom optischen dünneren zum optischen dichteren Medium zum Lot hingebrochen. Für die Reflexion gilt:

$$\Theta_i = \Theta_r. \quad (2)$$

Abb. 3 veranschaulicht das Transmissions- und Reflexionsverhalten an einer Phasengrenze.

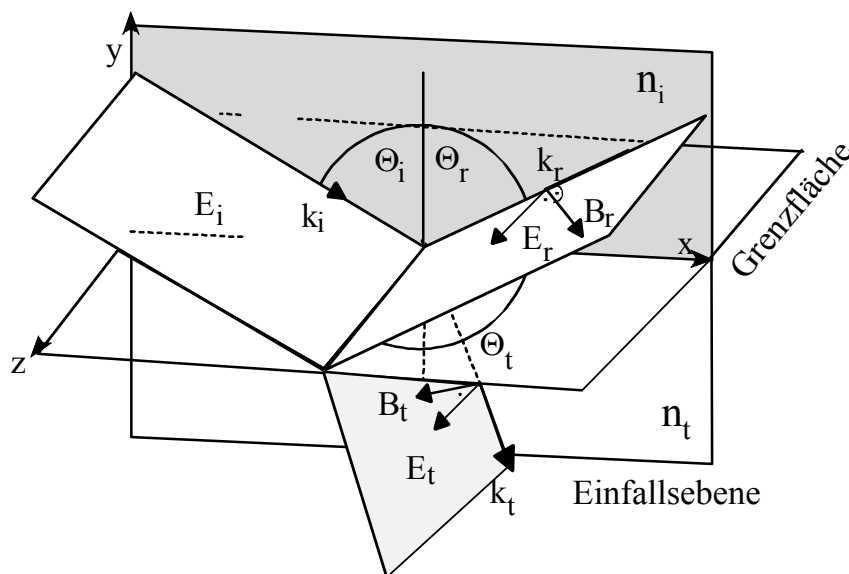


Abbildung 3: Transmission und Reflexion einer senkrecht zur Einfallsebene polarisierten elektromagnetischen Welle an der Phasengrenze vom optisch dünneren ins dichtere Medium. Gezeigt sind die Wellenvektoren k und die Vektoren der elektrischen und magnetischen Felder E und B . Die Indices kennzeichnen einfallenden (i), reflektierten (r) und transmittierten (t) Strahl (nach [Hecht_1989]).

Die *Fresnelschen Gleichungen* beschreiben das Verhalten von Reflexion und Transmission an Grenzflächen für linear polarisiertes, monochromatisches Licht.

Für einen senkrecht zur Einfallsebene polarisierten Strahl gilt für nicht-absorbierende Medien:

$$r_{\perp} = \frac{E_{\perp r}}{E_{\perp i}} = \frac{n_i \cos \Phi_i - n_t \cos \Phi_t}{n_i \cos \Phi_i + n_t \cos \Phi_t} \quad (3)$$

und

$$r_{\perp} = \frac{E_{=r}}{E_{=i}} = \frac{n_t \cos \Phi_i - n_i \cos \Phi_t}{n_i \cos \Phi_t + n_t \cos \Phi_i} \quad (4)$$

für einen parallel polarisierten Strahl.

Die Reflexionskoeffizienten r geben das Verhältnis der relativen Amplitude des E-Feldes E_r des reflektierten Teilstrahls zu der Amplituden des E-Feldes E_i des einfallenden Strahles wieder. Dieser Quotient ist abhängig vom Einfallswinkel Φ_i und den Brechungsindizes n_i und n_t der Medien.

3.2.2 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten

Bei dünnen, planparallelen Schichten tritt Mehrfachreflexion auf. Interferenzeffekte treten dann auf, wenn die Schichtdicken im Bereich der Kohärenzlänge des eingestrahlt Lichtes liegen oder kleiner sind. So lassen sich mit Weißlicht, da dieses eine sehr kleine Kohärenzlänge hat, nur Interferenzeffekte erzielen, wenn die Schichtdicke einige μm nicht überschreitet.

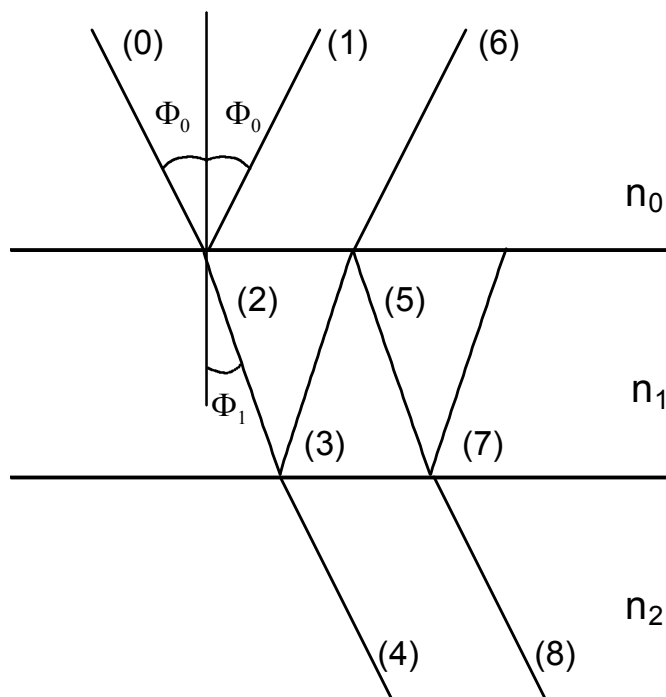


Abbildung 4: Mehrfachreflexion an einer planparallelen Schicht.

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_1/n_2) ergibt sich unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung δ des zweiten Teilstrahls der Gesamreflexionskoeffizient R :

$$R = \frac{r_1 + r_2 e^{-2i\delta}}{1 + r_1 r_2 e^{-2i\delta}} \quad (5)$$

Nimmt man nur eine geringe Reflektivität an (Summand im Nenner von Gl. 5 vernachlässigbar), so ergibt sich mit einer Phasenverschiebung δ und einem Phasensprungs ϕ beim Übergang vom optisch dünneren ins dichtere Medium

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}, \quad (6)$$

beim senkrechten Lichteinfall eine reflektierte Intensität bei Interferenz der Teilstrahlen von :

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}\right) \quad (7)$$

Die reflektierte Intensität bei Interferenz der reflektierten Teilstrahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2 ist abhängig von der Wellenlänge λ . Die Phasenverschiebung ergibt sich, da der zusätzliche Lichtweg des zweiten Teilstrahls der zweifachen optischen Schichtdicke $n_1 d_1$ entspricht. Auf dieser Grundlage erhält man ein spektrales Interferenzmuster in Abhängigkeit von der optischen Schichtdicke $n_1 d_1$.

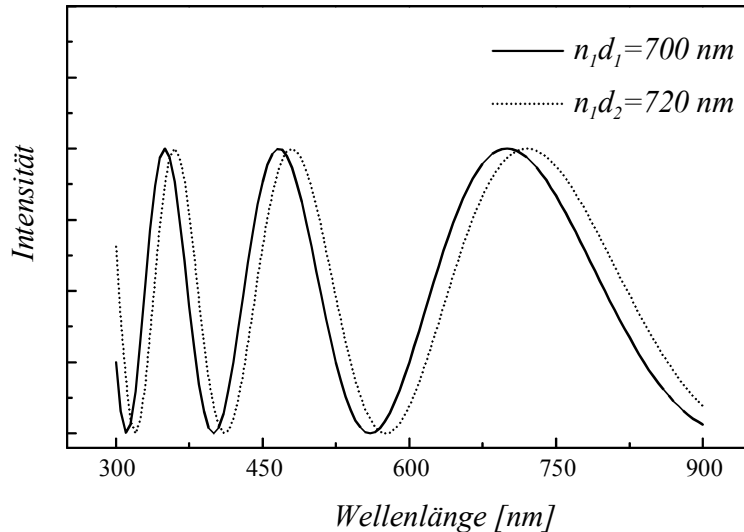


Abbildung 5: Nach Gl. 7 berechnetes Reflexionsinterferenzspektrum für zwei verschiedene Schichtdicken.

Ein Maximum in der Interferenz I_R tritt immer dann auf, wenn das Verhältnis von zusätzlichem Lichtweg $2nd$ zur Wellenlänge λ des Lichtes einen ganzzahligen Wert annimmt.

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Max} \quad m_{Max} = 1, 2, 3, \dots \quad (8)$$

Ein Minimum gibt es entsprechend, wenn das Verhältnis von zusätzlichem Lichtweg $2nd$ zur Wellenlänge λ des Lichtes einen halbzahligen Wert hat.

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Min} \quad m_{Min} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \quad (9)$$

Ist das spektrale Interferenzspektrum bekannt, kann über die Lage von zwei Extrema die Ordnung m ermittelt werden:

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)}, \quad (10)$$

mit den Wellenlängen der Extrema λ_1 und λ_2 und der Differenz der Ordnungszahlen m_1 und m_2 , Δm . Jetzt kann an einem Extremum die optische Schichtdicke $n \cdot d$ bestimmt werden.

Die Umsetzung dieser theoretischen Überlegungen führte zu einem Messsystem, welches hier nur kurz erläutert wird. Eine genauere Beschreibung liefert Schmitt [Schmitt_1997]. Gemessen wird standardmäßig im Einkanalssystem. Weißlicht einer Halogenlampe wird in einen Polymer- oder Quarzlichtleiter eingekoppelt und zum Transducer geleitet. Das Licht wird senkrecht auf den Glastransducer eingestrahlt. An die SiO_2 -Schicht des Transducers werden Ligandenmoleküle immobilisiert. Das an dieses Schichtsystem reflektierte Licht wird vom gleichen Lichtleiter zurückgeführt und über einen Y-Koppler einem Diodenarrayspektrometer zugeführt. Die Spektren werden erfasst und mittels eines PCs ausgewertet. Lagern sich Moleküle an die Oberfläche des Transducers an, ändert sich die optischen Schichtdicke des Transducers und das Reflexionsinterferenzmuster verschiebt sich wie in Abb. 5 gezeigt.

3.2.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie im Mikrotiterplattenformat

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie wurde im Zuge der Entwicklung von Kombinatorischer Chemie und Biochips parallelisiert. Es lassen sich mit RIfS markierungsfrei viele Proben im High Throughput erfassen.

Zwar ist die Erfassung von zwei Messpunkten gleichzeitig durch den Einsatz von zwei Diodenarrays und einer Schaltung aus zwei y-Kopplern möglich [Haake_2000]. Jedoch ist die parallele Messung von über 100 Messpunkten technisch mit solchen Aufbauten nicht mehr möglich. Die Parallelisierung von RIfS wurde daher durch Aufweiten des Lichtstrahls und orts aufgelöste Schichtdickendetektion mittels einer 12 bit CCD-Kamera erreicht.

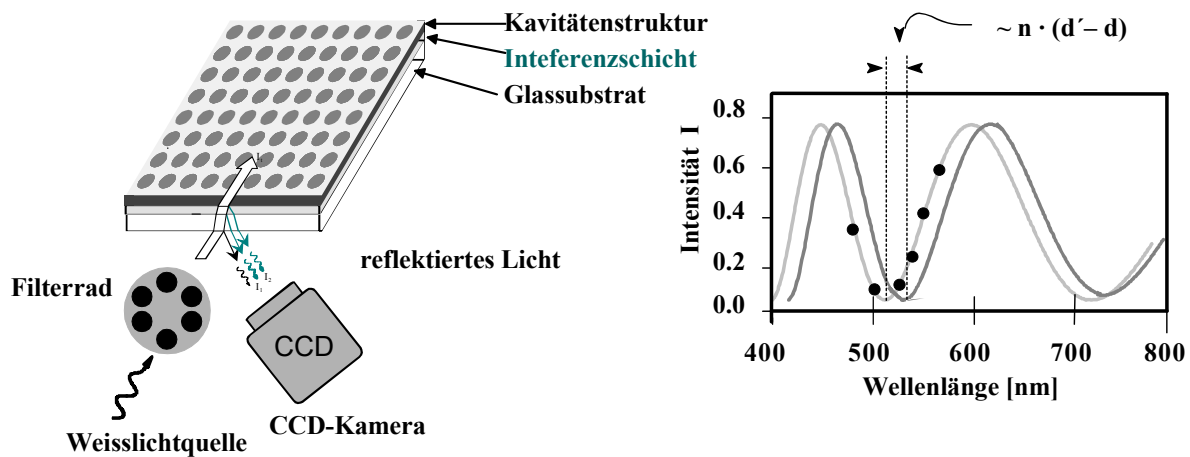


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines parallelisierten RfS-Detektionssystems

Aus Abb. 6 geht das Prinzip der Parallelisierung von RfS hervor. Weißlicht einer Halogenlampe wird eingestrahlt. Ein Filtrerrad dient als Monochromator. Die Filter dieses Filtrerrades wurden so ausgewählt, dass die hindurchgehenden Wellenlängen bei einer normalerweise zu erwartenden Schichtdicke zu beiden Seiten des gleichen Minimums verteilt sind. Das optische Abbildungssystem weitet den monochromatischen Strahl auf, so dass dieser die gesamte Mikrotiterplatte ausleuchtet. Der reflektierte Strahl wird von einer CCD-Kamera erfasst. Durch schnelles Drehen des Filtrerrades wird für sechs bzw. sieben Wellenlängen jeweils ein Bild des gesamten Probenträgers erhalten. Durch die Rekonstruktion eines Extremums des Interferenzmusters aus den Wellenlängen kann aus den Bildern für jede Probenposition auf dem Probenträger die optische Schichtdicke und damit auch eine Änderung der optischen Schichtdicke ermittelt werden. Da nur bei höchstens sieben Wellenlängen zur genauen Ermittlung der Lage des Extremums gemessen wird, erhält man innerhalb von zehn Sekunden jeweils einen Punkt auf der Schichtdicken-Zeitkurve. Damit ist die Aufnahme von Echtzeit-Messungen parallel möglich [Rothmund_1997],[Dobschal_1997]. Das Signal/Rauschverhältnis dieses Systems wird im Wesentlichen durch die Zahl der Bildpunkte (Pixel) des Kamera-Chips pro Messspot bestimmt. Je mehr Pixel für eine Kavität und somit zur Mittelwertbildung zur Verfügung stehen, desto besser ist das Signal/Rauschverhältnis.

Der optische Aufbau des parallelen RfS erfordert, dass der Einfall des Lichtes nicht wie im Einkanalssystem senkrecht, sondern in einem Winkel von 30° - 50° geschieht.

Dies hat eine Verbreiterung des Spektrums im Vergleich zum senkrechten Einfall zur Folge, da die Lage des im Interferenzspektrum liegenden Extrempunktes winkelabhängig ist. Damit

wird der Signalhub kleiner, was zu einer Verschlechterung des Signal/Rauschverhältnisses und zu einer geringeren Änderung der optischen Schichtdicke durch Bindung eines Rezeptors führt [Rothmund_1999]. Bei einem Einfallswinkel von 45° wurden verschiedene Schichtdicken von SiO_2 getestet. Bei diesem Einfallswinkel ergab sich bei einer SiO_2 -Schicht von 600 nm statt wie beim Einkanalssystem bei 330 nm die höchste maximale Verschiebung des Minimums pro angelagertem Nanogramm Protein. Dem entsprechend wurden die Filter des Filtrerrades ausgewählt.

Bei der Messung in Kavitäten hat jedoch die nicht senkrechte Einstrahlung den Vorteil, dass Störungen durch Reflexion von Licht am Meniskus der Probe in der Kavität keinen so großen Einfluss haben. Bei senkrechter Einstrahlung führt eine Veränderung der Höhe der Einfüllung der Proben in die Kavitäten sofort zu einer Veränderung des Interferenzmusters und damit zu Sprüngen in der Messkurve, da sich hier eine weitere Grenzschicht an dem Reflexionsinterferenzmusters beteiligt.

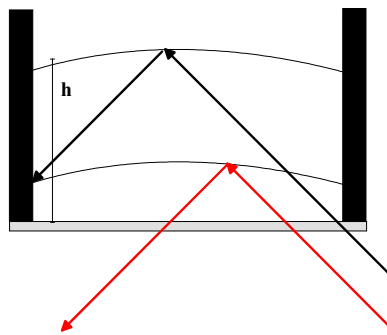


Abbildung 7: Reflexion am Flüssigkeitsmeniskus

Beim Einfallswinkel von 45° wie in Abb. 7 gezeigt, spielt theoretisch die Reflexion an der Grenzfläche Probe/Luft nur dann eine Rolle, wenn der eingestrahle Strahl nach dem Gesetz Einfallswinkel=Ausfallswinkel in den Bereich der Auslesefläche reflektiert wird. Bei größeren Einfüllhöhen h sollte jeder an dieser Grenzfläche reflektierte Strahl von der Wand der Kavität absorbiert werden.

3.2.4 Vergleich der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit anderen parallelen markierungsfreien Systemen

Die Parallelisierung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie steht am Beginn einer ganzen Reihe von Patenten auf dem Gebiet der Entwicklung von parallelen markierungsfreien Screeningsystemen. Ein allgemeiner kurzer Überblick über die heterogenen Methoden in der optischen Spektroskopie stellt die RIFS in Zusammenhang zu anderen ergänzenden oder

konkurrierenden Methoden. Generell werden die direkt optischen Affinitätssensoren in zwei Klassen eingeteilt:

1. Sensoren, die auf den Effekten der Refraktometrie beruhen. Diese detektieren die Bindung von Molekülen an die Oberfläche über die Änderung des Brechungsindex in der Umgebung der Sensoroberfläche über das evaneszente Feld des Wellenleiters.
2. Sensoren, die auf den Effekten der Reflektometrie beruhen. Hier werden Änderungen der Sensorumgebung durch die Änderung der Reflektivität des eingestrahlt Lichtes an Grenzflächen zwischen Fluid und fester Phase wie z.B. Wasser und Glas in Abhängigkeit von Einfallswinkel und Polarisationszustand detektiert.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über vorhandene Techniken mit entsprechenden Nachweisgrenzen. Nur wenige dieser Techniken sind bereits als parallele Screeningplattformen vorhanden.

Tabelle 2: Zusammenfassung markierungsfreier Sensoren und ihrem Detektionsprinzip

Refraktometrische Sensoren	Prinzip	Nachweisgrenze
Interferometer	Detektion der Phasenänderung bei Interferenz	
Mach-Zehnder-Interferometer		1 pg/mm ²
Young-Interferometer		5 pg/mm ²
Fabry-Pérot-Interferometer		9 fg/mm ²
Gitterkoppler	Verschiebung des Kopplungswinkels des Gitters	5 pg/mm ²
Resonant Mirror (Prismen Koppler)	Änderung der Kopplungsbedingungen an einem Wellenleiter	8 pg/mm ²
Oberflächenplasmonen-Resonanz	Verschiebung der Resonanzenergie der Oberflächenplasmonen	0.3 pg/mm ²
Reflektometrische Sensoren		
Ellipsometrie	Änderung der Polarisation der Reflektivität	0.5 pg/mm ²
Reflektometrische Interferenz Spektroskopie	Änderung des Interferenzspektrums an einer dünnen Schicht	1 pg/mm ²

Die Funktionsprinzipien der einzelnen Techniken sind unter [Kröger_2003] nachzulesen.

Nach der Parallelisierung der RfS ist als konkurrierendes Verfahren in der Hauptsache die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zu nennen. Es gibt inzwischen drei Firmen, die parallele Systeme basierend auf SPR entwickeln.

Graffinity technique:

Die erste Firma, die ein paralleles SPR Array angeboten hat, war Graffinity Pharmaceutical Design GmbH (Heidelberg) mit einer markierungsfreien Screening-Plattform für chemische Microassays genannt Plasmon Imager®. Hier können 4608 Datenpunkte pro Array mit einer CCD Kamera über die Änderung der SPR Wellenlänge detektiert werden.

Eine kammähnliche Struktur aus vielen Wellenleitern in der Form einer Mikrotiterplatte ist mit Hilfe der Halbleitertechnologie hergestellt worden [Invarson_1998] und mit einer Gold- oder Silberschicht versehen worden. Weißlicht wird über ein Filtrerrad oder einen Monochromator und über einen Polarisator für TM-Moden auf das Goldarray eingestrahlt. Der Lichtstrahl erreicht mit einem Winkel von 70-90° (SPR-Winkel, notwendig für die Anregung von Oberflächenplasmonen) das Array. Das in das Array eingekoppelte Licht wird mit einer CCD Kamera detektiert. Für das Scannen der Wellenlängen mit einer Auflösung von 1 nm werden für einen Scan über 200 nm 16 min benötigt. Interaktionen von Biomolekülen verlaufen wesentlich schneller, daher ist diese Methode bislang eine Imaging-Methode, die sich nicht zur Beobachtung von dynamischen Phänomenen eignet [Vetter_2000].

HTS Biosystems:

Die erste Firma, die ein auf SPR basierendes System anbietet, welches markierungsfreie zeitaufgelöste Messungen im HTS Format ermöglicht, ist HTS Biosystems, Hopkinton, MA in Zusammenarbeit mit Ciencia, Inc, East Harford, CT. Der FLEXchip Kinetic Analysis System™ soll für die Proteomanalyse eingesetzt werden. Das System basiert auf der Gitterkoppler-Oberflächenplasmonen Resonanz (GC-SPR) [Brockman_2001]. Anstelle des üblicherweise bei SPR verwendeten Prismas wird ein Gitter für die Einkopplung der Lichtstrahlen in die metallische Oberfläche zur Anregung der Oberflächenplasmonen benutzt. Der Chip besteht aus einem optischen Gitter aus Plastik mit einer dünnen Goldschicht. Monochromatisches Licht (867 nm) wird eingestrahlt und die Änderung des SPR-Winkels wird mit einer CCD-Kamera detektiert. Mit dieser Technik können an Spots von einem Durchmesser von 250 µm parallel biomolekulare Interaktionen in Echtzeit vermessen werden. Der Vorteil dieser Technik im Vergleich zu RfS liegt in der Verwendung von Plastik,

wodurch die Chips kostengünstig hergestellt werden können und somit besonders für den diagnostischen Bereich geeignet sind.

BIAcore technique:

Im April 2002 präsentierte BIAcore den “proof of principle” der von ihnen entwickelten High-Throughput Screening Plattform. Vor allem zusammen mit Millennium Pharmaceuticals wurden biologische Anwendungen aus dem Bereich der funktionellen Proteomics präsentiert [BIAcore_2002]. Die Studie zeigt die prinzipielle Verwendung der Plattform für komplexe Assaysysteme. Kinetische Informationen können ebenfalls erhalten werden. Im März 2002 versprach BIAcore die Vermarktung der SPR chip array Technologie im Jahre 2004.

Im Patent von BIAcore (Fa. Pharmacia Biacore, Uppsala, Sweden, (WO98/34098) sind mögliche Aufbauten der parallelen Plattform beschrieben. Es wird monochromatisches Licht mit unterschiedlichen Einstrahlwinkeln verwendet. Das Licht wird über eine Sammellinse und einen Interferenzfilter auf einen Spiegel eingestrahlt. Das dann parallelisierte Licht wird auf einen zweiten Spiegel (den Scanspiegel) geleitet, bevor der Lichtstrahl über Prisma oder Gitter in die Chipoberfläche einkoppelt. Das reflektierte Licht wird über einen Polarisator geleitet und anschließend von einer CCD-Kamera detektiert. Durch Drehen des zweiten Spiegels wird der Einstrahlwinkel variiert. Jeder Einstrahlwinkel produziert ein Bild. Zur Detektion des Einstrahlwinkels wird ein Referenzpunkt über eine separate Optik auf einen zweiten Teil des Detektors projiziert. Über diese Optik kann der Einstrahlwinkel für das gesamte Array erfasst werden und mit dem ersten Bild gleichgesetzt werden. Mit dieser Technik sind markierungsfreie Echtzeitmessungen biomolekularer Interaktionen auf vielen tausend Spots möglich.

Für Anwendungen im Bereich der funktionellen Proteomics ist es notwendig, Informationen nicht nur über das Bindungsereignis, sondern gleichzeitig auch über die Struktur der gebundenen Spezies zu erhalten. Aus diesem Grund entwickelte BIAcore eine Kopplung des SPR-Einkanalsystems mit der Massenspektrometrie. Die Kooperation mit dem Hersteller von Massenspektrometern Bruker Daltonics Inc. (NASDAQ: BDAL) ist ein guter Ausgangspunkt für die Entwicklungen optischer Sensoren für die funktionelle Proteomanalyse. Im Vergleich zu RfS sind die Entwicklungen einer Kombination von Massenspektrometern mit der optischen Methode bei BIAcore weiter fortgeschritten, dennoch wurde auch mit RfS eine Kopplung mit MS entwickelt [Mehlmann_2003].

Von allen hier vorgestellten Methoden sind bislang nur wenige Anwendungen gezeigt worden. Angaben über Nachweisgrenzen der parallelen Methoden zum direkten Vergleich können daher zu diesem Zeitpunkt noch nicht gemacht werden. Wesentliche Unterschiede zu

RIfS liegen bei den SPR Methoden in der notwendigen Thiolchemie zur Immobilisierung von Molekülen, die weniger Möglichkeiten bietet, wie die bei RIfS angewandte Chemie auf Glas aufweist. Da der Hauptvorteil markierungsfreier Systeme in der Erfassung von kinetischen Parametern liegt, werden die parallelen zeitaufgelösten SPR-Methoden eine Fluidik aufweisen, mit der im Fluss Bindungskurven detektiert werden können. Hier ist ein großer Entwicklungseinsatz notwendig, um wie z.B. im Falle von BIAcore an ihre exzellente Fluidik im BIAcore 3000 anzuschließen. Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie wurde zunächst ein System aufgebaut, mit denen man im Mikrotiterplattenformat messen kann. Hier ist die Entwicklung der Fluidik bereits weit fortgeschritten, so dass erste Messungen im Chipformat publiziert werden konnten [Wegner_2003].

3.2.5 Miniaturisierung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zum Nano-RIfS

Schon im Dezember 1959 befasste sich Richard Feynman mit den Potentialen der Nanotechnik [Feynman_1960]. Er beschrieb die Möglichkeiten der Miniaturisierung basierend auf physikalischen Phänomenen. Die Anwendung der miniaturisierten Systeme auf chemische und sogar biologische Systeme gestaltet sich sehr viel schwieriger.

Miniaturisierte Analysesysteme können in der Zukunft die Analytische Chemie nicht nur ergänzen, sondern sie auch revolutionieren. Ziel sind Komplettanalysen auf einem Chip oder in einem portablen Handgerät (lab on chip). Dazu müssen verschiedene Schritte der Analyse zusammen in einem Gerät integriert werden: Probennahme, Probenaufbereitung, eventuelle Trennschritte, Analyse, Auswertung und Bewertung der Analyse. Hierbei ist die Verbindung dieser einzelnen Schritte durch Flusssysteme im Mikromaßstab eine Herausforderung. Es gibt zwar inzwischen in der Chipstechnologie eine große Erfahrung im Bereich der Herstellung von Chips im Nanometermaßstab im Zusammenhang mit der Computerindustrie, jedoch sind Erfahrungen der Handhabung von wässrigen oder gar organischen Flüssigkeiten in der Größenordnung von Nanolitern gering. Erste Schritte sind mit der Entwicklung von lab on chip-Systemen der Firma Packard, aber auch mit grundlegenden Untersuchungen zur Mikrofluidik getan [Bühler_2001]. So sind mit kleinen Partikeln in der Größenordnung von 3 µm bis 1.5 µm Untersuchungen zum Fließverhalten in kleinen Kanälen durchgeführt worden [Terray_2002]. Nach der Entwicklung von Pipettiersystemen, die auf Contactprinting beruhen, wie z.B. Affymetrix 427™ Arrayer, wurden Systeme bevorzugt, die nicht durch das Aufsetzen der Nadel die Oberfläche zerstören. Damit ging man über zu den auf dem Piezoeffekt beruhenden Systemen wie den Produkten der Firmen microdrop und GeSiMmbH.

Diese Systeme haben den Nachteil, dass nur maximal vier Spots auf einmal aufgebracht werden können. Zum Zweiten brauchen diese Systeme dennoch eine große Probenmenge, da sie die Proben aus einer vorgelegten Mikrotiterplatte herausholen. Damit ist das Totvolumen sehr hoch. In neuerer Zeit ist von der Firma HSG-IMIT (Freiburg, Villingen-Schwenningen) ein System zur Handhabung von Flüssigkeitsmengen im Pikolitermaßstab entwickelt worden. Mit diesem TopSpot System können parallel 96 Tropfen gleichzeitig abgegeben werden (s. Abschnitt 4.3.2) [Ducree_2000]. Auch hier sind jedoch einige Probleme, wie sie auch in anderen Systemen beim Arbeiten mit kleinen Flüssigkeitsmengen auftreten, noch nicht gelöst. Bei der Zugabe von Detergenzien zu wässrigen Lösungen, welche die Viskosität der Flüssigkeit erhöhen, bei höheren Salzkonzentrationen der wässrigen Lösung und in organischen Lösungsmitteln lassen sich Tropfen nur noch unregelmäßig oder gar nicht abgeben. Damit sind Probleme der Immobilisierungsschemie, wie sie bei der Immobilisierung von nicht in Wasser löslichen Peptiden auftreten, nicht gelöst.

Die Miniaturisierung von Screening-Systemen scheitert am fehlenden Verständnis des Verhaltens von Flüssigkeiten in Nanokavitäten. Allgemein ist inzwischen bekannt, dass Reaktionen an der Oberfläche in Nanotiterplatten schneller ablaufen [Seidel_2003]. Die hier angewandten Verfahren sind jedoch indirekte Verfahren, die auf Fluoreszenz basieren. Mit dem Aufbau der RIfS im Nanotiterplattenformat steht erstmals eine Methode zur Verfügung, mit der direkt eine Reaktion an der Oberfläche im Nanolitermaßstab beobachtet werden kann.

3.2.6 Fluoreszenzanregung mit interner Totalreflexion (TIRF)

In Kapitel 3.2.1 wurde der Grenzwinkel der Totalreflexion diskutiert. Bei RIfS wird das Prinzip der Totalreflexion an der Grenzfläche vom optisch dichteren zum optische dünneren Medium lediglich für den Transport von Lichtwellen innerhalb des Lichtleiters benutzt. Dieses Prinzip wird jedoch inzwischen in der Biosensorik/Biochipentwicklung als Detektionsprinzip benutzt [Budach_1999].

Das *Snellius'sche Brechungsgesetz* Gl. 1 gilt auch für einen Strahlengang vom optisch dichteren zum optisch dünneren Medium. Ab einem bestimmten Einfallswinkel wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Für diesen Grenzwinkel der Totalreflexion gilt:

$$\sin \Theta_{\text{grenz}} = \frac{n_2}{n_1} \quad (11)$$

mit $n_1 > n_2$.

Ist der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel, findet Totalreflexion statt. Der Lichtstrahl wird beim Übergang vom optisch dichteren zum optisch dünnerem Medium ins optisch dichtere Medium reflektiert. Ein Lichtstrahl, in der Regel Licht einer Laserdiode, wird in einen Glasobjektträger eingekoppelt. Die Intensität der elektromagnetische Welle sinkt am Rand der Grenzfläche z.B. zwischen Glas (n_1) und Flüssigkeit (n_2) nicht auf null ab. Der elektrische Feldvektor (E_0) klingt im optisch dünneren Bereich exponentiell mit der Entfernung von der Grenze (z) ab. Diesen abnehmenden Feldanteil bezeichnet man als evaneszentes Feld (s. Abb.8).

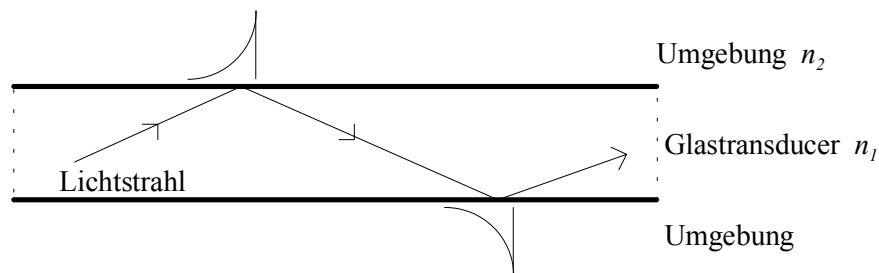


Abbildung 8: Evaneszenzfeld bei der totalen Reflexion in Glastransducern ($n_1 < n_2$)

Die exponentielle Abnahme des evaneszenten Feldes wird durch:

$$E = E_0 \exp\left(-\frac{z}{d_p}\right) \quad (12)$$

beschrieben. z ist der Abstand von der Grenzfläche im optisch dünneren Medium, d_p ist die evaneszente Eindringtiefe und berechnet sich nach:

$$d_p = \frac{\frac{\lambda}{n_1}}{2\pi \left[\sin^2 \Theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (13)$$

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes liegt in der Größenordnung von Nanometern in Abhängigkeit von der eingestrahnten Wellenlänge (ca. die Hälfte der eingestrahnten Wellenlänge). Binden z.B. Fluoreszenzmoleküle an die Oberfläche des Lichtleiters oder Chips, können diese über das evaneszente Feld angeregt und mittels CCD-Kamera oder anderen Wellenleitern an den Reflexionspunkten der Totalreflexion erfasst werden [Klotz_1998]. Auf Grund der geringen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes werden nur oberflächennahe und damit hauptsächlich gebundene Moleküle angeregt.

3.2.7 Spektrale Ellipsometrie

Die spektrale Ellipsometrie wurde in dieser Arbeit als Referenzmethode verwendet. Auf die Probe wird Licht mit definiertem Einstrahlwinkel, Wellenlänge und Polarisationszustand eingestrahlt. Der Polarisationszustand und die Phase des reflektierten Lichtes werden detektiert. An den Grenzflächen zwischen Schicht/Substrat und Schicht/Umgebungsmedium gilt das Fresnelsche Gesetz. Die Fundamentalgleichung der Ellipsometrie lautet:

$$\tan \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R^s}{R^t} \quad (14)$$

mit dem Verhältnis der absoluten Werte der Reflektivitäten des parallel polarisiert Lichtes (R^s)

und des transversal polarisiert Lichtes (R^t) zur Einstrahlebene $\tan \Psi = \frac{|R^s|}{|R^t|}$. Δ entspricht der

Änderung der Phasenverschiebung zwischen den zwei polarisierten Teilstrahlen $\delta_1 - \delta_2$, wobei δ_1 der eingestrahlte Teil ist und δ_2 der reflektierte Teil ist. Über die Messung der Änderung des Polarisationszustandes können Brechungsindex und Schichtdicke der Probe bestimmt werden [Azzam_1989].

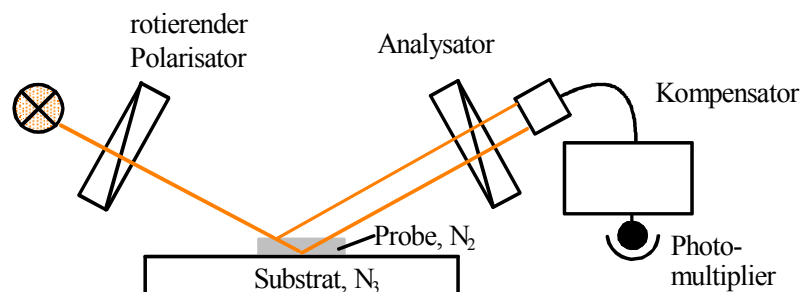


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der spektralen Ellipsometrie mit rotierendem Polarisator und Analysator

3.3 Reaktion an Oberflächen und Massentransport

Der Vorteil der in dieser Arbeit benutzten direkt optischen Biosensoren liegt in der Möglichkeit der Ermittlung von Kinetik und der thermodynamischen Affinität.

3.3.1 Kinetik

Für die Reaktion einer einfachen 1:1 Bindung eines gelösten Rezeptors und eines immobilisierten Liganden gilt:



wobei k_a die Assoziationsraten- und k_d die Dissoziationsratenkonstante darstellen.

Daraus lässt sich unter der Bedingung gleich bleibender Konzentration des gelösten Rezeptors d.h. bei Messungen im Fluss, mit

$$\frac{dc_{RL}}{dt} = k_a c_L c_R - k_d c_{RL} \quad (16)$$

das Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung aufstellen:

$$\frac{dR}{dt} = \text{const.} - (k_a R_0 + k_d) R \quad (17)$$

Die Lösung der Differentialgleichung (17) nach der Zeit ergibt:

$$R_t = R_{eq} [1 - e^{-k_{obs} t}] \quad (18)$$

mit

$$k_{obs} = k_a C + k_d \quad (19)$$

k_a = Assoziationsratenkonstante ($M^{-1}s^{-1}$)

k_d = Dissoziationsratenkonstante (s^{-1})

R = Signal, Oberflächenbeladung

R_t = Signal zum Zeitpunkt t

R_{eq} = Signal im Gleichgewicht

R_0 = molare Anfangskonzentration des gelösten Rezeptors.

Für die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k_d gilt:

$$\frac{dR_t}{dt} = -k_d R_t \quad (20)$$

und

$$R_t = R_{eq} e^{-k_d t} \quad (21)$$

Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante aus der Bindungskurve ist durch die Rückbindung des Rezeptors an den Liganden erschwert. Zunächst kann eine ungefähre Dissoziationsrate über den y-Achsenabschnitt der Auftragung von k_{obs} gegen c ermittelt werden. Eine genauere Bestimmung ist durch die Zugabe des Bindungspartners zur Lösung möglich, wodurch die dissoziierten Moleküle sofort in der Lösung auch innerhalb der Diffusionsgrenzschicht gebunden werden und nicht mehr an die Oberfläche binden können.

Die Ermittlung der Kinetik aus den gemessenen Bindungskurven ist aber nur unter zwei Bedingungen möglich:

1. Die Messungen im Fluss sollten mit einem optimalen, d.h. rechteckigen Flussprofil durchgeführt werden. Während des Aufbringens der Probe mit der Fluidik kommt es innerhalb des Schlauchsystems durch Diffusion in und entgegen der Flussrichtung zu einer Vermischung der Probe mit der Pufferlösung und damit zu einer Verdünnung der Probe im vorderen und hinteren Bereich. Dadurch werden zu Beginn der Messung andere Konzentrationen und andere Gleichgewichte detektiert.
2. Die Messung der kinetischen Konstanten ist nur möglich, wenn die Messung nicht vom Massentransport des Rezeptors in der Lösung über die Diffusionsgrenzschicht zur Oberfläche des Sensors überlagert ist. Der Massentransportkoeffizient (Onsager Koeffizienten des Massentransports L_M) ist nach [Sjölander_1991] für ein Flusssystem definiert nach:

$$L_m = k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 f}{h^2 b l}} \quad (22)$$

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 [Glaser_1993] unterscheidet drei Fälle, wobei g die Oberflächenkonzentration an Bindungsstellen, also $g = R_{max} - R$ ist und k'_a die scheinbare Assoziationsratenkonstante, die sich aus den gemessenen Bindungskurven ergeben:

- a) $k'_a g \ll L_m$, hier spielt der Massentransport keine Rolle. Die Bindung des Rezeptors an die immobilisierten Liganden ist allein durch die Kinetik der Bindung bestimmt. Um sicher zu gehen, dass k'_a der wahren Assoziationsratenkonstante entspricht, trägt man dR/dt gegen R auf. Nach Gl. 17 muss die Auftragung für diesen Grenzfall linear sein [Karlsson_1991].
- b) $k'_a g \approx L_m$, sowohl die Kinetik als auch der Massentransport sind limitierende Faktoren der Bindung des Rezeptors an die Oberfläche.
- c) $k'_a g \gg L_m$. Hier werden die gemessenen Bindungskurven nur durch den Massentransport an die Oberfläche bestimmt.

Aus der Bestimmung von k_a und k_d wird die Gleichgewichtskonstante K ermittelt nach:

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad (23)$$

Zum Vergleich kann die thermodynamische Gleichgewichtskonstante im heterogenen System auch durch die Gleichgewichtsbeladung (Langmuir) ermittelt werden:

$$R_{GG} = R_{\max} \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (24)$$

3.3.2 Thermodynamische Affinitätskonstante in Lösung

Für den von Glaser beschriebenen Grenzfall c, bei der die Bindung an die Oberfläche allein durch die Massentransportlimitierung bestimmt ist, was vor allem bei vielen Bindungsstellen an der Sensoroberfläche der Fall ist, gilt:

$$\frac{dS}{dt} = L_M \cdot c \quad (25)$$

Damit ist die Signaländerung direkt proportional zur Konzentration der freien Bindungsstellen in Lösung. Dies wird im so genannten Bindungshemmtest oder Titrationsassay ausgenutzt [Piehler_1997a]. Am Beispiel einer Rezeptor/Ligandreaktion wird der Titrationsassay erläutert:

Für die monomolekulare Reaktion eines Liganden mit einem Rezeptor



gilt das Massenwirkungsgesetz in folgender Form:

$$K = \frac{c_{RL}}{c_L \cdot c_R} = \frac{c_{RL}}{(c_{0,L} - c_{RL}) \cdot (c_{0,R} - c_{RL})} \quad (27)$$

mit	K :	Affinitätskonstante
	L :	Ligand
	R :	Rezeptor
	RL :	Rezeptor-Ligand-Komplex
	c_{RL} :	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes im Gleichgewicht
	c_R	Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht
	c_L :	Konzentration des Liganden
	$c_{0,R}$:	Anfangskonzentration des Rezeptors
	$c_{0,L}$:	Anfangskonzentration des Liganden

Die aus Gl.27 resultierende quadratische Gleichung hat für c_{RL} nur eine physikalisch sinnvolle Lösung [Piehler_1997].

$$c_{RL} = \frac{c_{0,L} + c_{0,R} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{\left(c_{0,L} + c_{0,R} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{0,L} \cdot c_{0,R}} \quad (28)$$

Die Konzentration an freiem, bindungsfähigem Rezeptor berechnet sich wie folgt:

$$c_R = c_{0,R} - c_{RL} \quad , \quad (29)$$

daraus resultiert:

$$c_R = \frac{c_{0,R} - c_{0,L} - \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{\left(c_{0,R} + c_{0,L} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{0,R} \cdot c_{0,L}} \quad . \quad (30)$$

Mit dieser Funktion Gl. 30 lässt sich durch Bestimmung der Konzentration c_R unter der Bedingung $k'_{ag} \gg L_m$ bei bekanntem $c_{0,R}$ und verschiedenen $c_{0,L}$, die Affinitätskonstante K ermitteln.

Die Ableitung für Moleküle mit zwei gleichwertigen Bindungsstellen (z.B. Antikörper) ermittelt sich die Konzentration an vollständig besetzten Rezeptormolekülen bei Annahme einer Binomialverteilung aus [Stevens_1987]:

$$c_{R,vollst} = \frac{c_{RL}^2}{2c_{0,R}} \quad . \quad (31)$$

Hierbei ist $c_{0,R}$ die Anfangskonzentration der Bindungsstellen des Rezeptors. Da die Rezeptoren nun zwei Bindungstaschen haben, gilt:

$$c_{0,R} = 2c_{0,R-Moleküle} \quad . \quad (32)$$

Die Konzentration an freien Rezeptormolekülen ist:

$$c_R = \frac{c_{0,R}}{2} - \frac{c_{RL}^2}{2c_{0,R}} \quad . \quad (33)$$

Am Testmittelpunkt einer Kalibrierkurve ist die Hälfte der Rezeptormoleküle vollständig besetzt:

$$c_{R,vollst} = \frac{c_{0,R}}{4} \quad . \quad (34)$$

Für die Konzentration des Komplexes am Testmittelpunkt ergibt sich:

$$c_{RL\ TM} = \frac{c_{0,R}}{\sqrt{2}} \quad . \quad (35)$$

Gleichung Gl.35 eingesetzt in Gl.30 und nach K aufgelöst, ergibt für divalente Rezeptoren eine Affinitätskonstante von:

$$K = \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2} \cdot c_{0,L-TM} - c_{0,R}} \quad (36)$$

wobei $c_{0,L-TM}$ die Konzentration des Liganden am Testmittelpunkt ist [Piehler_1997].

Die Berechnungen gelten auch für monoklonale Antikörper. Bei polyklonalen Antikörpern findet man eine Affinitätsverteilung, die zumeist nicht symmetrisch ist. In diesem Fall können nur mittlere Affinitäten bestimmt werden.

Die Ermittlung von Affinitätskonstanten ist hier nur für Systeme beschrieben, die mit einer Fluidik arbeiten. Werden die Reaktionen mit anderen Systemen wie z.B. dem Resonant Mirror, in dem die Proben in Kavitäten gerührt werden, oder aber wie beim parallelen System der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie in stehenden Lösungen gemessen, sind die Verhältnisse anders. In ruhenden Lösungen kann keine kinetische Messung erfolgen, da hier immer auf Grund der mit der Zeit zunehmenden Dicke der Diffusionsgrenzschicht eine sich ändernde Massentransportlimitierung vorliegt. Damit ist auch die Signaländerung nicht mehr proportional zur Konzentration des Bindungspartners in Lösung. Ein möglicher Ansatz zur Ermittlung von Affinitätskonstanten in ruhenden Proben ist die zeitliche Messung von Mischungen [Zhuang_2001].

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standard(bio)chemikalien sofern nicht anders angegeben: Fa. Fluka Neu-Ulm, Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS), Diisopropylcarbodiimid (DIC), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurden von der Fa. Fluka, Neu-Ulm erworben.
- Aminodextran (AMD) 260/10, hergestellt wie in [Piehler_1997a] beschrieben.
- Diamino- und Dicarboxy-Polyethylenglycol (DA- bzw. DC-PEG) Rapp Polymere, Tübingen.
- Atrazin-(2-Chlor-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-) Elly Lilly, Seelze,.
- Der monoklonale Antikörper α -2,4-D IgG gegen 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4-D) wurde freundlicherweise von Dr. M. Franek, Veterinary Research Institute, Brno, Tschechische Republik zur Verfügung gestellt.
- Die Analytderivate ACA und DN1 wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Fr. B Hock, (TU München) synthetisiert und aufgereinigt.
- Die Estronderivate (E13CME), (E₁17CMO) sowie die polyklonalen Antikörper α -Simazine IgG, α -Atrazin IgG, polyklonaler α -Estron IgG and der polyklonale α -total Estrogen IgG wurden freundlicherweise von Dr. R. Abuknesha (King's College, London) zur Verfügung gestellt.
- Exonuklease III wurde von USB, Cleveland, Ohio, USA bezogen.
- Transglutaminase EC 23.2.13 aus Guinea Pig Liver (T 5398) wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.
- Monoklonaler Mausantikörper gegen Transglutaminase CUB 7402 wurde von NeoMarkers, Fremont/USA bezogen.

- Die Antikörper und DNA Moleküle wurden für Messungen mit TIRF mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5TM (Amersham, Freiburg) nach dem in [Schobel_1999] beschriebenen Protokoll markiert.
- Die im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Zöliakie notwendigen Peptide wurden im AiF-Projekt Mf-HTS im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jung von Dipl. Chem. Jörg Bauer synthetisiert und aufgereinigt.
- Alle Sequenzen der Peptidnukleinsäure wurden von Applera Deutschland GmbH (Überlingen, Germany) zur Verfügung gestellt.

PNA I: NH₂-(5')-OO-CGC TAC AAC CTA CAT-(3')-COOH

PNA II: NH₂-(5')-OO-ATG-TAG-GTT-GTA-GCG-(3')-COOH

- Desoxyribonukleinsäure wurde von IBA GmbH, Göttingen bezogen und HPLC gereinigt.

Für die Nukleasereaktionen:

Mskk21 5'-NH₂-GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3'

Rrasanti8449

5'-NH₂-CCTACGCCACCAGCTCCAACGATAACGCTACAACCTACAR-3'

Antiras8449 5'-TATCGTTGGAGCTGGTGGCGTA -3'-Cy5.5

Für die Bildung von Konjugaten bei Peptid-DNA-Konjugaten und der flexiblen Immobilisierung:

DNA I: 5'NH₂- GGA ATG ATG TAG GTT GTA GCG-3'-(Cy5.5)

DNA II: 5'NH₂- AAC-GCT-ACA-ACC-TAC-ATC-ATT-CC-3'-(Cy5.5)

DNA Ia: 5'NH₂- GGA ATG ATG TAG GTT GTA GCG-3'

DNA IIa: 5'NH₂- AAC-GCT-ACA-ACC-TAC-ATC-ATT-CC-3'

DNA III: 5'NH₂-T₂₀ -3'-(Cy5.5)

- Die Blutseren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K.E.A. Lundin aus dem Riskhospital in Oslo (Norwegen) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung der Seren: negative getestete Seren: DOG, EJ

positiv getestete Seren: KMM, HL, EF, KOL, GII

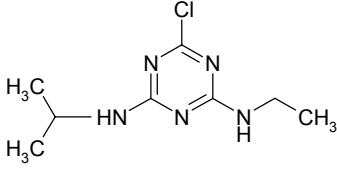
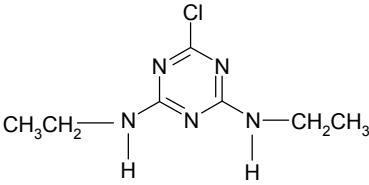
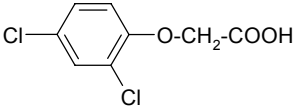
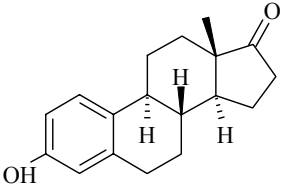
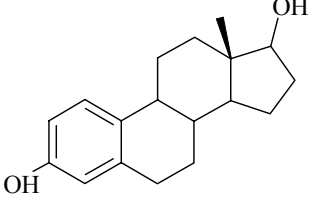
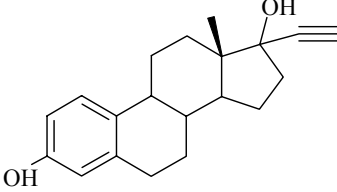
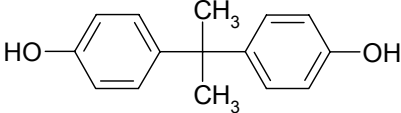
4.1.2 Lösungen

- PBS = phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): 8.76 g (150 mmol) NaCl und 1.36 g (10 mmol) KH_2PO_4 wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M KOH auf pH = 7.4 titriert.
- HEPES Puffer für Enzymimmobilisierung : 50 mM HEPES
- HEPES Puffer für Blutmessungen: 100 mM HEPES, 0.9 NaCl, 0,1 % EDTA
- Tris Puffer für Blutmessungen: 100 mM Tris/HCl, 0.9 % NaCl, 0.1 % EDTA
- Carbonatpuffer zur Herstellung der DNA Konjugate: 100 mM Na_2CO_3 , 100 mM NaHCO_3 auf pH 9 eingestellt.
- Regenerationslösung I :
500 mg Pepsin wurden in 25 ml bidestilliertem Wasser ($\hat{=}$ 10 % Lösungsmittel) und 225 ml PBS ($\hat{=}$ 90 % Lösungsmittel) gelöst und mit 2 M HCl auf pH 2 titriert. Die Lösung wurde in 40 ml-Portionen bei -18 °C aufbewahrt.
- Regenerationslösung II :
Die Lösung aus 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 6 M Harnstoff wurde mit HCl auf pH 2 eingestellt.

4.1.3 Verwendete Analyte für die flexible Immobilisierung

Hier werden die untersuchten Analyte in Tabelle 3 vorgestellt. Die verwendeten Analytderivate unterliegen der Geheimhaltung.

Tabelle 3 Analyte für die flexible Immobilisierung

<i>Analyt</i>	<i>Klasse Strukturformel</i>	<i>Molekulargewicht(g/mol)</i>
Atrazin (2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin)	Triazine 	215,7
Simazin (6-Chlor-N ² ,N ⁴ -diethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin)	Triazine 	201,7
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Aryloxyalkansäuren 	221,0
Estron, E ₁		270,4
Estradiol, E ₂		272,4
Ethinylestradiol, EE ₂		296
Bisphenol A, BPA		228

4.2 Methoden

4.2.1 Peptidsynthese

Die N-Cysteinyl Peptide wurden mit der Fmoc/*tert*-butyl-Strategie durch parallele Peptidsynthese auf mit 2-Chlortritylchlorid funktionalisierten Polystyrol-Harzen nach Jung [Jung_1999] erhalten. Initialbeladung des Harzes betrug 0.7-1.1 mmol/g. Für die simultane multiple Peptidsynthese wurde ein Peptid-Synthesizer (SMPS 350, ZinsserAnalytic, Frankfurt) benutzt. Kopplungsschritte wurden mit einem 8-fachen Überschuss von Fmoc-Aminosäuren (0.7 M Fmoc-Aminosäure, 0.7 M HOBT in DMF) durchgeführt. Mit einer 1.5 M Lösung von DIC in Dichlormethan/DMF (2:1 v/v) erfolgte die Aktivierung und Kopplung der Fmoc-Aminosäuren für 60 min. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Piperidin in DMF (1:4 v/v) innerhalb von 20 min entfernt. Abspaltung der Schutzgruppen sowie des Peptides vom Harz erfolgte in Trifluoressigsäure mit 2.5 % Ethandithiol, 2.5 % Wasser, 2.5 % Triisopropylsilan für 3 h. Die Peptide wurden mit Diethylether je 2 ml bei -20°C ausgefällt, zweimal mit eisgekühltem Diethylether gewaschen und dann aus einer *tert*-butyl-alkohol/Wasser-Lösung (4:1 v/v) dreimal lyophilisiert.

```

1. CHTYKYPEGSSSEEREA
2.  CTYKYPEGSSSEEREA F
3.   CYKYPEGSSSEEREA FT
4.    CKYPEGSSSEEREA FT R
5.     CYPEGSSSEEREA FT RA
6.      CPEGSSSEEREA FT RAN
7.       CEGSSSEEREA FT RAN H
8.        CGSSSEEREA FT RAN HL
9.         CSSEEREA FT RAN HL N
10.          CSEEREA FT RAN HL NK
11.           CEEREA FT RAN HL NK L
12.            CEREAFTRANHLNKLA
13.             CREAFTTRANHLNKLA E
14.              CEAFTRANHLNKLA EK
15.               CAFTRANHLNKLA E KE
16.                CFTRANHLNKLA E KE E
17.                 CTRANHLNKLA E KE E T
18.                  CRANHLNKLA E KE E T G
19.                   CANHLNKLA E KE E T GM
20.                    CNHLNKLA E KE E T GMA
21.                     CHLNKLA E KE E T GMAM

```

Abbildung 10: Synthetisierte Peptidsequenzen der Transglutaminase des Proteinsegmentes von 441-475 für das Epitopmapping

Die N-Cysteinyl Peptide wurden mit analytischer HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert. Für die Elektronenspray-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde das Quattro II Tripel Quadrupol Massenspektrometer von Mircomass (Altrincham/UK) verwendet. Alle Peptide zeigten eine HPLC-Reinheit von > 90% (RP.18, Acetonitril/Wasser $\lambda = 214$ nm). Abb. 10 zeigt die synthetisierten Peptidsegmente der Transglutaminase, welche das Proteinsegment von 441-475 mit einer Länge von 35 Aminosäuren abdeckt. Mit einer Peptidlänge von 15 Aminosäuren und einer Verschiebung von einer Aminosäure wurden 21 Peptide synthetisiert, um den in Betracht kommenden Bereich abzudecken.

Außerdem wurden Peptide im Arbeitskreis Bayer für die Untersuchung von Peptid/DNA-Wechselwirkungen synthetisiert. Diese Peptidsequenzen sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst [Bongardt_1999].

Tabelle 4 Peptidsequenzen abgeleitet aus der Homeodomain-Box.

HD20	<i>KSGKPKVTKAKKAAPKKK</i>
P3	<i>QAKKKYLDK</i>
P3II	<i>QAKKKYLDKK</i>
P4II	<i>QAKKKWLDKK</i>
P6	<i>QAKKKLSDK</i>
P9II	<i>QAKKKLFDKK</i>
<i>P27</i>	<i>QAKKKPSDK</i>

4.2.2 Oberflächenchemie

In RfS-Experimenten wurden 12 x 12 x 1 mm Glasträger D263 beschichtet mit 10 nm TA₂O₅ und 330 nm SiO₂, in TIRF-Experimenten Glasobjektträger (60 mm x 15 mm x 1.5 mm) mit einer um 45° angeschrägten Kante verwendet. Reinigung erfolgte über 1 min in 6 M KOH und spülen in Wasser. Abschließende Reinigung und Anreicherung der reaktiven Gruppen auf der Oberfläche erfolgte über 30 minütige Inkubation mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung (60 Vol% konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %) im Ultraschallbad. Abschließend ist gründliches Spülen mit Wasser und Trocknen im N₂ Strom erforderlich.

Nach der Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) über 1 h in einer geschlossenen wasserfreien Glaskammer wurden die Plättchen mit trockenem Aceton

(Wassergehalt max. 0.2 %) gespült, mit Stickstoff trockengeblasen und sofort weiterverarbeitet.

Umsetzung mit einem Spacermolekül

a) AMD 260/10 auf silanisierten SiO₂-Oberflächen

Eine 0.8 mM Lösung von AMD 260/10 in bidestilliertem Wasser wurde auf die silanisierten SiO₂-Plättchen gegeben. Nach Reaktion über Nacht in einer Wasserdampfkammer wurden die Plättchen mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

b) DA- bzw. DC-PEG (MG = 2000 g/mol) auf silanisierten SiO₂-Oberflächen.

Eine 1 mM Lösung von DA- bzw. DC-PEG in Dichlormethan wurde auf die silanisierten SiO₂-Plättchen gegeben. Nach Abdampfen des Lösungsmittels reagierten die Plättchen über Nacht im Ofen bei 70 °C. Die Plättchen wurden nach Herausnehmen sofort mit bidestilliertem Wasser (60 °C) gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

Immobilisierung von Liganden

a) Kupplung von ACA auf mit Aminogruppen modifizierte SiO₂-Oberflächen

Eine frisch hergestellte Lösung von 0.3 M ACA und 1.1 M DIC in trockenem DMF (Wassergehalt max. 0.1 %) wurde auf ein mit AMD modifiziertes SiO₂-Plättchen gegeben und dieses mit einem zweiten Plättchen abgedeckt. Nach Reaktion über Nacht in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer wurde gründlich mit DMF sowie bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

b) Für die kovalente Immobilisierung der PNA wurde die mit Aminogruppen modifizierten SiO₂-Oberflächen mit einer Lösung von 2 mg/μl Glutarsäureanhydrid in DMF 6 h lang in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer inkubiert und anschließend mit DMF und bidest. Wasser gespült. Die jetzt carboxylierte Oberfläche wurde mit einer Lösung aus 1 M N-Hydroxysuccinimid und 1.5 M DCC in trockenem DMF in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 4 h lang aktiviert. Nach dem Spülen mit trockenem DMF und Trocknen im N₂-Strom wurde die PNA mit dem Microdrop-System auf die Oberfläche getropft.

Die Abbildungen 11 und 12 verdeutlichen die Immobilisierung.

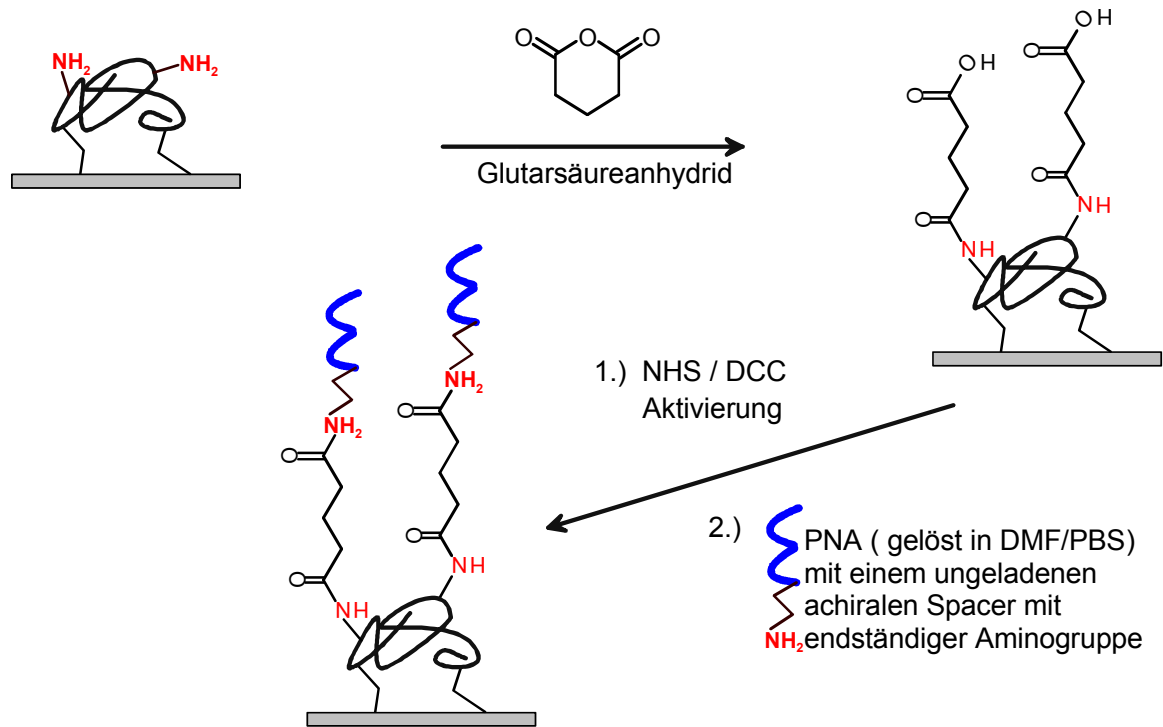


Abbildung 11: Schema der PNA-Immobilisierung

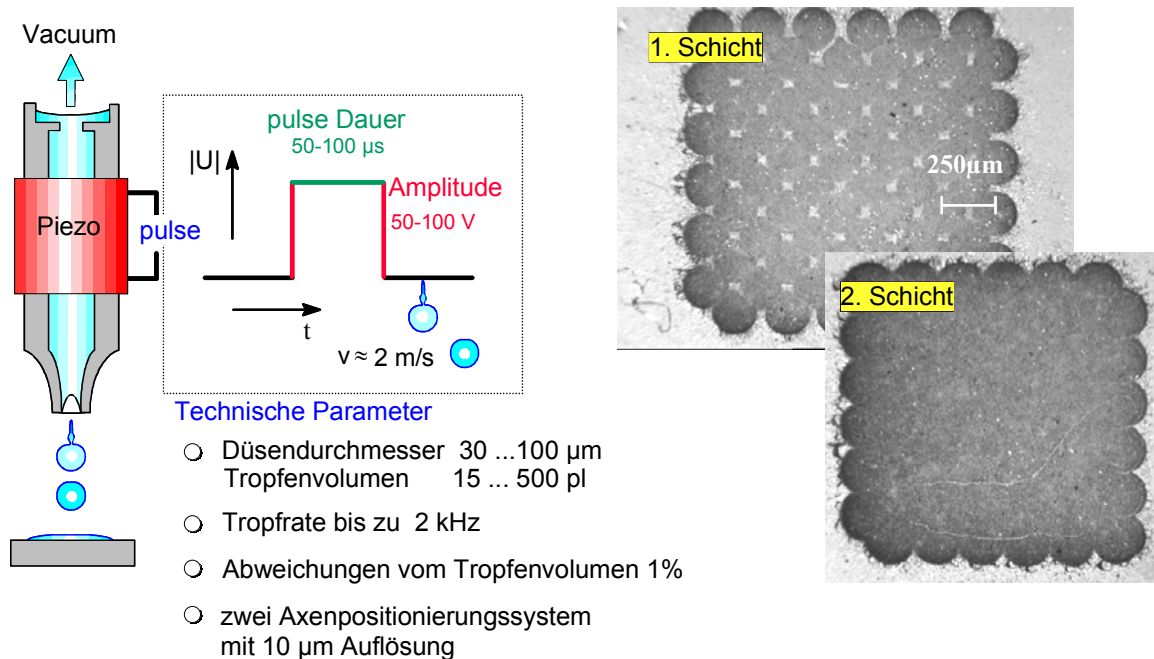


Abbildung 12: Das Microdrop-System und die Verwendung zur Immobilisierung

Eine Lösung aus 2 mg/ml PNA in DMF/PBS pH 7.4 wurde mit der Microdrop-Anlage auf die Oberfläche gespottet. Dabei wurden die Tropfen so nebeneinander gespottet, dass ein Tropfenmuster siehe Abb. 12 entstand. Eine zweite Schicht wurde versetzt darüber getropft.

Während des Tropfvorgangs wurde die Oberfläche des Glastransducers auf 40 °C erhitzt, damit die Tropfen schnell verdampfen und somit eine Konzentrierung auf der Oberfläche bewirkt wurde. Mit dieser Methode lassen sich homogene Oberflächen mit hoher Belegung erzielen [Stemmler_1999]. Bei der Immobilisierung von PNA ist auf ein gutes Abspülen der Transducer mit DMF zu achten, da nicht immobilisierte PNA an der Oberfläche haften bleiben kann, die dann im Laufe der Messungen abgespült wird. Dies kann auf den RfS-Transducern in einigen Fällen zu einer so hohen Schichtdicke führen, dass kein auswertbares Interferenzspektrum aufgenommen werden kann.

c) Immobilisierung von Peptiden

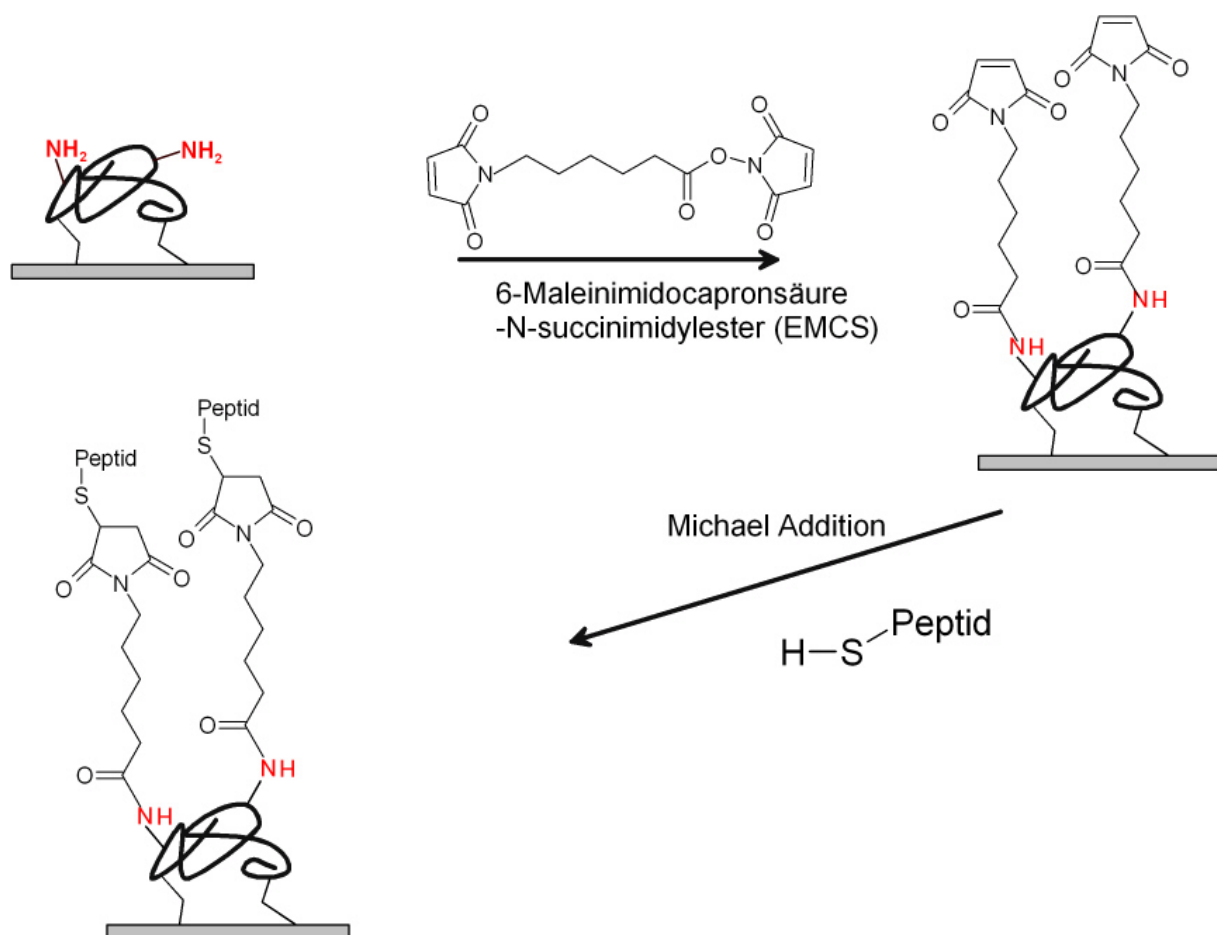


Abbildung 13: Schema der Peptidimmobilisierung

Eine Aminodextranoberfläche wurde mit 6-Maleinimidocapronsäure–N-succinimidylester in einer Konzentration von 1 mg/10 μl DMF in DMF Atmosphäre 12 h lang inkubiert. Nach dem Spülen mit DMF und Trocknen mit N_2 wurde das N-cysteinyl-Peptid in einer Konzentration von 1 mg in 10 μl DMF eingesetzt und 12 h in einer DMF gesättigten Glaskammer inkubiert.

Nach gründlichem Spülen mit DMF ist der Transducer einsatzbereit. Für schlecht lösliche Peptide kann die Lösung kurz dem Ultraschall ausgesetzt werden, wenngleich hier auch Peptide zerstört werden können [Hermanson_1992].

4.2.3 Herstellung der DNA-Analytderivatkonjugate

Eine 1.1 M Lösung von NHS in DMF wurde zu einer Lösung aus 5 mg des entsprechenden Analytderivats in 100 µl trockenem DMF gegeben und auf Eis gekühlt. Eine 1.5 M Lösung aus DCC wurde zugegeben. Die Mischung wurde 12 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde der ausgefallene Harnstoff abzentrifugiert und die Lösung zur weiteren Verarbeitung bei -18°C aufbewahrt.

Eine Menge von 2.3×10^{-7} mol aktiviertes Analytderivat in 2 µl DMF wurde zu einer Lösung aus 300 µg DNA in 40 µl Carbonatpuffer pH 9.0 gegeben und 12 h bei RT inkubiert und anschließend in der HPLC auf einer C-18 Oligosäule mit einem Gradienten von 10-40 % Acetonitril in 0.1 M Triethylaminacetat aufgereinigt. Das Verhältnis von umgesetzter DNA zu eingesetzter DNA wurde spektrometrisch mit einem Verhältnis von 1.1/1 bis 1.8/1 ermittelt. Dies entspricht einer Kopplungseffizienz von 52 % bis 65 %.

4.2.4 Bindungshemmtest

Der Bindungshemmtest nach Piehler wurde zur Bestimmung von Affinitätskonstanten nach Abschnitt 3.3.2 verwendet [Piehler_1997a]. Aliquots der gleichen Konzentration von Antikörpern wurden mit unterschiedlichen Konzentration des Analyten vermischt. Die Mischungen wurden je nach verwendeten Substanzen fünf bis 30 min vorinkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung der Bindung von Antikörper und Analyten in der Lösung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Gleichgewichtskonzentration der Antikörper im Flusssystem mit RfS oder TIRF bestimmt. Nur die nicht vom Analyten besetzten Bindungsstellen des Antikörpers binden an die Oberfläche des mit Analytderivat immobilisierten Sensors. Unter massentransportlimitierten Bedingungen steigt die Bindungskurve linear an. In Mischungen mit hoher Analytkonzentration werden viele Bindungsstellen des Antikörpers mit Analyten während der Vorinkubation besetzt und die Steigung der Bindungskurve ist klein. Bei kleiner Analytkonzentration in der Mischung ist die Steigung der Bindungskurve dagegen groß. Die Steigung der Bindungskurve ist proportional zur Konzentration an freien Antikörpern. Über die Auftragung der Steigung gegen die Analytkonzentration wird eine abfallende sigmoidale Kurve erhalten. Nach dem in Abschnitt 3.3.2 vorgestellten Modell lässt sich daraus die Affinitätskonstante ermitteln. Mit dem hier

eingesetzten TIRF System ist keine Beobachtung der Steigung der Messkurve möglich (Abschnitt 4.3.3), daher trägt man hier Endsignal gegen Analytkonzentration auf und approximiert mit der Logistikkfunktion.

4.2.5 Kapillargelelektrophorese (CGE)

Die Methode der Kapillargelelektrophorese wurde für die Beobachtung der Nukleasereaktion in Lösung gewählt, da es hiermit im Gegensatz zu HPLC und klassischer Gelelektrophorese möglich war, auch DNA-Stränge mit einer Länge von weniger als 50 Basen zu trennen und da sie aufgrund ihrer nicht denaturierenden Methode auch die Trennung von Einzel- und Doppelstrang erlaubt. Die Kapillarlänge beträgt zwischen 1 und 2 cm. Die Kapillare wurde mit Polyacrylamid gefüllt. Aufgetrennt wurde nach Masse durch Anlegen eines elektrischen Feldes ohne Fluss mit nachfolgender UV-Detektion bei 260 nm [Freudemann_2001].

Für den Assay wurden der Doppelstrang mit jeweils einer Konzentration von $1.24 \cdot 10^{-4}$ M der Einzelstrangmoleküle oder der Einzelstrang $2.48 \cdot 10^{-4}$ M zusammen mit der Exonuklease III in einer Aktivität von 1 U/ μ l 30 min bei 37 °C in autoklaviertem Tris-Nukleasepuffer mit und ohne Mg^{2+} inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 0.01 M EDTA abgestoppt. Da die CGE nur bei geringen Ionenstärken arbeitet, wurden die Ansätze über Nacht im Kühlschrank gegen autoklaviertes bidestilliertes Wasser mit einer Trennmembran der Ausschlussgröße von 300 g/mol dialysiert und anschließend direkt in der CGE vermessen.

4.2.6 Flexible Immobilisierung von Analytderivaten

Das Prinzip der flexiblen Immobilisierung ist in Abb. 14 gezeigt. Eine PNA-Sequenz wird an die Oberfläche immobilisiert. Um eine Selektivität der PNA-Oberfläche zu erreichen, wird ein Konjugat aus DNA und Analytderivat verwendet (siehe 4.2.3).

Im ersten Schritt wird das Konjugat (A) an den Spot mit der für diese DNA komplementären PNA hybridisiert. Danach kann dann die entsprechende Antikörperkonzentration bestimmt werden. Nach der Regenerierung kann ein anderer Antikörper am selben Spot unter Verwendung des entsprechenden Konjugates (B) mit der gleichen DNA-Sequenz wie Konjugat (A) nachgewiesen werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Konjugate mit der gleichen DNA-Sequenz können so verschiedene Antikörper hintereinander am selben Spot mit derselben PNA-Oberfläche nachgewiesen werden.

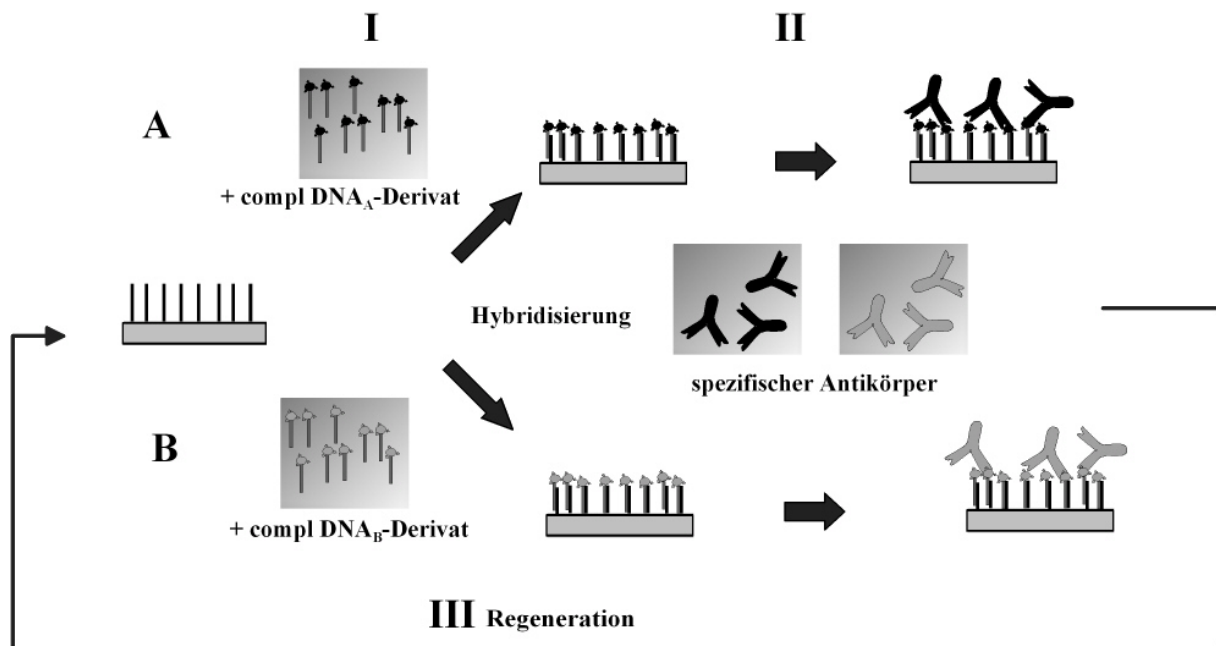


Abbildung 14 Schema der flexiblen Immobilisierung auf Biosensoroberflächen: Grundlage ist eine Oberfläche, auf welcher unterschiedliche PNA-Sequenzen an verschiedenen Spots immobilisiert wurden. Im ersten Schritt (I) wurde das DNA-Analytderivat-Konjugat an die Oberfläche hybridisiert. Im nächsten Schritt (II) wurde der Antikörper gegen das auf der Oberfläche hybridisierte Analytderivat detektiert. Zum Schluss (III) wurde die Oberfläche regeneriert und die Funktionalität des Spots konnte durch die Verwendung eines anderen Konjugates gewechselt werden [Bier_1999] (B Schritt II).

4.3 Geräte

4.3.1 Einkanal-RIFS

Beim Standardaufbau des Einkanal-RIFS wird Licht einer 20 W Halogenlampe (6 V) über einen Hohlspiegel, einen Kondensator und eine Linse in den Lichtleiter (1 mm Polymerlichtleiter (PMMA), 2-auf-1 Faserkoppler, (Kopplungsverhältnis 1:1)) eingekoppelt. Über diese Faseroptik wird das Licht senkrecht auf den Transducer geführt. Das Schichtsystem des Transducers besteht aus einer Glasschicht D263 von 1 mm, einer reflektionsverstärkenden Tantalpentoxidschicht von 10 nm und einer Siliziumoxidschicht von 330 nm. Das reflektierte Licht wird über die gleiche Faser zu einem simultanen Spektralphotometer SPEKOL 1100 von Zeiss, Jena, modifiziert nach [Schmitt_1997] geführt. Als Diodenzeile diente ein MMS, 300-1100 nm, 256 Dioden, 14 Bit nominelle Dynamik, Integrationszeit 20-30000 ms.

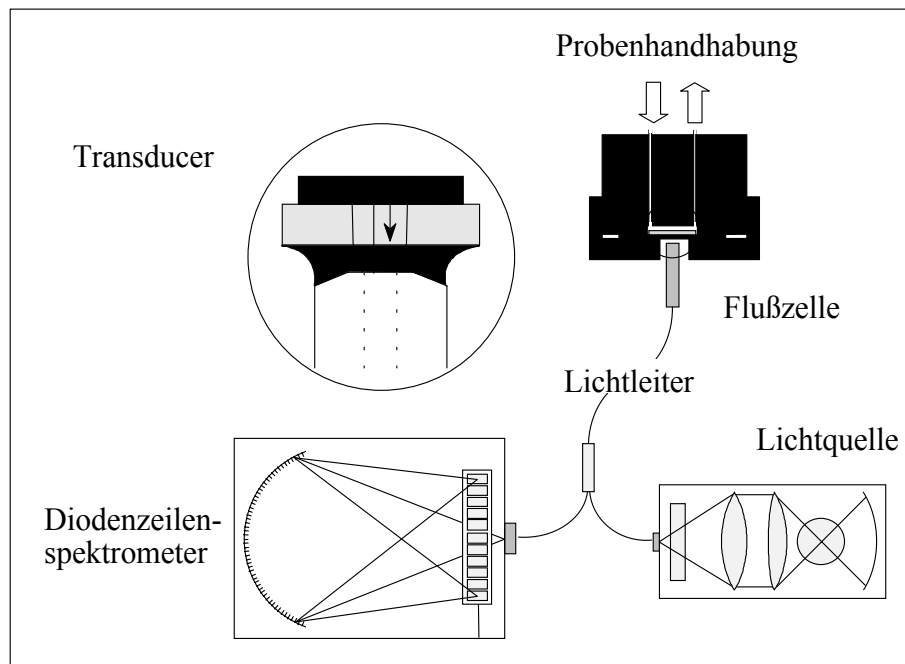


Abbildung 15: Schematischer Aufbau des Einkanal-RIfS

Zur Messung in ruhenden Lösungen wurde eine küvettenähnliche Messzelle verwendet. Für Messungen im Fluss wurde ein Fließ-Injektions-Analyse-System mit Autosampler von Ismatec, Wertheim verwendet. Nähere Beschreibungen finden sich in [Länge_2000].

Auswertung der Spektren

Es ist eine Auswertesoftware „IFZ“ von A. Brecht und G. Kraus etabliert, die die Verschiebung des Interferenzspektrums an einem Extrempunkt on-line auswertet. Die Interferenzspektren $I_k(\lambda)$ wurden nach folgender Gleichung ermittelt, wobei $I_z(\lambda)$ das Dunkelsignal und $I_R(\lambda)$ das Referenzsignal ist, welches sich aus Messungen an Glasträgern ohne Interferenzschicht ergibt.

$$I_K(\lambda) = \frac{I(\lambda) - I_z(\lambda)}{I_R(\lambda) - I_z(\lambda)} \quad (37)$$

Das „IFZ“-Programm passt eine Parabel an ein ausgewähltes Extrema des korrigierten Spektrums an und misst die Verschiebung der Lage des ausgewählten Extrempunktes. Durch die Datenübergabe an ein zweites Programm „Measure“ können die Änderungen on-line verfolgt werden.

4.3.2 Paralleles RfS

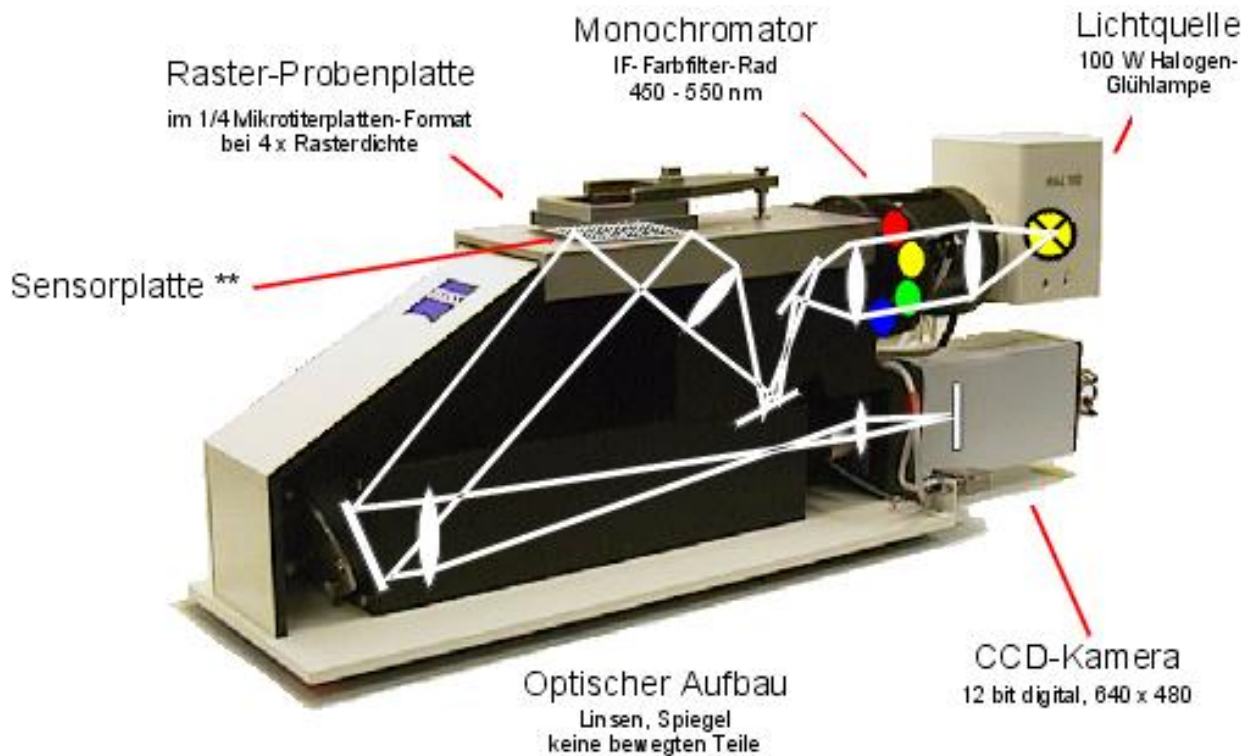


Abbildung 16: Demonstrator null, erster Prototyp des parallelen RfS-Aufbaus

Es wird eine gekühlte DALSA Kamera mit 256x256 Pixel verwendet. Im Filterrad sind Filter der Wellenlänge von 532 nm, 551 nm, 581 nm, 603 nm, 625 nm und 658 nm enthalten. Die ausgeleuchtete Fläche des Glastransducers beträgt $31 \times 45 \text{ mm}^2$, der Einstrahlwinkel des Lichtes beträgt 50° . Auf die Glasplatte des optischen Systems wurde mit einer Zwischenschicht aus Glycerin der Glastransducer (BK7 Glas, 10 nm Ta_2O_5 , 330 nm SiO_2) aufgebracht. Die Kavitäten werden beim Demonstrator null mittels einer Silicondichtung und einer Lochplatte mit einem 6×8 Array aus Kunststoff gebildet, welche über eine Schraube an die Glasplatte gedrückt wird. In die Kavitäten können $50 \mu\text{l}$ eingefüllt werden. Es ist manuelles Pipettieren erforderlich. Die Parameter des Demonstrator null sind ein rms-Rauschen von sieben pm, eine Drift von $< -0.02 \text{ pm/s}$ und eine Zeitauflösung von 10-20 s. Der parallele miniaturisierte RfS-Aufbau ist in Abb. 17 gezeigt [Schütz_2000].

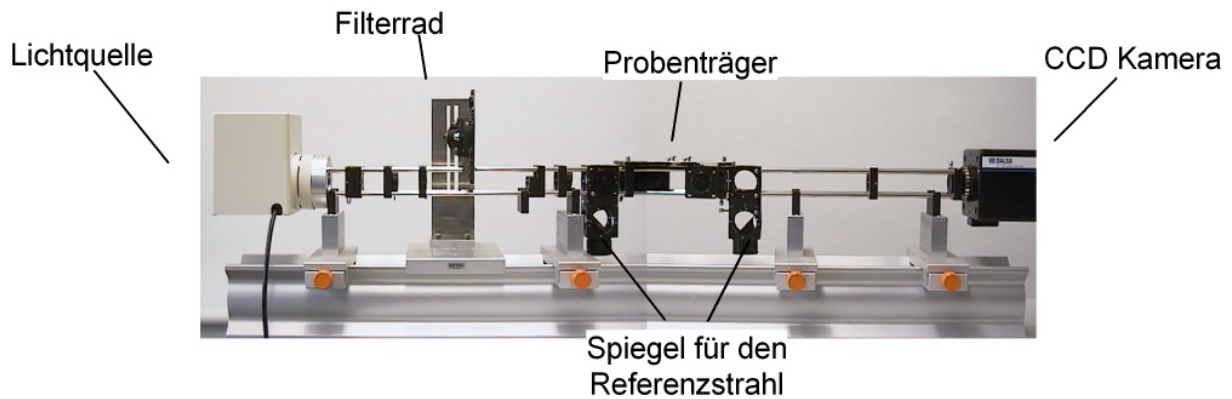


Abbildung 17: Optischer Laboraufbau des miniaturisierten parallelen RI/S

Beim miniaturisierten Aufbau beträgt die ausgeleuchtete Fläche des Transducers $12 \times 18 \text{ mm}^2$ und der Einstrahlwinkel des Lichtes 45° . Es wurde eine gekühlte DALSA Kamera mit 256×256 Pixel verwendet. Im Filtrerrad sind Filter mit einer Wellenlänge von 620 nm, 656 nm, 694 nm, 730 nm, 760 nm, 800 nm, 852 nm enthalten, weswegen in diesem Aufbau Glastransducer verwendet werden, die statt der 330 nm SiO_2 eine 600 nm dicke SiO_2 Schicht besitzen [Rothmund_1999]. Bei diesem Laboraufbau ist die Optik noch nicht optimal ausgerichtet. Deshalb sind Rausch- und Driftverhältnis erheblich schlechter (Faktor 10-100) als im Demonstrator null. So wurde ein rms-Rauschen von 50 pm erzielt.

4.3.3 RIANA-Aufbau

Beim River Analyser (RIANA) handelt es sich um einen Biosensor, der nach dem Prinzip der Total Internal Reflection Fluorescence arbeitet.

Zur Erzeugung eines Flusses dient eine Hubkolbenspritze ($V = 1 \text{ ml}$) mit Schrittmotor (Unterteilung in 30000 Schritte). Weiterhin gehören zwei Ventilsysteme zur Steuerung von Flüssen (ein T-Ventil und ein 6-Wege-Ventil) sowie eine Probenschleife und die Durchflusszelle zur FIA. Eine genauere Beschreibung der technischen Details findet sich bei [Klotz_1998].

Das optische Messsystem besitzt folgenden Aufbau (s. Abb.18):

Eine Laserdiode erzeugt einen Lichtstrahl (Durchmesser = 1 mm), welcher über die auf 45° angeschrägte Seite des Glastransducers in denselben eingekoppelt und durch innere Totalreflexion weitergeführt wird. Am Ende dieses Strahlengangs wird das Licht durch dort aufgebrachte Tinte absorbiert. Eine genaue Justierung des Laserstrahls zum Einkoppeln und zur Erzeugung von regelmäßigen Reflexionspunkten wird über die Positionierung der Laserdiode erreicht. Bei optimaler Einstellung ist der Abstand zwischen zwei

Reflexionspunkten gleich dem Abstand zweier Polymerlichtleiter (PML); so wird eine maximale Lichtintensität zur Fluorochromanregung erzielt.

Das an den Reflexionspunkten (Spots) erzeugte Fluoreszenzlicht wird in alle Raumrichtungen abgestrahlt. Die PML befinden sich auf der Rückseite des Transducers und können nur einen geringen Prozentsatz dieses Lichts von theoretisch 5 % einfangen. Daher wird mit hoher Leistung des Anregungslichtes gearbeitet. Um ein Photobleaching zu verhindern, wird während der Bindung der fluoreszenzmarkierten Substanz der Shutter geschlossen und nur kurz nach erfolgter Bindung wieder geöffnet. Die Filter am Ende der PML absorbieren eingestreutes Laserlicht (Fehlstrahlung), so dass nur das Fluoreszenzlicht den Detektor (Photodioden) erreicht. Ein anschließender Verstärker mit Lock-In-Technik berücksichtigt dabei nur Spannungssignale, die der Frequenz des gepulsten Lasers entsprechen. Dies ermöglicht eine weitgehende Unterdrückung des störenden Umgebungslichts.

Das so detektierte Messsignal wird on-line von einem PC mit AD-Karte aufgezeichnet.

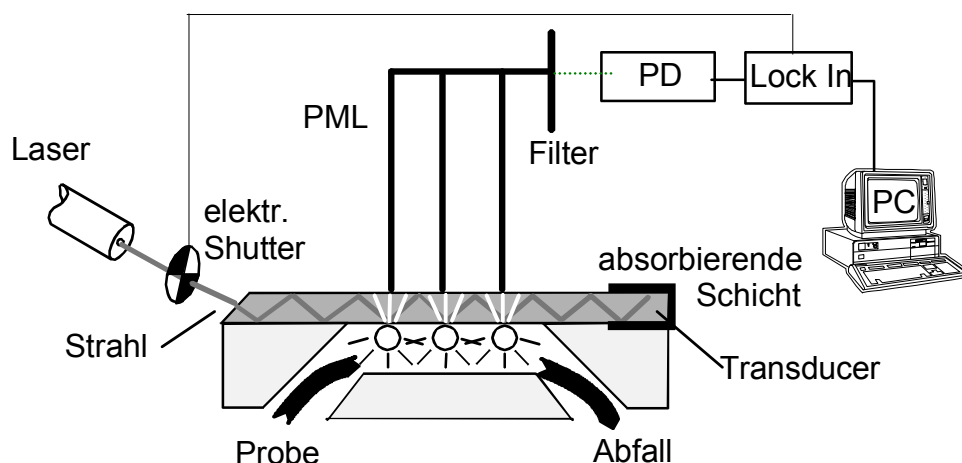
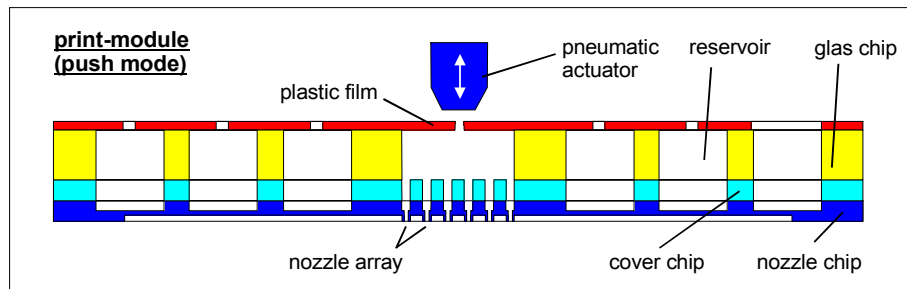


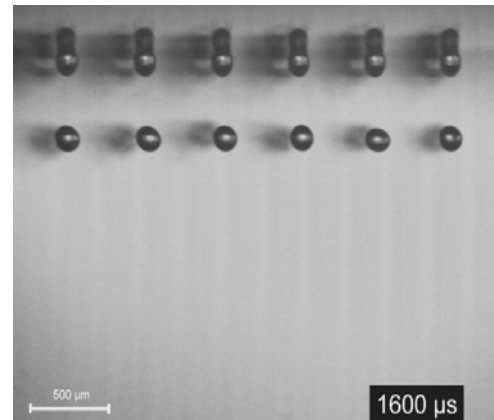
Abbildung 18: System des River Analyser

4.3.4 Top-Spot

Der Top-Spot E zur parallelen Probendosierung wurde von der Fa. HSG-IMIT/Villingen-Schwenningen bezogen. Es wurde ein 96-Medien Druckkopf verwendet.



a) Darstellung des Querschnitts eines TopSpot Druckkopfes



b) TopSpot-Dosierkopf mit 24 Reservoiren sowie den Kanälen zu dem mittigen Düsenarray

c) Momentaufnahme von der hochparallelen Abgabe der Tropfen (6 der 24 Tröpfchen liegen im Schärfbereich)

Abbildung 19: Funktionsprinzip des TopSpots

Kernstück des Verfahrens ist ein Nanodispenser, der auf der Oberseite 24 bzw. 96 verschiedene Medienreservoir in dem Raster einer 384-well-Mikrotiterplatte aufweist (siehe Abbildung 19). Auf der Unterseite befinden sich Mikrodüsen im Rasterabstand von 500 µm [Ducree_2000]. Das Volumen der Tropfen des Top-Spots beträgt je nach Einstellung der Amplitude 1-6 nl. Das Volumen wird jeweils vor der Messung durch Abgabe von 1000 Tropfen und Abwiegen bestimmt. Daraus wird die Zahl der Tropfen ermittelt, mit der die Kavitäten befüllt werden müssen.

4.3.5 Kontaktwinkelmessungen

Bei der Bestimmung des Kontaktwinkels von Wasser auf der Kunststoffoberfläche der Nanokavitäten des Mini-RIfS wurde nach der Methode des „aufliegenden Tropfens“ gearbeitet. Dazu wurde mit einer Spitze ein kleiner Wassertropfen auf die gereinigt

Oberfläche abgesetzt und mit einer Kamera aufgenommen. Die Form des Tropfens wurde mit Hilfe der KSV-Software polynomialisch angepasst und daraus der Kontaktwinkel bestimmt.

4.3.6 Optisches Profilometer

Das optische Profilometer MicroProf® der Firma Fries Research & Technology GmbH nutzt als Messprinzip ein Verfahren, welches die chromatische Aberration von Linsen ausnutzt. Dabei wird die Probe mit fokussiertem Weißlicht bestrahlt. Eine passive Optik mit großer chromatischer Aberration fächert dieses vertikal in Fokuspunkte verschiedener Farbe und somit Höhe auf. Beim Auftreffen von fokussiertem Licht auf die Oberfläche wird dieses im Gegensatz zu unfokussiertem Licht optimal reflektiert. Dieses reflektierte Licht gelangt durch dieselbe Optik und ein Glasfaserkabel zu einem Miniaturspektrometer. Die dort detektierte Wellenlänge ergibt über eine Kalibrationstabelle die Entfernung des Sensors von der Probe.

4.3.7 HPLC

Es wurde eine Sykam-HPLC-Anlage mit den Komponenten S 1110, S 5110 und S 8110 verwendet, die mit einer RP-C18-Säule (25x4 mm, Material: Nukleosid 100 Korngröße 5 µm) ausgestattet war. Als Laufmittel wurde Acetonitril (20 % und 50 %) in 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer verwendet. Laufprofil war: 1. Fünf Minuten mit 20% ACN, 2. Acht Minuten ein linearer Gradient von 20 % auf 50 % zur Trennung der DNA-Analytderivate 3. Zwei Minuten 50 % ACN, 4. Zwei Minuten ein linearer Gradient von 50 % auf 20%. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte über UV-Absorption bei 260 nm mit einem Linear UV/VIS 205 Detektor. Die Ansteuerung und die Aufzeichnung der Chromatogramme wurde von der Software Pryamid übernommen.

5 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit sollen Wechselwirkungen von Peptidmolekülen mit DNA und Antikörpern untersucht werden. Das Kapitel gliedert sich in vier Abschnitte: Zunächst werden Peptid/DNA Wechselwirkungen mit RfS vermessen und mit den Ergebnissen der Affinitätstitration an einer Affinitätssäule des Arbeitskreises Prof. E. Bayer Org. Chemie, Universität Tübingen im Projekt zur Antisensetherapie verglichen. Dies zeigt die Möglichkeit auf, mit RfS Wechselwirkungen im Bereich der funktionellen Proteomics untersuchen zu können. Im zweiten Abschnitt werden Wechselwirkungen des nicht natürlich vorkommenden Peptids, der Peptidnukleinsäure, mit DNA untersucht und Peptidnukleinsäuroberflächen entwickelt und charakterisiert. Auf diesen Oberflächen werden zwei verschiedene Assaysysteme etabliert, in denen die Peptidnukleinsäure als Ankermolekül an Sensoroberflächen dient. Im dritten Abschnitt wird eine Peptidoberfläche basierend auf Pentadecamerpeptiden aufgebaut, die anschließend zum Epitopmapping des Enzyms Transglutaminase gegen einen Antikörper genutzt wird. Im Weiteren wird die Entwicklung eines Assays zur Detektion von Zöliakie-Antikörpern aus Patientenseren aufgezeigt.

Außerdem soll die Detektion von Antikörpern auf Peptidoberflächen mit RfS auf ein miniaturisiertes System der RfS übertragen werden. Dazu wird ein Kavitätensystem bestehend aus Nanoliterkavitäten entwickelt. Antikörpermessungen in Nanoliterwells werden gezeigt.

5.1 Peptid-DNA-Konjugate

Die Proteine Histin Ic, Nucleoplasmin und Homeodomain binden spezifisch an DNA Sequenzen und sind bekannte Transportproteine für die Einschleusung von DNA in die Zelle. Sie binden über ein Helix-Turn-Helix-Motiv an die DNA. Kurze Peptidsequenzen aus diesen Proteinen sollen in der Antisensetechnologie die Einschleusung des Antisense-Oligonukleotid in das Cytoplasma oder den Kern der Zelle ermöglichen. Gleichzeitig schützen die Peptide die DNA vor Nukleaseangriff. Für den Einsatz in der Antisense-Technologie müssen Peptidsequenzen von hoher Affinität zu Oligonukleotiden gefunden werden. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Bayer wurden verschiedene Peptidsequenzen synthetisiert und ihre Konjugatbildung mit einigen DNA-Sequenzen mit ESI-MS charakterisiert. Mittels Affinitätschromatographie wurde die Affinität ermittelt [Bongart]. Diese Daten sollten in einer Kooperation mit der RfS-Methode verglichen werden. Ziel dieser Untersuchung war das Auffinden von hoch affinen Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten, um diese in der

Antisense-Therapie zur Einschleusung von Antisense-Oligonukleotiden in die Zelle nutzen zu können.

Für erste Messungen wurde DNA der Sequenz DNA III auf einer Dextran Oberfläche immobilisiert. Die schon im Arbeitskreis etablierten DNA-Oberflächen wurden entsprechend [Stemmler_1999] hergestellt. Eine Bindung des Peptides HD20 ist in Abbildung 20 gezeigt.

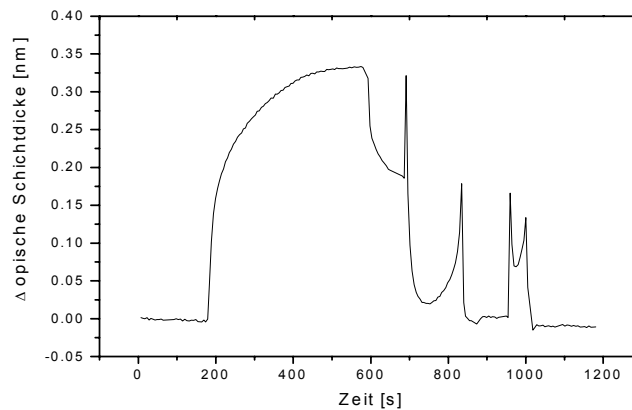


Abbildung 20: Anlagerung von 10 $\mu\text{mol/ml}$ Peptid HD20 an immobilisiertes Antisense-Oligonukleotid mit 2 x HCl Regeneration

Da eine hohe Konzentration von 10 $\mu\text{mol/ml}$ Peptid HD20 zum Nachweis einer Wechselwirkung eingesetzt wurde, musste mit unspezifischer Bindung des Peptides an die Sensoroberfläche gerechnet werden. Daher wurde die Wechselwirkung der Peptide mit der Sensoroberfläche an einem zweiten Messspot detektiert und zur Referenzierung der Peptid-Oligonukleotid-Wechselwirkung verwendet. Der Aufbau eines Zweikanalsystems der RfS wurde zuvor im Arbeitskreis etabliert [Haake_2000]. Hiermit können zwei Spots mit unterschiedlicher Oberfläche auf einem Sensorchip hintereinander vom gleichen Flusssystem durchlaufen und gleichzeitig detektiert werden. Als geeignete Referenzoberfläche erwies sich die Bindung von Ethanolamin an Stelle der Oligonukleotide an die aktivierte Aminodextran-Oberfläche. Der Vorteil im Gegensatz zur Messung an unterschiedlichen Chips liegt in der einheitlichen Herstellung der Oberfläche und der Messung derselben Probe.

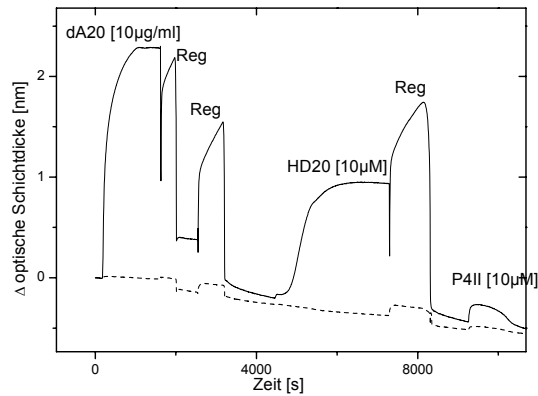


Abbildung 21: Beispielmessung mit dem Zweikanalsystem. Immobilisiert war an Spot 1 DNA III und Spot II Ethanolamin auf AMD-Oberflächen. Gemessen wurde die zu DNA III komplementäre Sequenz, Peptid HD20 und Peptid 4II. Da die Fluidik von Hand bedient wurde und auch das System selber noch instabil war, sind Drifteffekte und Flussprofilfehler mit dieser Anlage zu sehen.

Die Abb. 21 zeigt, dass am mit DNA immobilisiertem Spot Peptidbindung beobachtet wurde, während am Spot ohne DNA keine Bindung stattfand. Nachdem mit Hilfe von Messungen am Zweikanal-RiFS unspezifische Bindung der Peptide auf reinen Dextranoberflächen ausgeschlossen wurde, konnten jetzt alle Peptide auf Bindung an DNA untersucht werden.

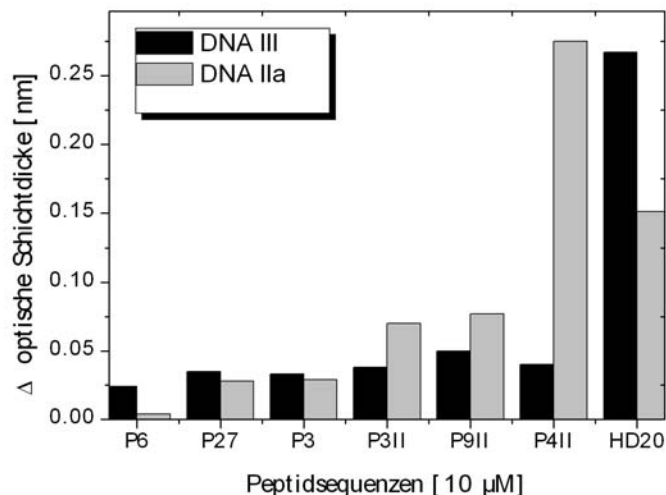


Abbildung 22: Bindung der Peptide an verschiedenen DNA-Sequenzen

Es wurde die Wechselwirkung verschiedener Peptide mit zwei verschiedenen DNA-Sequenzen, DNA IIa und DNA II, untersucht. Zusätzlich wurden die Bindung der Peptide auf einer mit Peptid 5 (Abb. 10) immobilisierten Oberfläche getestet. Es konnte keine unspezifische Bindung dieser Peptide auf einer Peptidoberfläche beobachtet werden. Die

Stärke der DNA-Peptid Wechselwirkung ist abhängig von der Sequenz des Antisense-Oligonukleotid. Allgemein zeigen Peptidsequenzen mit aromatischen Aminosäuren eine erhöhte Affinität zur DNA. Die Einführung eines zusätzlichen Lysins steigert zudem die Affinität der Peptide zur DNA. Zu vermuten ist, dass das unter den Messbedingungen positive Lysin die Abstoßung zur negativen DNA vermindert. Das Peptid HD20 entspricht der natürlichen Sequenz aus der Homeodomain-Box. Das Peptid 4II zeigt das höchste Signal von den nicht natürlich vorkommenden Peptiden. Damit ist das ebenfalls mit einem zusätzlichen Lysin versehene Peptid das Peptid mit der höchsten Affinität zu Oligonukleotiden und sollte für erste Messungen in der Antisense-Therapie im Tierversuch eingesetzt werden. Bei den RfS-Messungen konnten auf Grund der instabilen DNA-Oberfläche nur wenige Messungen mit demselben Transducer vorgenommen werden. Damit war eine Dreifachmessungen für alle Peptide auf einem Transducer nicht möglich. Es wird deshalb auf die Standardabweichungen verzichtet. Auf anderen Transducern konnten die Ergebnisse aber verifiziert werden. Die Ergebnisse der Messung an DNA III mit RfS decken sich mit den Untersuchungen der Affinitätschromatographie.

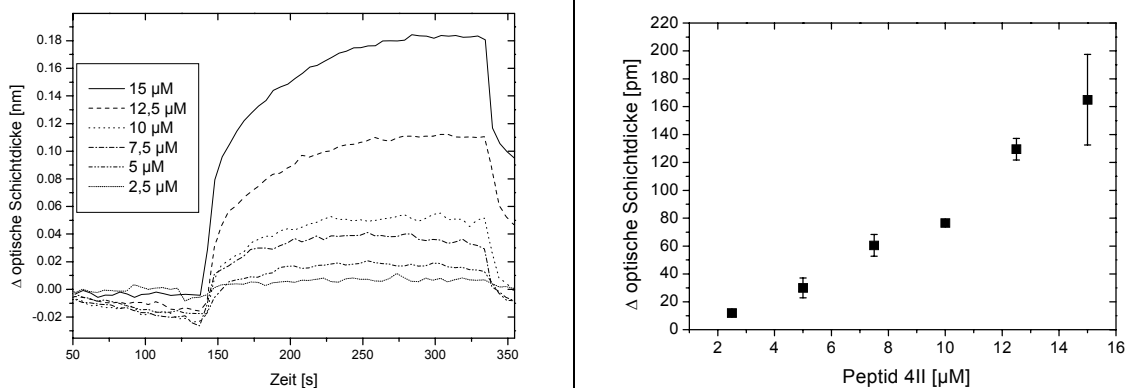


Abbildung 23: Konzentrationsabhängige Messungen von P4II auf AMD, immobilisiert wurde DNA IIa

Das Peptid 4II wurde für weitere Messungen mit RfS eingesetzt. Die Bindung des Peptids 4II wurde bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es konnte ein nahezu linearer Anstieg beobachtet werden. Die Peptide binden als Dimere an die DNA. Es konnte nicht herausgefunden werden, wie viele Peptide an eine einzelne DNA binden. Das 1:1 Bindungsmodell traf nicht zu, welches die Grundlage für fast alle mathematischen Modelle zur Bestimmung von Affinität und Kinetik bildet. Da das Bindungsmodell nur durch Kristallstrukturen der DNA-Peptid-Wechselwirkung bestimmt werden kann, ist im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung von Affinitätskonstanten der Wechselwirkung nicht möglich.

5.2 Charakterisierung und Anwendung von Peptidnukleinsäuren als Anker-moleküle an Sensoroberflächen

5.2.1 Immobilisierung der PNA

Da die Peptidnukleinsäure ein ungeladenes Rückgrat hat, weist sie im Vergleich zur DNA viele neuartige Eigenschaften auf. So ist PNA wesentlich hydrophober als die DNA und lässt sich nur in geringen Konzentrationen von ca. 50 µg/ml in wässrigen Puffern lösen. Geht man von den Erfahrungen der Immobilisierung von DNA aus, wird für die Immobilisierung eine Konzentration von 1 mg/ml benötigt. Es wurden daher PNA-Sequenzen mit dem Linker N2-(2-aminoethyl)-N2-({2-[Di-(2-methoxyethyl)amino]-2-oxoethoxy}acetyl)glycinamid eingesetzt. Zwei der Glyconamide wurden von der Firma Applied Biosystems (USA) hintereinander an den N-Terminus der PNA gekoppelt. Zusätzlich verhindern die Linker die bei PNA vorkommende Selbstaggregation. Als mögliche Lösungsmittel für die PNA waren Dimethylsulfoxid, N-Methylpyrrolidon und Dimethylformamid vorgeschlagen.

Die Immobilisierungseffizienz wurde durch die Hybridisierung von 10 µg/ml der zur PNA komplementären DNA im Fluss mit der RIFS gemessen. Es wurde jeweils versucht, die Konzentration von 1 mg/ml PNA in der Lösung zu erreichen. In reinen organischen Lösungsmitteln konnte die PNA nicht auf Aminodextranoberflächen immobilisiert werden. Da für die Reaktion der Aminogruppen mit der mit NHS/DCC aktivierten Oberfläche die Aminogruppen nicht protoniert sein dürfen, muss die Reaktion bei pH 7 und höher stattfinden. Deshalb wurden Gemische aus den Lösungsmitteln mit PBS pH 7.4 eingesetzt. Mit DMSO/PBS-Gemischen konnte auf Grund der Oxidation des Linkers der PNA in DMSO keine effiziente Immobilisierung stattfinden. Auch mit Gemischen aus Methylpyrrolidon/PBS konnte nur eine geringfügige Immobilisierung, eine Hybridisierungskapazität von < 300 pm, nachgewiesen werden. Daher wurden im Weiteren Zusammensetzungen von DMF/PBS getestet. In Tabelle 5 sind diese zusammengefasst.

Tabelle 5 Immobilisierungseffizienz bei verschiedenen Gemischen von DMF/PBS

DMF	30 pm +/- 20 pm
DMF/PBS (10:90 % v/v)	120 pm +/- 40 pm (PNA fällt aus)
DMF/PBS (25:75 % v/v)	400 pm +/- 80 pm (PNA fällt aus)
DMF/PBS (50:50 % v/v)	1100 pm +/- 100 pm
DMF/PBS (60:40 % v/v)	750 pm +/- 90 pm
DMF/PBS (80:20 % v/v)	100 pm +/- 50 pm (Dosierungsprobleme)

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die höchste PNA-Belegung an der Oberfläche mit einer 1:1 Mischung aus DMF/PBS pH 7.4. Bei diesem Mischungsverhältnis konnte die PNA mit

einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und das Gemisch mit Hilfe der Microdrop-Technologie aufgebracht werden. Mit dem Ink-Jet-Verfahren kann bei höheren DMF-Konzentration nur noch unzureichend dosieren werden.

Bei der Hybridisierung von PNA auf DNA-Oberflächen und DNA auf PNA-Oberflächen sowie die PNA auf PNA-Oberfläche treten keine unspezifischen Bindungen auf.

Bei der RfS-Methode entspricht die Änderung der optischen Schichtdicke von 1 nm etwa der Belegung von 1 ng/mm² Antikörper (persönliche Mitteilung). Überträgt man diese Angabe auf die PNA und DNA-Moleküle, konnte eine aktive Belegung des Transducers mit der PNA von 1.3 ng/mm² erreicht werden, wobei die Umrechnung von Nanometer auf Nanogramm abhängig von den eingesetzten Biomolekülen ist und jeweils empirisch ermittelt werden muss.

5.2.2 Regeneration und Stabilität der PNA-Oberflächen

Wie aus den Abb. 25 zu sehen ist, wurde zunächst mit HCl pH 1.75 regeneriert. Diese Regenerierung war jedoch nicht vollständig. Die PNA-Oberfläche kann nicht durch Temperaturerhöhung auf 95°C regeneriert werden, wie es bei DNA Oberflächen möglich ist, da bei PNA/DNA Duplexen im Vergleich zur DNA/DNA-Duplexen die Schmelztemperatur um 1°C pro Base höher ist und sich daher die beiden Einzelstränge bei 95°C nur ansatzweise voneinander trennen. In einigen Arbeitsgruppen werden PNA-Oberflächen mit NaOH pH 10-11 regeneriert. Da zu erwarten ist, dass bei Kontakt mit einer starken Base die Dextranoberflächen abgebaut werden, wurde eine Abhängigkeit der Stabilität der Dextranoberfläche von der Stärke der NaOH-Konzentration aufgenommen. Ab pH 10 wurde ein Abbau der reinen Aminodextranoberfläche nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Da aber unterhalb von pH 10 keine Regenerierung der PNA-Oberflächen möglich war, scheidet NaOH und andere stark basische Substanzen als Regenerationsmittel aus.

Daher wurde zunächst auf HCl mit verschiedenen pH-Werten getestet.

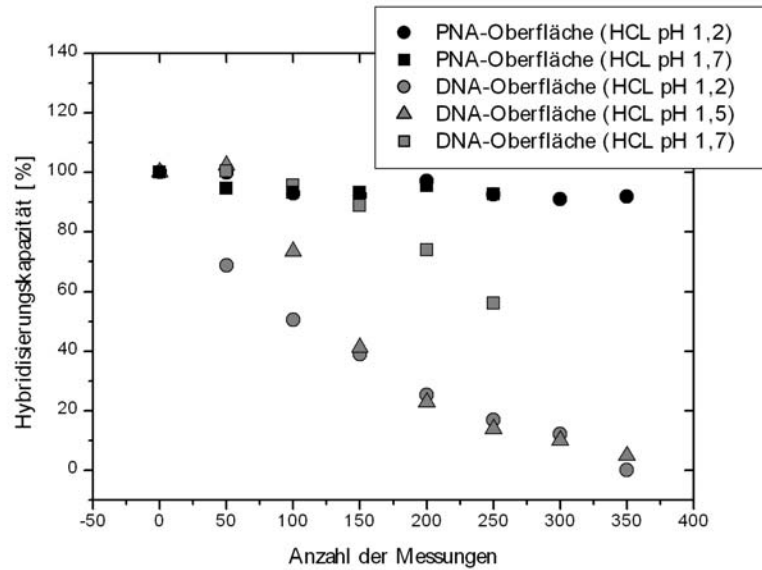


Abbildung 24: Stabilität bei Regeneration von Oberflächen mit immobilisierter PNA I und DNA IIA mit HCl für verschiedene pH-Werte. Die Hybridisierungskapazität wurde mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ komplementärer DNA Ia bestimmt.

In Abb. 24 ist die Stabilität der Oberfläche mit immobilisierter PNA bzw. DNA bei Regeneration mit HCl dargestellt. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Bindungskapazität der DNA-Oberflächen ab. Bei DNA-Oberflächen reicht allerdings HCl von pH 1.7 aus, um eine schnelle und komplette Regenerierung zu erzielen. Bei PNA-Oberflächen konnte zwar mit HCl letztlich auch eine komplette Regenerierung erreicht werden, jedoch wurden hier Standzeiten von über 20 min für eine komplette Regenerierung der PNA-Oberfläche benötigt. In Abb. 25 wird deutlich, dass im Gegensatz zur DNA-Oberfläche die PNA-Oberflächen für mehr als 300 Regenerationen stabil bleiben, zu sehen an der Hybridisierungseffizienz, die bei PNA-Oberflächen im Gegensatz zu DNA-Oberflächen nicht abnimmt.

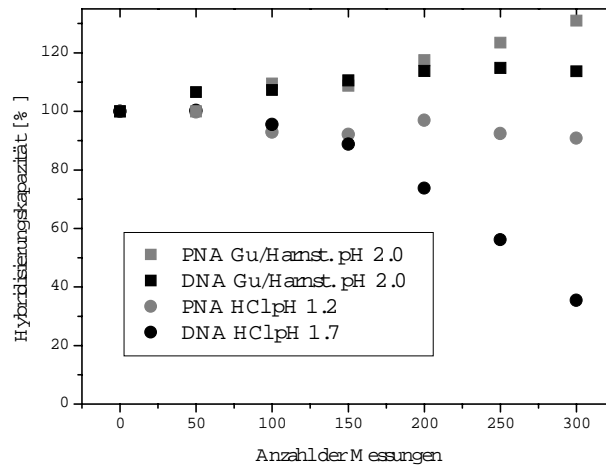


Abbildung 25: Stabilität für unterschiedliche Regenerationsmittel von PNA- und DNA-Oberflächen mit immobilisierter PNA I und DNA IIA. Die Hybridisierungskapazität wurde mit jeweils 10 µg/ml komplementärer DNA Ia bestimmt.

Die Verwendung von HCl als Regenerationsmittel ist auf Grund sehr langen Inkubationszeiten von 30 min nicht optimal. Deshalb wurde nach effizienteren Mitteln gesucht. Harnstoff 6 M/ Guanidiniumchlorid 6M pH 2.0 erwies sich als geeignetes Regenerationsmittel. Hier konnte innerhalb von 5 min eine vollständige Regeneration der Oberfläche erzielt werden. Dies liegt zwar immer noch über der für DNA/DNA Regenerationen mit HCl üblichen 30 Sekunden, man wird jedoch bei PNA-Oberflächen auf Grund der stabileren Bindung vor allem auf Grund der nicht vorhandener Abstoßungskräfte der hybridisierten Stränge immer eine schwierigere Regeneration als bei DNA Oberflächen bekommen. Aus der Abb. 25 ist auch zu sehen, dass DNA-Oberflächen mit der hier eingesetzten Regeneration länger stabil bleiben, als es mit HCl der Fall ist. Guanidiniumchlorid zeigt inhibitorische Wirkung auf Nukleasen. Daher werden die immobilisierten DNA-Moleküle beim Einsatz von Guanidiniumchlorid gegen den Angriff von Nukleasen geschützt und bleiben so länger stabil.

Das Ziel der Verwendung von PNA-Oberflächen anstatt DNA-Oberflächen sollte eine längere Lagerungsstabilität der verwendeten Oberflächen sein.

In Abb. 26 ist ein Vergleich der Langzeitstabilität der PNA-Oberflächen mit DNA-Oberflächen gezeigt.

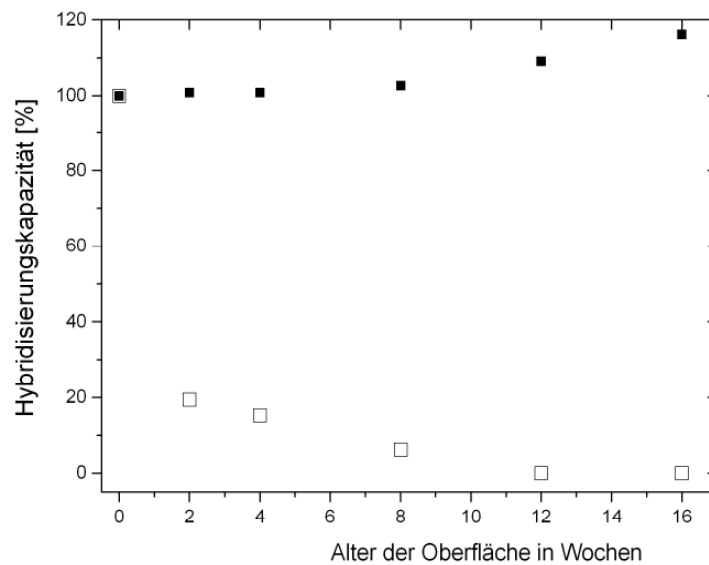


Abbildung 26: Langzeitstabilität der PNA- und DNA-Oberflächen: schwarz zeigt die Hybridisierung von DNA an eine PNA-Oberfläche, weiß zeigt die Hybridisierung von DNA an eine DNA-Oberfläche

Die Transducer sind zwischen den einzelnen Messungen in der Flusszelle eingebaut im Kühlschrank gelagert worden. Dies soll den Zustand simulieren, dass der Chip im System eingebaut bleibt, jedoch das System außerhalb der Messungen gekühlt wird; denn auch die verwendete DNA z.B. für den DNA-Sensor muss gekühlt werden. Mit DNA-Oberflächen wird schon nach zwei Wochen nur noch 20 % des ursprünglichen Signals erreicht und nach 12 Wochen Lagerung im Kühlschrank kann keine DNA auf dem Chip mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigt die PNA-Oberfläche auch nach 16 Wochen noch keinen Verlust der Hybridisierungskapazität. Weitere Lagerungen der PNA-Oberflächen zeigten, dass die PNA-Oberflächen nach einem halben Jahr in allen Fällen noch über 80 %, in den meisten Fällen sogar noch 90 % der ursprünglichen Hybridisierungskapazität aufweisen.

Der in den Abbildungen 25 und 26 dargestellte Anstieg der PNA Hybridisierungskapazität ist ebenfalls reproduzierbar und kann mit einer im Laufe der ersten Messungen erfolgten senkrechten Aufstellung der nicht negativ geladenen PNA von den Dextranoberflächen erklärt werden. Dadurch werden mehr PNA-Moleküle an der Oberfläche zugänglich.

Wenn DNA als Anker-molekül an Sensoroberflächen eingesetzt wird, werden DNA Längen von 20-30 Basenpaaren gewählt. Die PNA kann jedoch nur mit einer maximalen Länge von 18 Basenpaaren synthetisiert werden [AppliedBiosystems_2002]. Aus [Kröger_1998] ist bekannt, dass die Affinität von der Länge der DNA bzw. PNA abhängt, und die PNA/DNA-Bindung bei gleicher Länge eine höhere Affinität als die DNA/DNA-Bindung aufweist. Hier

muss zunächst ermittelt werden, ob die in dieser Arbeit verwendete PNA mit einer Länge von 15 Basen eine vergleichbare Affinität hat wie die normalerweise verwendeten DNA Anker-moleküle von einer Länge von 20 bis 24 Basenpaaren. Die hier verwendete DNA hatte eine Länge von 21 Basenpaaren.

Tabelle 6 Kinetik der DNA/DNA und PNA/DNA Wechselwirkungen

	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_A [M^{-1}]
DNA/DNA	$1.03 \cdot 10^4$	0.005	$2.06 \cdot 10^7$
PNA/DNA	$3.61 \cdot 10^4$	0.002	$1.56 \cdot 10^7$

Die PNA/DNA Wechselwirkung eines 15mers erreicht etwa eine gleich hohe Affinität wie die der DNA/DNA Wechselwirkung eines 21mers. Damit lassen sich längeren DNA-Sequenzen auf Grund der höheren Affinität durch die PNA-Sequenzen der Länge von 15 Basen ersetzen. Die hier entwickelten PNA-Oberflächen sollen im Projekt zur Entwicklung eines Sensors eingesetzt werden. Mit diesem Sensor sollen Punktmutationen erkannt werden. Deshalb wurden Messungen zur Unterscheidung von Punktmutationen auf dem PNA-Sensorchip mit dem des DNA-Sensorchips verglichen. Die Bestimmung der Kinetik erfolgt dann für verschiedene Punktmutationen im weiteren Projektverlauf.

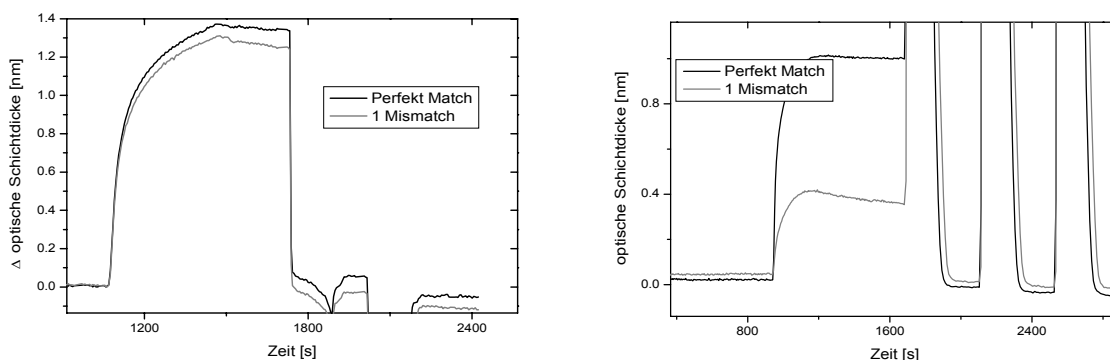


Abbildung 27: Unterscheidung von Punktmutationen auf DNA und PNA-Oberflächen bei RT

Die Hybridisierung von 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA und 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA mit einer Mutation in der Mitte der eingesetzten 21 Basen lange Sequenz wurde mit RfS einmal für eine DNA-Oberfläche (links) und einmal für eine PNA-Oberfläche (rechts) jeweils auf Dextran beobachtet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Während beim DNA-Chip der Unterschied zwischen Perfectmatch und Mismatch nur geringfügig war, wurde bei der PNA-Oberfläche ein deutlicher Unterschied erzielt. Somit lassen sich die PNA-Oberflächen schon

bei Raumtemperatur für die Erkennung von Punktmutationen einsetzen. Zur Bestimmung der Kinetik bei unterschiedlichen Temperaturen in diesem Zusammenhang siehe [Sato_2003],[Jensen_1997].

Schlussfolgerung:

Die PNA konnte auf Sensoroberflächen immobilisiert werden und erreicht auf Dextranoberflächen eine Maximalbeladung von 1.3 nm bei der Hybridisierung mit DNA. Die erreichte Maximalbeladung ist mehr als ausreichend für alle weiteren Vorhaben.

Es treten bei der Hybridisierung von DNA und PNA an die PNA-Oberflächen keine unspezifischen Bindungen auf.

Die PNA-Oberflächen lassen sich optimal mit Harnstoff/Guanidiniumchlorid innerhalb von drei Minuten regenerieren. Die Oberflächen sind für mehr als 300 vollständige Regenerationen stabil.

Die PNA-Oberflächen sind mit einer Stabilität von 16 Wochen bis zu einem halben Jahr im Vergleich zu DNA-Oberflächen mit einer Stabilität von zwei Wochen wesentlich länger verwendbar. Diese Stabilität ist der vorrangige Grund für den Einsatz der PNA statt DNA als Anker-moleküle an Sensoroberflächen.

Die 15 Basen lange PNA erreicht in etwa die gleiche Affinität wie die normalerweise als Anker-molekül eingesetzte 21 Basen lange DNA. Die Affinität der PNA zur DNA ist ausreichend für den weiteren Einsatz der PNA als Anker-molekül.

Es konnte gezeigt werden, dass die PNA-Oberflächen in der SNP-Diagnostik Vorteile aufweisen. Mit der PNA-Oberfläche kann schon bei Raumtemperatur eine Punktmutation detektiert werden. Ein weiterer Vorteil liegt hier ebenfalls in der langen Stabilität der Oberflächen, so dass der Chip mehrfach und über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden kann.

5.2.3 Signalerhöhung und Vergleich mit Ellipsometrie

Zur Charakterisierung von PNA-Oberflächen sollte nicht nur eine DNA-Bindung an die PNA-Oberfläche, sondern auch eine Hybridisierung von PNA an die PNA-Oberfläche beobachtet werden. Erste Untersuchungen wurden in [Jung_2003] beschrieben. Ein Vergleich der Bindung von DNA und PNA an einen PNA Sensor ist in Abb. 28 gezeigt.

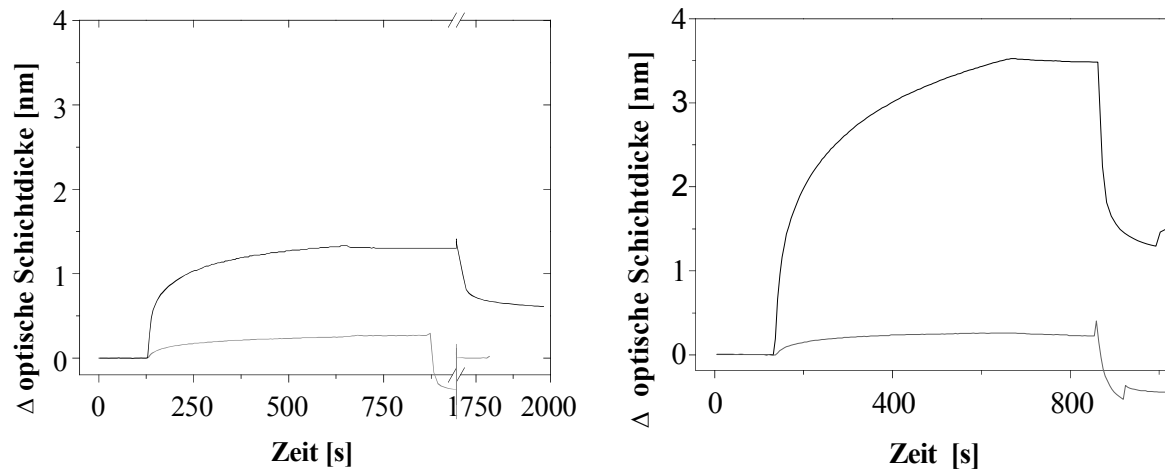


Abbildung 28: Signalerhöhung bei Hybridisierung mit PNA (RIfS-Messungen) links auf PEG-Oberflächen, rechts auf AMD-Oberflächen. Grau: DNA-Hybridisierung, schwarz: PNA-Hybridisierung

Die Abb. 28 zeigt links einen PNA-Sensor mit auf PEG- Schicht immobilisierter PNA. Rechts ist die PEG-Schicht durch die in dieser Arbeit meistens verwendete Aminodextranschicht ersetzt. Die Hybridisierung von PNA im Vergleich zu DNA auf PNA-Oberflächen ergibt eine dreifach höhere Änderung der optischen Schichtdicke bei gleicher Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA bzw. PNA. Auf Dextran-Oberflächen wird eine 10fach höhere Maximalbeladung des Sensors bei der Hybridisierung von PNA anstelle von DNA bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet. Die molare Menge PNA ist im Vergleich zur eingesetzten DNA 1.6fach größer. Dies alleine kann eine so große Signalverstärkung nicht erklären. Die PNA/PNA-Affinität ist um das dreifache höher als die PNA/DNA-Affinität [Jensen_1997]. Dies trägt zur Signalverstärkung bei. Ein entscheidender Grund kann die Abstoßung der negativen DNA-Molekülen von der Dextran bzw. PEG-Oberfläche sein. Die Oberflächen wurden für die Immobilisierung mit PNA mit Glutarsäure umgesetzt und weisen eine negative Ladung auf. Da die PNA ungeladen ist, wird sie im Gegensatz zur DNA nicht von der Oberfläche abgestoßen und so können mehr PNA-Moleküle auf der Oberfläche binden. Um dieses Phänomen mit einer anderen Methode zu verifizieren, wurden Messungen der Hybridisierung von DNA mit spektraler Ellipsometrie vorgenommen.

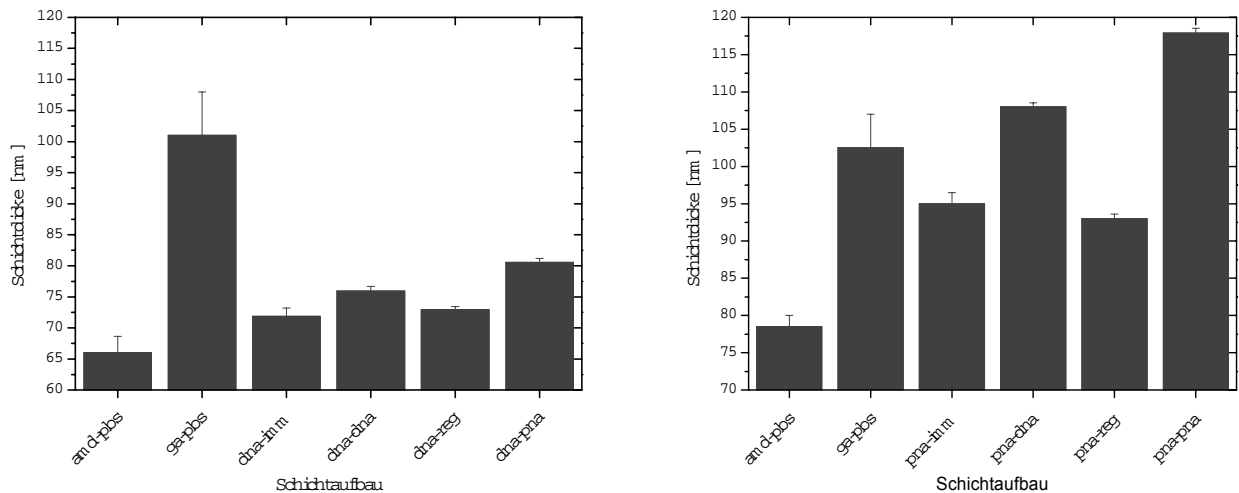


Abbildung 29: Ellipsometermessungen der DNA/DNA, PNA/DNA und PNA/PNA Hybridisierung auf einer AMD-Schicht, links ist DNA immobilisiert, rechts ist PNA immobilisiert. Als flüssige Phase wurde für jede Messung PBS verwendet. Die folgenden Schritte einer RfS-Messung wurden mit dem Ellipsometer nachvollzogen: 1. Aminodextranschicht in PBS (amd-pbs) 2. Umsetzung des Chips mit Ga (ga-pbs) 3. Bestimmung der Schichtdicke nach der Immobilisierung von DNA bzw PNA (dna.imm bzw pna.imm) 4. Hybridisierung von DNA an DNA bzw PNA (dna-dna bzw. pna-DNA) 5. Regenerierung der Oberfläche (dna-reg bzw. pna reg) 6. Hybridisierung der von PNA (dna-pna bzw. pna-pna).

Die Abb. 29 links zeigt Messungen auf einem DNA-Chip, rechts Messungen auf einem PNA-Chip. Die Messungen wurden in einer mit Phosphatpuffer gefüllten Messkammer durchgeführt, so dass der Quellungsstatus der Schichten mit dem bei RfS-Messungen verglichen werden konnte. Normalerweise können bei ellipsometrischen Messungen die absoluten Werte von Brechungsindex n und der physikalischen Schichtdicke d unabhängig voneinander bestimmt werden. Da die hier aufgetragenen Bioschichten jedoch eine geringe physikalische Schichtdicke aufwiesen (<100 nm), konnten n und d nicht getrennt werden, da hier eine sehr starke Korrelation zwischen diesen Parametern vorliegt. Die Korrelationsmatrix erreicht 0.9-1. Üblicherweise hält man in diesem Fall den Brechungsindex in der mathematischen Simulation konstant. Alle Änderungen werden dann über d festgestellt. Im Vergleich zu RfS, mit der die tatsächlichen Werte des Produkts von n und d bestimmt wurden, konnten mit dem Ellipsometer in diesem Fall nur eine qualitative Bestimmung und damit Tendenzen gemessen werden.

Die Dextranoberflächen ergaben je nach Charge Schichtdicken im wässrigen Zustand zwischen 60 und 80 nm. Nach der Umsetzung der Aminogruppen der Dextranschicht mit Glutarsäureanhydrid wurde in allen Fällen ein starker Anstieg der Schichtdicke beobachtet. Auf Grund der Einführung der negativen Carboxygruppen auf der Oberfläche, welche sich voneinander abstießen, konnte eine Quellung der Dextranschicht beobachtet werden. Auf Polyethylenglycolschichten war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, da Polyethylenglycolschichten nur Monolagen ausbilden. Nach der Aktivierung der Schicht mit NHS/DIC und der Anbindung der DNA bzw. PNA sank die Schichtdicke wieder, da viele der Carboxygruppen jetzt mit der DNA bzw. PNA oder nicht umgesetzten NHS/DIC abgesättigt waren. Die Hybridisierung der DNA an die immobilisierten Moleküle konnte mit Ellipsometrie vermessen werden. Die Hybridisierung von DNA auf DNA Oberflächen ergab eine Änderung um 5 nm, während die Hybridisierung von DNA an die PNA-Oberfläche eine Änderung von mehr als 10 nm ergab. Nach der Regenerierung der Schicht wird die Ausgangsschichtdicke wieder erreicht. Bei DNA Oberflächen wird nach der Regenerierung exakt die Ausgangsschichtdicke vor der Hybridisierung erreicht, während bei PNA-Oberflächen eine geringere physikalische Schichtdicke vermessen wird als vor der Hybridisierung. Ein Grund ist die unvollständige Entfernung von nicht kovalent gebundenen PNA-Molekülen von der Oberfläche direkt nach der Immobilisierung. Als letzter Schritt wurde bei beiden Oberflächen die Hybridisierung mit PNA vermessen. Bei DNA Oberflächen ergab dies eine im Vergleich zur DNA/DNA Hybridisierung doppelt so große Schichtdickenänderung, und bei der PNA/PNA Hybridisierung wurde ebenfalls im Vergleich zur PNA/DNA Hybridisierung doppelt so große Schichtdickenänderung verfolgt. Die Erhöhung der Schichtdicke bei Hybridisierung von PNA auf dem DNA Chip entspricht der Hybridisierung von DNA auf PNA Oberflächen und erfolgt, da wie oben gezeigt die Kinetik in etwa identisch ist und eigentlich auf Grund der geringeren Abstoßungskräfte eine kleinere Schichtdicke zu erwarten gewesen wäre auf Grund einer Änderung des Brechungsindex auf der Oberfläche.

5.2.4 PNA-Oberflächen für die Beobachtung der enzymatischen Reaktion der Exonuklease III mit Biosensoren

In Projekt nanoMAP sollte ein Assay zur Expressionsanalyse von DNA basierend auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) in einem heterogenen System aufgebaut werden [Seidel_2003]. Da im FRET die Reaktion des Enzyms nur indirekt beobachtet werden

konnte, sollte die enzymatische Reaktion mit Biosensoren charakterisiert werden. Ziele dieser Untersuchungen waren:

- Schneidet das Enzym spezifisch doppelsträngige DNA? Dies ist von eminenter Bedeutung, da nur dann die Exonuklease III für eine Unterscheidung von Einzelstrang und Doppelstrang und damit für eine Expressionsanalyse in Frage kommt.
- Kann die Exonuklease III auf der Oberfläche die DNA schneiden bzw. kann mit Biosensoren die enzymatische Reaktion beobachtet werden?
- Ist die Exonuklease zur Quantifizierung von DNA Doppelstrang auf Oberflächen geeignet?
- Erfassung der Kinetik der Exonukleasereaktion an Oberflächen

5.2.4.1 Spezifizierung der Reaktion der Exonuklease mit der CGE

Im Exonukleasepuffer mit und ohne Magnesiumionen wurden DNA-Einzelstrang und Doppelstrang nach vorheriger Hybridisierung mit Exonuklease inkubiert. Da Magnesium ein Cofaktor für die enzymatische Reaktion ist, wurde die Reaktion mit EDTA abgestoppt, welches die Magnesiumionen komplexiert. Nach der Dialyse wurde die DNA in der Kapillargelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Längere Oligonukleotidabschnitte wurden zu einem späteren Zeitpunkt eluiert. Die Oligonukleotide wurden durch UV-Absorption detektiert.

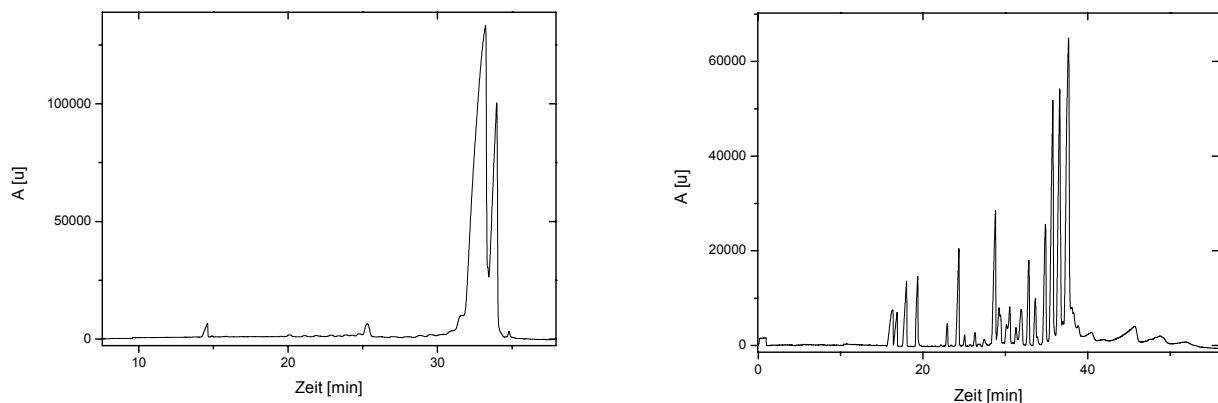


Abbildung 30: CGE-Messungen, Assay mit Magnesiumionen, links Einzelstrang DNA, rechts Doppelstrang DNA

Die Abb. 30 links zeigt den Abbau der einzelsträngigen DNA durch die Exonuklease III. Daraus zu erkennen ist die ursprüngliche Länge der DNA und in etwas größeren Mengen die DNA, welche um eine Base verkürzt ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Exonuklease

nicht aktiv ist für 3'-Überhang von mehr als 4 Basen. Es wird daher angenommen, dass die erste Base von der Exonuklease erkannt wird und geschnitten wird, für den nächsten Schritt aber der Doppelstrang benötigt wird. Der Einzelstrang wird im Puffer mit Magnesiumionen um eine Base verkürzt. Die Abbildung rechts zeigt die Abbauprodukte bei der Reaktion der Exonuklease III mit doppelsträngiger DNA. Die Exonuklease baut beim doppelsträngiger DNA einen DNA-Strang vom 3' Ende angefangen ab. Die Konzentration des Einzelstranges der DNA rechts ist im Vergleich zu der Messung des Einzelstranges links geringer. Dies zeigt, dass bei doppelsträngiger DNA auch der zweite Strang mit abgebaut wird. Die Exonuklease III weist nicht nur eine Exonukleaseaktivität aus, sondern besitzt ebenfalls eine 3' DNA Phosphatase- und apurinische Endonuklease-Aktivität. Okano und Kambara stellten bei der Entwicklung eines quantitativen DNA-Assays beruhend auf fluoreszenzmarkierten Primern und der Exonuklease III fest, dass diese auch Einzelstrang-DNA schneidet, wengleich im geringeren Umfang. Die Fähigkeit zum Abbau von Einzelstrang-DNA nimmt jedoch bei höheren Temperaturen über 40° sehr schnell ab, während die Fähigkeit zum Abbau von doppelsträngiger DNA erhalten bleibt [Okano_1995].

5.2.4.2 Charakterisierung der Exonukleaseaktivität auf Oberflächen

Aus den CGE-Experimenten ist bekannt, dass die Exonuklease beim Schneiden doppelsträngiger DNA auch den zweiten Strang abbaut. Übertragen auf den Biosensor bedeutet dies, dass die Exonuklease III auch den immobilisierten DNA-Strang mit abbaut und folglich der DNA-Chip nur für eine Messung eingesetzt werden kann. Das Ziel ist der direkte Vergleich der RNA-Expressionsmuster aus Zellen oder Gewebe. Dazu muss nach einer RT-PCR erst die eine Probe mit den DNA-array auf der Oberfläche hybridisieren und nach Regeneration die zweite Probe auf der gleichen Oberfläche hybridisieren. Daher sollten die Messungen reproduzierbar und die Oberfläche regenerierbar sein. Im vorherigen Kapitel wurde dazu eine PNA-Oberfläche etabliert. Das nicht natürliche Peptidnukleotid wird nicht von Nukleasen angegriffen und ist damit das ideale Anker-molekül an Sensoroberflächen für den Nukleaseassay. Die Reaktionsschritte werden anhand einer Beispielmessung in Abb. 31 erklärt.

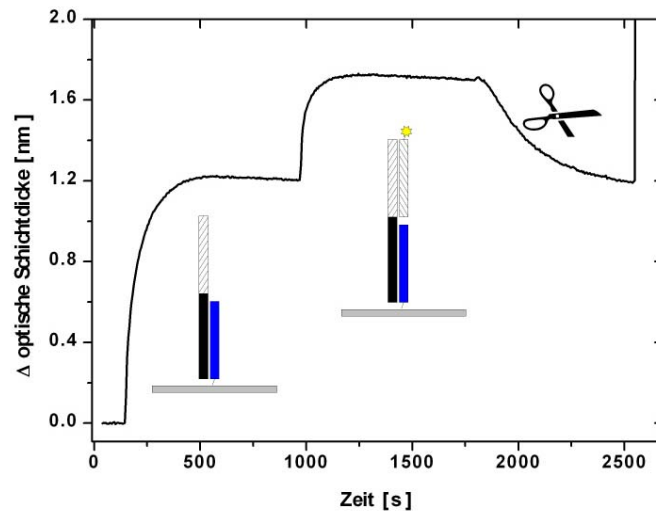


Abbildung 31: Beispielmessung zur Nukleasereaktion auf PNA-Oberflächen:

1. Hybridisierung einer 40mer DNA an die immobilisierte PNA.
2. Hybridisierung einer markierten 21mer DNA an die 40mer DNA.
3. Schneiden der DNA durch Zugabe der Nuklease (symbolisiert durch die Schere).
4. Regenerierung.

Immobilisiert ist die 15mer PNA, an die im ersten Schritt eine 40mer DNA hybridisiert. An das überstehende Ende der DNA hybridisiert eine zweite 21mer DNA. Danach wird die Exonuklease zugegeben und der Abbau der DNA mit RIfS verfolgt.

Diese Experimente wurden zunächst auf einer PNA-Oberfläche mit einer Kopplung von RIfS und TIRF beobachtet. Für die Messung mit TIRF muss markierte DNA eingesetzt werden. Mit TIRF wurde nur die markierte DNA erfasst, während mit RIfS alle Schritte verfolgt werden konnten. Für die Kopplung wurde ein RIfS-Transducer auf die TIRF-Flusszelle zugeschnitten und am Ende zwecks Lasereinkopplung angeschrägt. Die Detektion von TIRF erfolgte an Spot 1, die von RIfS an Spot 2 [Reder_2003]. Mit der Fluidik des RIANA Aufbaus wurde die Probe über beide Spots gleichzeitig geleitet.

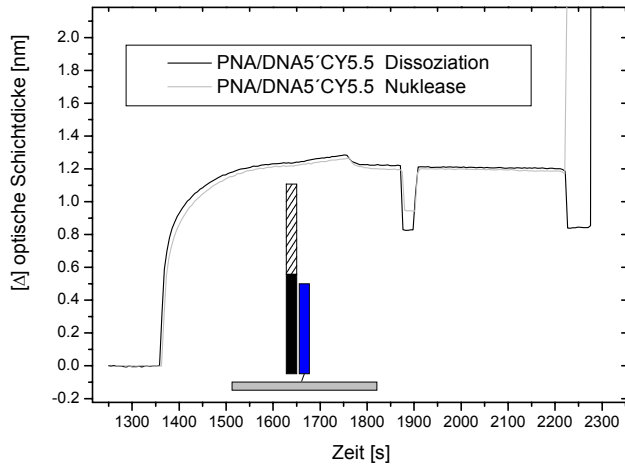


Abbildung 32: Referenzmessung in der TIRF-RfS-Kopplung

In Abb. 32 wurde zunächst nur der erste DNA-Strang an die Oberfläche gebunden und anschließend Puffer (Beobachtung der Dissoziation) oder Exonuklease (Beobachtung der Nukleasereaktion) zugegeben. Der Einschnitt vor der Injektion von Puffer bzw. Exonuklease entsteht durch das Anschalten des Lasers des RIANA-Aufbaus. Die Messkurven insbesondere waren nahezu identisch. Daraus folgt, dass mit der PNA-Oberfläche bei gleich bleibender DNA-Konzentration immer das gleiche Signal und damit ein Schritt in Richtung reproduzierbarer Messungen erreicht wurde. Zudem war kein Abbau der DNA bei Zugabe der Exonuklease zu erkennen. Damit wurde sowohl die PNA als auch der hybridisierte Einzelstrang nicht von der Exonuklease abgebaut.

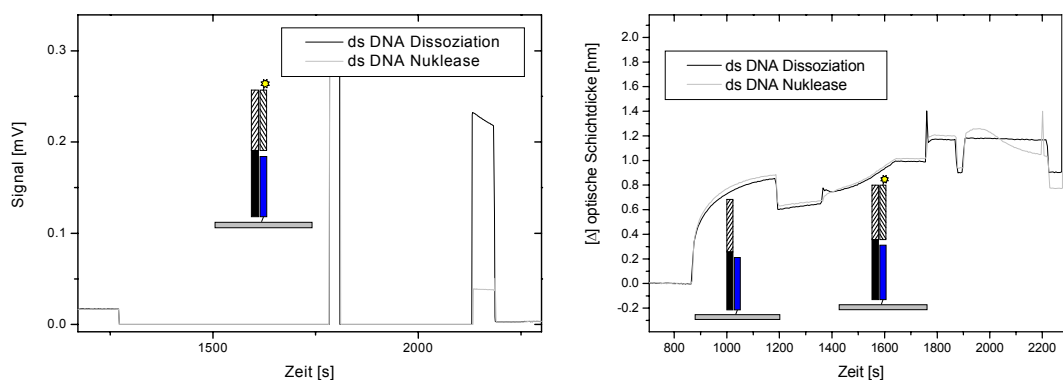


Abbildung 33: Nukleaseaktivität gemessen mit TIRF-RfS-Kopplung: rechts RfS-Detektion, links TIRF-Detektion.

In Abb. 33 sind die Experimente der TIRF-RfS-Kopplung gegenübergestellt. Im TIRF System wurde während der ersten Schritte und vor allem während der Hybridisierung des zweiten DNA-Stranges, welcher Cy5.5 markiert war, der Laser ausgestellt, um das

Photobleaching zu verhindern. Nach der Hybridisierung wurde erstmals der Laser angestellt und der Ausgangswert vor dem Abbau der Nuklease aufgenommen. Ein zweites Mal wurde der Laser nach der Exonukleasereaktion bzw. nach der Messung mit Puffer angestellt und das Endwert aufgenommen. Die Messung nur mit Puffer diente als Referenz. Rechts zeigt sich keine Signalabnahme, die zum Beispiel durch Dissoziation des zweiten DNA-Stranges entstehen kann. Links sieht man jedoch eine Abnahme des Signals, wenn nur Puffer nach der Hybridisierung der beiden DNA Stränge injiziert wurde. Dies wurde auf die höhere Sensitivität des TIRF-Systems zurückgeführt. Die Hybridisierung des zweiten Stranges erfolgte bei RIFs in einem annähernd linearen Verlauf, da die Fluidik des RIANA-Gerätes kein optimales Flussprofil hat. Bei Zugabe der Exonuklease III (grau) wurde bei beiden Systemen eine deutliche Abnahme des Signals im Vergleich zum Puffer beobachtet.

Mit der Messung im TIRF-System wurde bewiesen, dass die DNA auf der Oberfläche von der Exonuklease III abgebaut wurde, da nur diese markiert war. Da die DNA am 5' Ende markiert war, wurde bei nahezu allen DNA-Molekülen wenigstens die erste Base mit dem an dieses Nukleotid gebundenen Farbstoffmolekülen abgebaut. Der Farbstoff selber schien zwar, wie es im RIFs-Experiment zu sehen ist, im Vergleich zum ersten RIFs-Experiment ohne Markierung (Abb. 35) den Reaktionsschritt der Exonuklease zu verlangsamen, wodurch mit RIFs die Anlagerung der Exonuklease III an die DNA beobachtet werden konnte, da die Schneidereaktion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt geworden war. Wenn die hydrolytische Reaktion der Exonuklease schneller war, konnte keine Anlagerung der Exonuklease beobachtet werden. Wenn keine Magnesiumionen vorhanden sind, wurde ebenfalls eine Anlagerung der Exonuklease III an die DNA mit RIFs beobachtet.

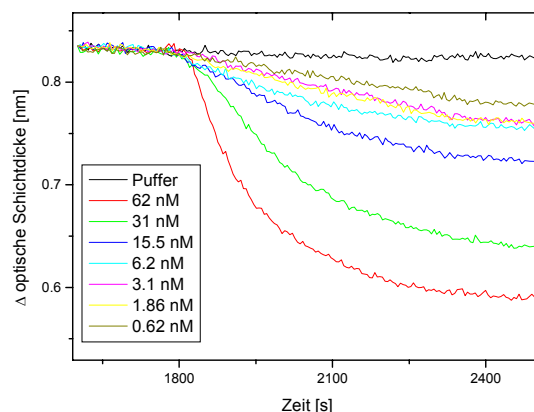


Abbildung 34: Variation der Exonukleasekonzentration

Um mit Hilfe der Exonuklease quantifizierbare Aussagen über die Menge der hybridisierten DNA und damit über das Expressionsprofil machen zu können, müssen sowohl die

Abhängigkeit der gemessenen Bindungskurve von der Konzentration der eingesetzten Exonuklease (Abb 34) als auch die Abhängigkeit von der DNA-Belegung untersucht werden (Abb. 35). In Abb. 34 ist der Ausschnitt der Reaktion der Exonuklease aus der gesamten Bindungskurve gezeigt. Durch eine schnelle Fluidik wurde Massentransportlimitierung ausgeschlossen, so dass das Schneiden der DNA geschwindigkeitsbestimmend war.

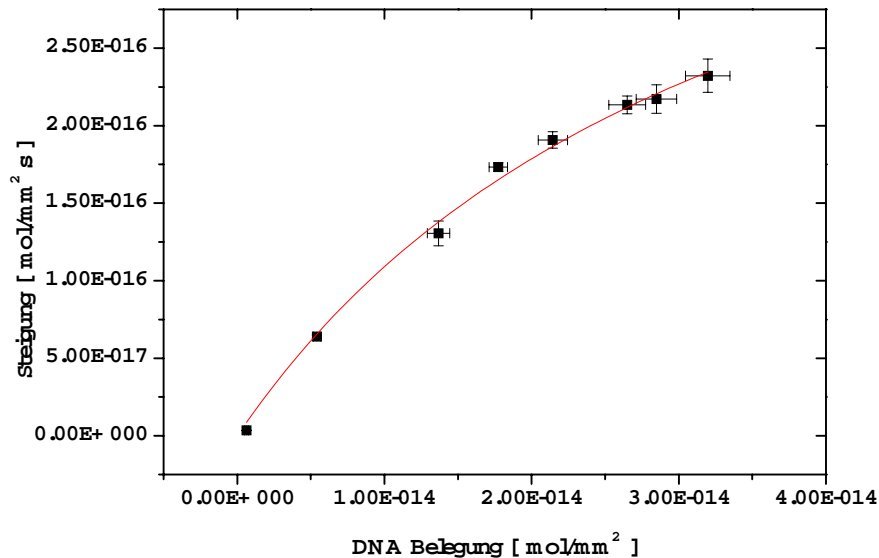


Abbildung 35: Variation der DNA-Belegung: Aufgetragen ist die Anfangssteigung der RfS-Messung bei Nukleasereaktion gegen die ebenfalls mit RfS gemessene Änderung der optischen Schichtdicke bei DNA Belegung (zweite Bindung Abb. 31).

Abb. 35 zeigt ein nicht lineares Verhalten der Abhängigkeit der Exonukleasereaktion von der DNA-Belegung bei für alle Messungen gleicher Enzymkonzentration. Aus der Sättigungskurve wurde eine Konstante von $2.8 \cdot 10^{13}$ mol/mm² für die Enzymumsetzung bestimmt. Hier wurden nicht nur die Standardabweichungen für die y-Werte angegeben, sondern, da hier die DNA-Belegung mit doppelsträngiger DNA aufgetragen wurde, auch Standardabweichungen der x-Werte angegeben, da sich immer kleine Abweichungen von bis zu 10 pm Unterschied bei gleicher eingesetzter DNA-Konzentration ergaben.

Schlussfolgerung:

Die Exonuklease schneidet selektiv nur doppelsträngige DNA, wobei sie bei in Lösung vorliegendem Einzelstrang die erste Base auch hier hydrolytisch abspaltet. Die Exonuklease ist demnach geeignet für den Einsatz in der Expressionsanalyse. Bei Übertragung der Expressionsanalyse auf markierte Systeme sollte der Farbstoff nicht endständig, sondern

mittig mindestens 4 Basen vom Ende der DNA entfernt an die Template-DNA gebunden werden.

Die etablierte PNA-Oberfläche ermöglicht eine wieder verwendbare Oberfläche für die Detektion von enzymatischen Reaktionen an DNA. Die PNA und auch der an sie hybridisierte DNA-Strang wird nicht von der Exonuklease angegriffen. Es wird vermutet, dass auf Grund der 3'-Phosphatase-Aktivität der Abbau einer Base zustande kommt. Auf der PNA-Oberfläche ist aber gerade das 3' Ende des ersten DNA-Stranges sehr nahe an der Oberfläche und ist für die Exonuklease nicht zugänglich. Somit konnten keine Umsetzungen von DNA-Einzelstrang mit RfS beobachtet werden.

Die Reaktion der Exonuklease ist auf PNA-Oberflächen wiederholbar und quantifizierbar. Um eine lineare Abhängigkeit der Steigung der Abbaureaktion von der DNA-Belegung zu erhalten, sollte das Verhältnis von Exonukleasekonzentration/DNA Belegung groß gewählt werden, da so eine bessere Quantifizierung bei kleinen DNA-Belegungen erzielt wird. Zur Assayetablierung auf Oberflächen muss für jedes System ein optimal geeignetes Verhältnis von Oberflächenbelegung zu Exonukleasekonzentration gefunden werden.

5.3 PNA-Oberflächen für die flexible Immobilisierung von Analytderivaten in der Umweltanalytik

Die Vorteile der Biosensoren, schnelle Analyse und einfache Technik, kommen besonders in der Umweltanalytik zum Tragen. Hier sind inzwischen portable Geräte für Feldversuche entwickelt worden. Mit diesen Biosensoren sollen möglichst schnell möglichst viele Parameter in einem kleinen Gerät erfasst werden, wobei die Geräte auch für nicht geschultes Personal einfach zu bedienen sein sollten. Diese Bedingungen erfüllt das RIANA-Gerät basierend auf TIRF. Hier können sechs verschiedene Parameter durch das 6-Spot-System gleichzeitig im Feldversuch erfasst werden. Für die Erfassung von mehr als sechs Analyten muss jedoch der Chip aus dem System ausgebaut und ein neuer Chip von einer geschulten Person eingebaut und justiert werden. Das System der flexiblen Immobilisierung bietet eine Alternative durch das Austauschen der Analytderivate auf der Oberfläche. Unterschiedliche Analytderivate sind kovalent an DNA gebunden. Durch die Hybridisierung dieses DNA-Konjugates an die Oberfläche können viele unterschiedliche Parameter erfasst werden, ohne dass der Chip aus dem System ausgebaut werden muss. Ziel ist die Kombination des Multispot RIANA-Wasseranalysatorsystems mit einer flexiblen universellen und stabilen Biosensoroberfläche.

Als Ankermolekül wird die in den vorherigen Abschnitten verwendete PNA-Oberfläche verwendet. DNA-Oberflächen erreichen nur eine geringe Stabilität von wenigen Tagen, die für Feldversuche nicht ausreichen.

5.3.1 Charakterisierung mit RfS

Das System der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen wird zunächst mit RfS charakterisiert, da RfS eine kontinuierliche Beobachtung der Vorgänge an der Oberfläche ermöglicht.

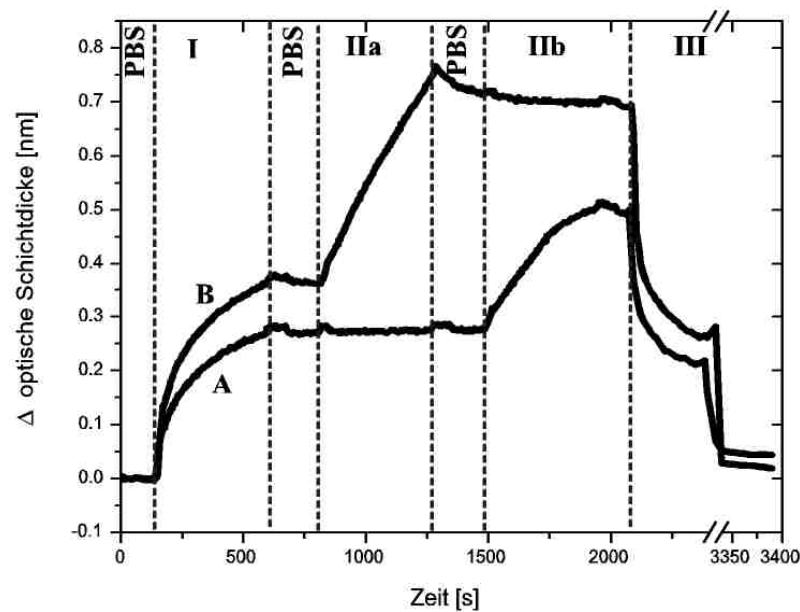


Abbildung 36: Exemplarische RfS-Messung zur flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen:

I A: 2,4 D-Derivat DNA-Konjugat

I B: ACA DNA-Konjugat

IIa: α Atrazin Ak

IIb: α 2,4 D Ak

III: Regenerierung

Das zwei Messungen wurde nacheinander entsprechend Abschnitt 4.2.6 ausgeführt.

Erst wurde Ovalbumin (nicht gezeigt), danach das Konjugat injiziert (I), wobei in Messung A ein 2,4-D-Derivat DNA-Konjugat (4 $\mu\text{g/ml}$) und in Messung B ein ACA DNA-Konjugat (5 $\mu\text{g/ml}$) verwendet wurde. In beiden Messungen wurden sukzessive zunächst der α Atrazin Ak (IIa) und dann der α 2,4 D Ak (IIb) injiziert. Zum Schluss wurde die Oberfläche mit Pepsin und Harnstoff/Guanidiniumchlorid regeneriert (III).

In der ersten Messung (A) mit 2,4 D-Derivat DNA-Konjugat funktionalisierter Oberfläche wurde nur eine Bindung des α 2,4 D Aks an die Oberfläche beobachtet. In der zweiten Messung wurde ausschließlich die Bindung des α Atrazin-Aks an die Oberfläche verfolgt.

Mit der gleichen PNA-Oberfläche konnten zwei unterschiedliche Antikörper mit Hilfe der flexiblen Immobilisierung detektiert werden. Die Messung zeigt keine unspezifische Bindung der Antikörper an die PNA-Oberfläche.

Weitere Untersuchungen der unspezifischen Bindung zeigten jedoch, dass Antikörper an freien PNA-Oberflächen, an die keine DNA gebunden war, eine unspezifische Bindung von bis zu 500 pm bei Ak Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ erreichten. Da an eine reine Dextranoberfläche Ak nicht unspezifisch binden, binden die Ak unspezifisch an die PNA. Blockierung der Oberfläche mit Schaf IgG, BSA oder FCS brachten keine Verringerung der unspezifischen Bindung. Nur die direkte Bindung der DNA an die PNA minimiert die unspezifische Bindung. Bei Hybridisierung von mehr als 4 $\mu\text{g/ml}$ bzw. bei größeren Spots (TIRF-System) von 5 $\mu\text{g/ml}$ DNA, ist keine unspezifische Bindung der Ak zu erkennen.

In Abbildung 40 wird einer der Vorteile des Einsatzes von PNA als Anker-molekül deutlich. Die Dissoziation des Konjugates von der Oberfläche vor der Antikörperinjektion ist sehr klein. Es tritt kein Verlust der Konjugate während der Messung auf. Deshalb ist die Zeit zwischen Konjugatbindung und Antikörperinjektion nicht relevant. Dies erhöht die Reproduzierbarkeit von Messungen. Die geringe Dissoziation des Konjugates kann durch die hohe Affinität der PNA/DNA und durch die Verwendung von Dextranoberflächen mit höherer Bindungskapazität und damit hohen Rückbindungseigenschaften erklärt werden.

Zum Testen der Reproduzierbarkeit der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen wurden zunächst mit RfS Bindungshemmtests für verschiedene Analytderivate durchgeführt. Es musste erst mit Pepsin pH 2.0 und dann mit Harnstoff/Guanidiniumchlorid regeneriert werden. Mit Pepsin musste zunächst der Antikörper gespalten werden, bevor die Nukleotidstränge voneinander getrennt werden konnten. Die Behandlung mit Pepsin zeigte keinerlei Einfluss auf die Stabilität der Oberflächen.

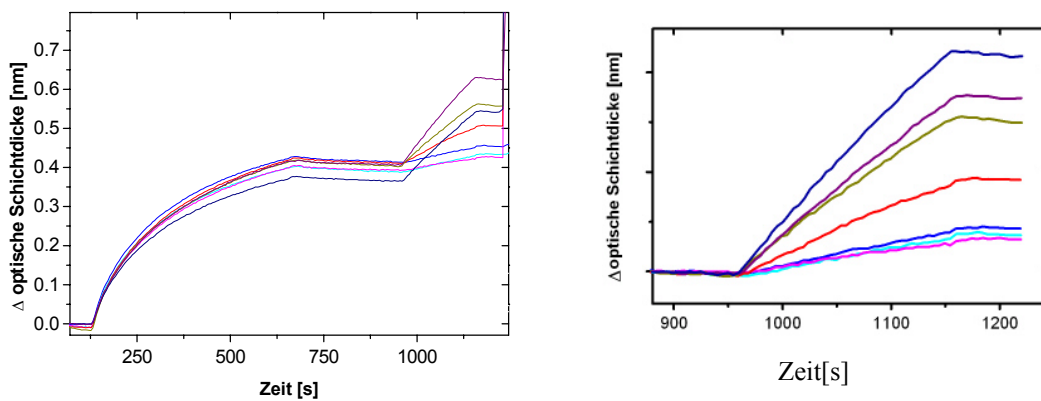


Abbildung 37: Beispiel der Originalmessungen eines Bindungshemmtestes mit PNA Oberflächen. Rechts Ausschnitt aus der links gezeigten Messung (normiert)

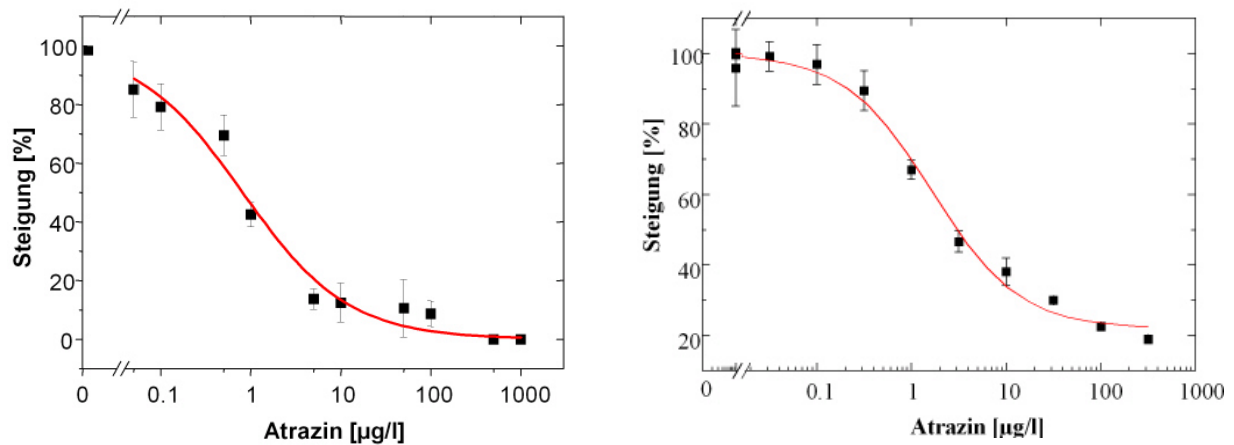


Abbildung 38: Vergleich der Titration von Atrazin auf einem Chip mit klassischer kovalenter Immobilisierung und flexibler Immobilisierung bei einer Antikörperkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$

Mit dem Modellsystem Atrazin/ACA/ACA-IgG wurde das hier entwickelte System der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen mit der herkömmlichen Immobilisierung des Analytderivats direkt auf der Oberfläche verglichen. Mit der herkömmlichen Immobilisierung ergibt sich ein Testmittelpunkt von 1,6 $\mu\text{g/l}$, während bei der flexiblen Immobilisierung ein Testmittelpunkt von 0,8 $\mu\text{g/l}$ erreicht wird.

Im Projekt PIWAS sollte die flexible Immobilisierung vor allem für die Detektion von Estrogenen und endokrinen Disruptoren eingesetzt werden, da hier im Gegensatz zu Pestiziden noch keine umfangreichen Analysensysteme vorhanden sind. Deswegen wurden die Messungen zunächst mit RfS auf die Analyte Estron und Bisphenol A ausgeweitet.

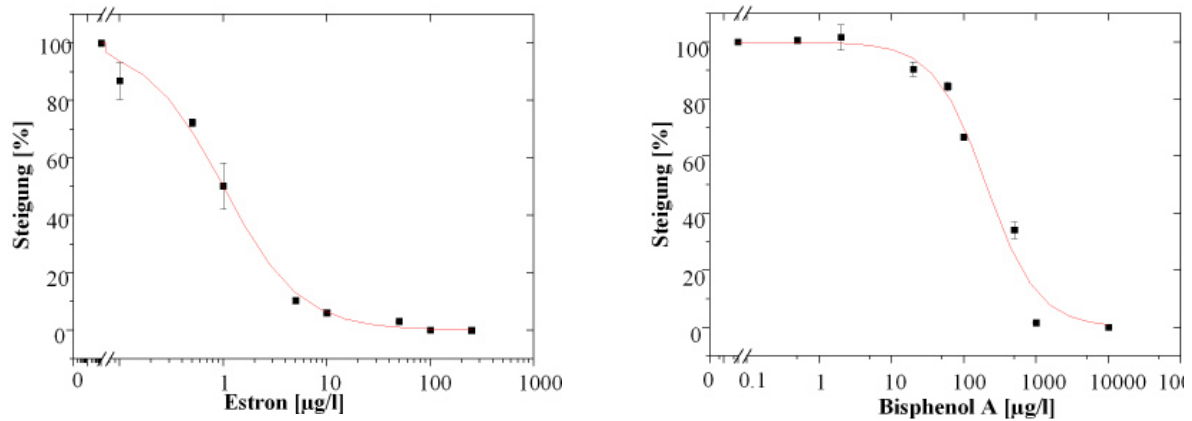


Abbildung 39: Bindungshemmtest von estrogenen Substanzen mit RIfS nach dem Prinzip der flexiblen Immobilisierung

Mit einer Estronantikörperkonzentration von 500 ng/ml wurde ein Testmittelpunkt von 1 $\mu\text{g/l}$ mit einer Nachweisgrenze von 0,08 $\mu\text{g/l}$ ermittelt. Mit Bisphenol A wurde mit einer Antikörperkonzentration von 500 ng/ml ein Testmittelpunkt von 203 $\mu\text{g/l}$ und eine Nachweisgrenze von 8 $\mu\text{g/l}$ erreicht. Somit wurde das Assaysystem der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen mit RIfS charakterisiert und erfolgreich auf verschiedene auch estrogenen Analyte angewendet.

5.3.2 Implementierung der flexiblen Immobilisierung auf dem TIRF-Detektor

Nach der Charakterisierung des Systems mit RIfS erfolgt die Übertragung auf das portable Wasseranalytatorsystem.

Da die Oberfläche und auch die Fluidik des TIRF-Sensors sich vom RIfS-System unterscheidet, musste vor allem sichergestellt werden, dass auch hier eine vollständige Regenerierung der Oberfläche stattfindet, ohne die keine reproduzierbaren Messungen möglich sind.

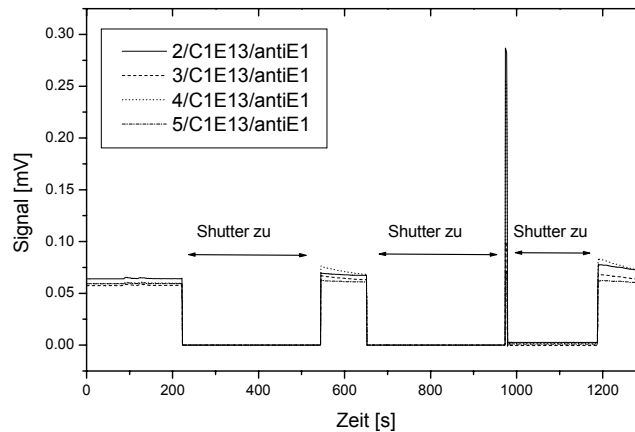


Abbildung 40: Testen der Regenerierung auf dem TIRF-Sensor

Abb. 40 zeigt die Messung im TIRF-System an allen vier Spots, wobei hier jeweils das gleiche Konjugat benutzt wurde. Im TIRF-System wird im Gegensatz zu RfS nur der mit Cy5.5 markierte Antikörper erfasst. Um eventuelles Photobleaching zu verhindern und auch die Oberfläche vor der Einstrahlung durch den Laser zu schützen, wurde der Shutter während der Injektion von DNA-Konjugat und Antikörper geschlossen. Nach der Injektion des Antikörpers und einem Spülschritt wurde dann der Laser wieder angestellt und die Fluoreszenzmenge des an die Oberfläche gebundenen Antikörpers erfasst. In Abb. 46 wurde anschließend der Shutter wieder geschlossen, um einen Signalabfall allein durch Photobleaching zu verhindern. So konnte nachgewiesen werden, dass am Ende der Regeneration bei 1200 s nach dem Anstellen des Lasers wieder die Ausgangssignalhöhe erreicht wurde und damit die Regenerierung vollständig war.

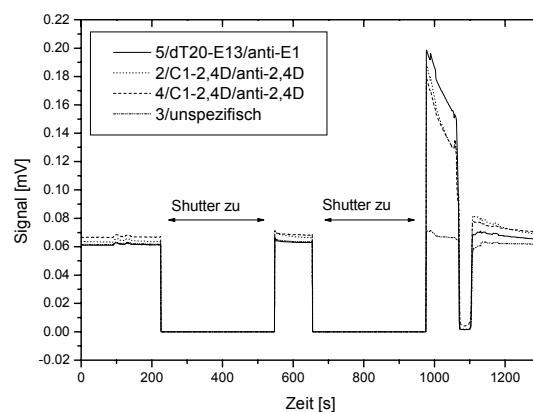


Abbildung 41: Multispotmessung

In Abb. 41 ist eine Beispielmessung gezeigt, in der an unterschiedlichen Spots unterschiedliche Derivate hybridisiert wurden. An Spot 3 wurde eine DNA hybridisiert, die

kein Derivat trägt. Damit konnte auch im TIRF-System gezeigt werden, dass keine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Oberfläche erfolgt. Bei TIRF-Experimenten wurde eine Konjugatkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Diese gewährleisten die für den Bindungshemmtest notwendige hohe Bindungskapazität der sensitiven Schicht und die minimale unspezifische Bindung.

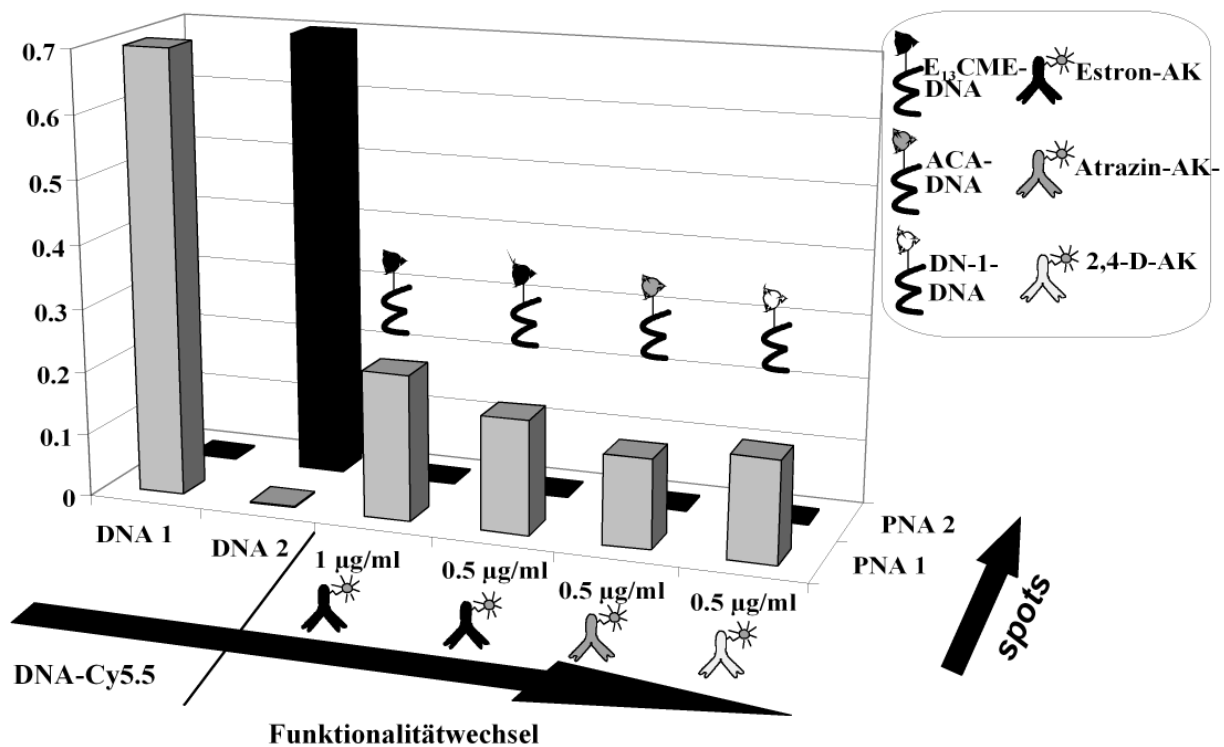


Abbildung 42: Experiment auf einem einzelnen TIRF-Transducer. Der erste Abschnitt zeigt die Messung fluoreszenzmarkierter DNA, der zweite Abschnitt den Funktionalitätswchsel am selben Spot durch die Verwendung verschiedener DNA-Konjugate.

Die Abb. 42 zeigt eine Zusammenfassung der ersten Messungen zur Implementierung auf dem TIRF-Sensor. Alle Messungen wurden mit derselben PNA-Oberfläche ausgeführt. Spot 1 enthält PNA I, Spot 2 PNA II.

Markierte DNA

Im ersten Teil des Experimentes wurde nur die Hybridisierung von fluoreszenzmarkierter DNA detektiert. Die Spezifität des Sensors für DNA wurde durch die Messung von unterschiedlicher DNA aufgezeigt. Die injizierte DNA bindet ausschließlich an Spots mit der entsprechend komplementären PNA, DNA I zu PNA I und DNA II zu PNA II. Mit diesen

Ergebnissen konnte auch die hohe Belegungskapazität durch DNA aufgezeigt werden, da die Signalhöhe am Anschlag war.

Funktionalitätswechsel an einem Spot

Im zweiten Teil des Experimentes wurde die flexible Immobilisierung auf TIRF gezeigt. Erst wurde ein DNA-1-Estrogen Derivat und dann der α Estrogen Ak (1 $\mu\text{g/ml}$) injiziert. Eine mögliche Quantifizierung wurde dann mit einer Wiederholung der Messung mit einer Antikörperkonzentration von 0.5 $\mu\text{g/ml}$ demonstriert. Durch den Wechsel der Konjugate zu DNAI Atrazin Derivat und DNAI 2,4 D Derivat konnten die anderen Ak am selben Spot nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Signale bei gleich großer Antikörperkonzentration unterschiedlicher Antikörper kommen durch die unterschiedlichen Markierungsgrade der Antikörper und durch unterschiedliche Affinitäten zustande. Bei allen Messungen sind die unspezifischen Bindungen nach blocken mit DNA zu vernachlässigen, wie an Spot II gezeigt.

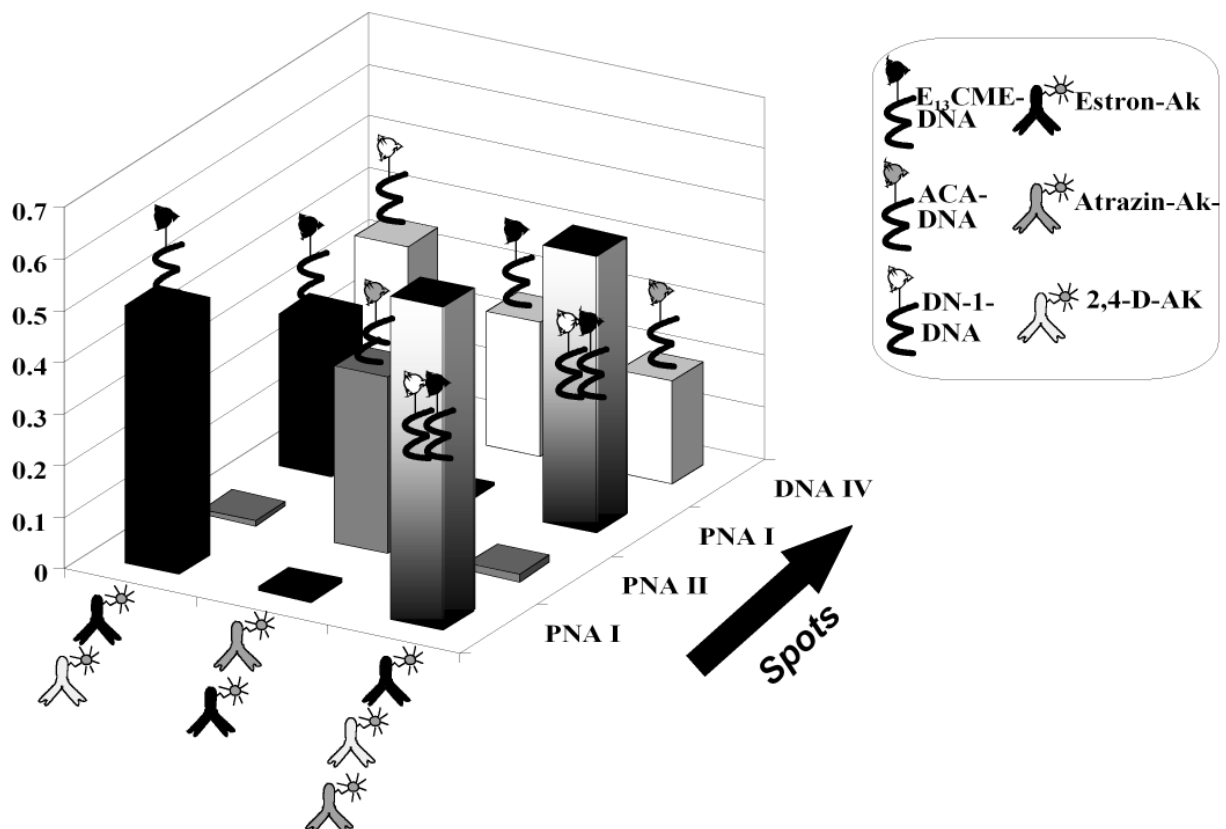


Abbildung 43: Multianalytmessung: Achsenbeschriftung zeigt in der z-Richtung die Spots, welche immobilisiert wurden mit PNA I, II und DNA IV und in der x-Richtung die in der gemessenen Mischung vorhandenen verschiedenen Antikörper.

Multianalytassay

In der Abb. 43 wird die Anwendung der flexiblen Immobilisierung auf das Multi-Spot-Detektionssystem des RIANA-Aufbaus gezeigt. Spot I und III wurden mit PNA I modifiziert, an Spot II wurde PNA II, und an Spot IV wurde DNA IV immobilisiert. Mit dieser Art von Transducer konnten zwei unterschiedliche Analyte auf PNA gleichzeitig detektiert werden. Für den Nachweis im Multispotsystem dürfen die nachzuweisenden Ak keine Kreuzreaktivität zu anderen verwendeten Derivaten aufweisen. Diese Bedingung wurde erfüllt [Reder_2003]. Zunächst wurden die Antikörper gegen Estron und gegen 2,4 D an unterschiedlichen Spots gleichzeitig detektiert. Als zweites wurden an Spot II Ak gegen Atrazin und an Spot IV Ak gegen Estron detektiert. Zum Schluss wurden alle drei Ak gleichzeitig vermessen. An Spot I wurde sowohl das Konjugat für 2,4 D als auch für Estron hybridisiert. Die Konzentration des Atrazin Aks konnte bestimmt werden. Die beiden anderen Ak ergaben an Spot I ein Summensignal, welches in etwa doppelt so hoch war wie das erwartete Signal für die einzelnen Ak. Eine Bestimmung der einzelnen Konzentration ist jedoch nicht möglich.

Einzelanalytkalibrierung

In den letzten Experimenten wurden nur Antikörperkonzentrationen bestimmt. Um jedoch eine Aussage über Analytkonzentrationen zu erhalten, sind Kalibrierkurven erforderlich. Dafür wurden Bindungshemmtests durchgeführt.

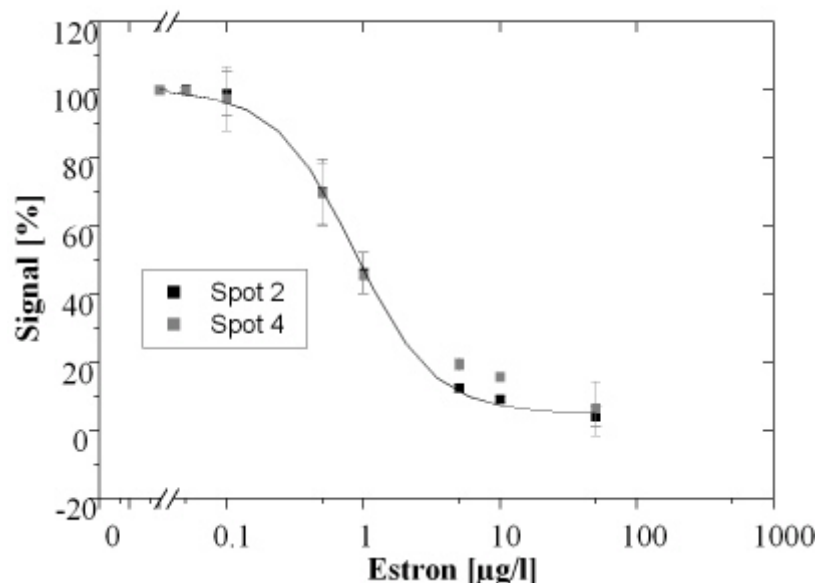


Abbildung 44: *Estrogentitration mit 500 ng/ml Ak an unterschiedlichen Spots auf dem selben Transducer*

Abb. 44 zeigt einen Titrationsassay gegen Estron. Es wurde dieselbe Oberfläche wie in Abb. 42 und Abb. 43 verwendet. Hier wurden die Messungen an den Spots I und III

miteinander verglichen, an denen die gleiche PNA-Sequenz immobilisiert wurde. Es wird an beiden Spots die gleiche Titrationskurve gemessen. Bei der Immobilisierung identischer Analytderivate an unterschiedlichen Spots werden nicht immer die gleichen Bindungskapazitäten erreicht. Zudem sind Unterschiede in der Empfindlichkeit der einzelnen Spots durch unterschiedlich gute Justierung des Lasers auf die Spots gegeben. Auf Grund der hohen Bindungskapazität der Oberfläche ist die Kalibrierkurve bei Antikörperkonzentrationen von 500 ng/ml jedoch unabhängig von diesen Schwankungen.

Multi-Spot-Kalibrierung

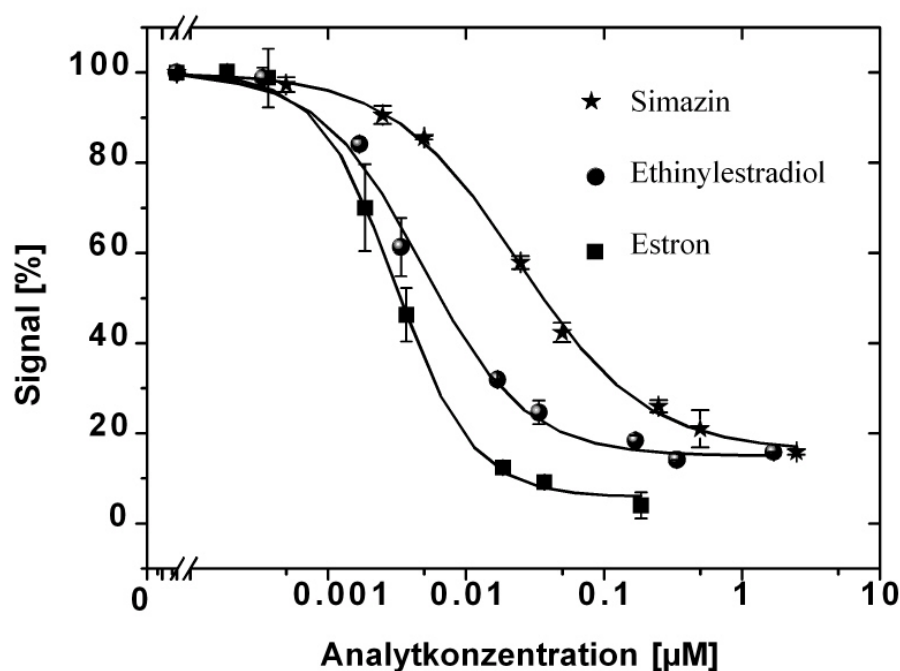


Abbildung 45: Bindungshemmtest verschiedener endokriner Substanzen

Die Abb. 45 beschreibt drei Kalibrierkurven für endokrine Disruptoren. Die Antikörperkonzentrationen von 3.3 nM (500 ng/ml) für Estron-Antikörper, 6.6 nM (1 µg/ml) für Simazin und Ethinylestradiol wurden verwendet. Die Kalibrierkurven zeigen, dass eine genaue Quantifizierung der Analyte mit Hilfe der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen möglich ist. Bei diesen Kalibrierkurven waren die Nachweisgrenzen für Simazin bei $2 \cdot 10^{-3}$ µM, für Estron bei $2 \cdot 10^{-3}$ µM und für Ethinylestradiol bei $0.5 \cdot 10^{-3}$ µM. Für Simazin ist ein Grenzwert von 0.1 ppb (entspricht $0.5 \cdot 10^{-3}$ µM) angegeben (98/83EC). Für die Kalibrierkurven auf PNA-Oberflächen mit Simazin wurden zunächst hohe Antikörperkonzentrationen eingesetzt, um die Machbarkeit zu zeigen. Die Nachweisgrenze lässt sich für Simazin aber beim Einsatz von kleineren Antikörperkonzentrationen durchaus

unter den gesetzlichen Grenzwert senken. Für endokrine Disruptoren existieren bis jetzt noch keine Grenzwerte, die Diskussion in der Europäischen Kommission sind noch nicht abgeschlossen.

Da PNA-Oberflächen ein halbes Jahr stabil bleiben (Abb. 27) sollte gezeigt werden, dass die Aufnahme einer Kalibrierkurve mit einer PNA-Oberfläche möglich ist, welche bei 4°C ein halbes Jahr gelagert wurde. Die in Abb. 45 gezeigte Kalibrierkurve von Ethinylestradiol ist mit derselben PNA-Oberfläche aufgenommen worden, mit der vor einem halben Jahr die Estron-Kalibrierkurve vermessen wurde. Dies zeigt, dass die PNA-Oberflächen auch nach der Messung von über 150 Proben und Lagerung über ein halbes Jahr noch reproduzierbar für mindestens 150 weitere Proben verwendet werden können [Kröger_2002]. Jedoch muss auf Grund der sich ändernden Bedingungen im System und bei Unwägbarkeiten der Lagerung und kleineren Änderungen der Oberflächenbelegung vor der Messung von Analytkonzentrationen erneut eine Kalibrierung vorgenommen werden.

Schlussfolgerungen:

Mit der flexiblen Immobilisierung können verschiedene Analyte ohne Transducerwechsel und damit an derselben PNA-Oberfläche bestimmt werden.

Mit der Implementierung dieses Assaysystems auf den RIANA-Aufbau, gezeigt durch den Funktionalitätswechsel auf dem selben Spot und der Aufnahme von Kalibrierkurven, steht jetzt ein System zur Verfügung, mit dem sechs Parameter gleichzeitig erfasst werden können. Durch den Wechsel von nur einem Probenvorrat zum anderen können durch Umschalten eines Ventils sechs neue Parameter bestimmt werden.

5.4 Entwicklung eines diagnostischen Assays zum Nachweis von Zöliakie auf der Basis einer Peptidoberfläche

5.4.1 Peptidimmobilisierung

In diesem Abschnitt sollten die Peptidoberflächen, die die Grundlage für den diagnostischen Assay zum Nachweis von Zöliakie bilden, entwickelt werden. Dazu werden Peptidoberflächen mit hoher Peptiddichte der Oberfläche, geringer unspezifischer Bindung, kompletter Reversibilität und hoher Stabilität benötigt. Dafür sollten die Peptide gerichtet immobilisiert werden. Prinzipiell waren zwei Wege möglich. Die erste Möglichkeit war die Immobilisierung über die endständige Aminogruppe des Peptides mit Hilfe der Aktivierung der Oberfläche mit NHS/DCC, wie es z.B. in dieser Arbeit mit PNA etabliert wurde. Für eine gerichtete Immobilisierung war es aber notwendig, die funktionellen Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren mit Schutzgruppen zu schützen und während der Immobilisierung auch geschützt zu lassen. Nach der Immobilisierung wurden die vollgeschützten Peptide auf der Oberfläche entschützt. Zur Entschützung von Peptiden wurde TFA verwendet. Nach einer TFA-Exposition der Oberflächen konnte jedoch keine spezifische Bindung mehr detektiert werden. Untersuchungen mittels Massenspektrometrie ergaben einen Abbau des Dextranpolymers bei der Behandlung mit TFA noch bei der kleinst möglichen Konzentration, die zur Entschützung benötigt wird. In [Haake_2000] wurden Polyethylenglycolschichten zur Peptidsynthese auf Oberflächen eingesetzt. Hier konnte mit TFA auf der Oberfläche entschützt werden. Die Polyethylenglycol-basierten Oberflächen ergeben jedoch eine geringere Belegungsichte von Biomolekülen auf der Oberfläche im Vergleich zum Hydrogel des Aminodextrans.

Die zweite Möglichkeit einer Immobilisierung von Peptiden ist diejenige über den Bernsteinsäure-Aktivester der 3-N-Maleimido-Caprinsäure. Da die immobilisierte Peptidsequenz kein Cystein enthält, konnte ein terminales Cystein eingeführt werden. Über dessen Thiolgruppe konnte nach der Aktivierung der Oberfläche mit 3-N-Maleimido-Caprinsäure über eine Michael-Addition der Thiolgruppe des Cysteins das Peptid gerichtet auf der Dextranoberfläche immobilisiert werden. Der Vorteil der Benutzung der Dextranoberfläche liegt in der hohen Belegungsichte. Da die Untersuchungen des Epitopmappings Voruntersuchungen zur Entwicklung eines diagnostischen Assays sind, sollte eine möglichst hohe Oberflächenbeladung gewählt werden, um eine möglichst hohe Sensitivität des diagnostischen Assays zu erzielen.

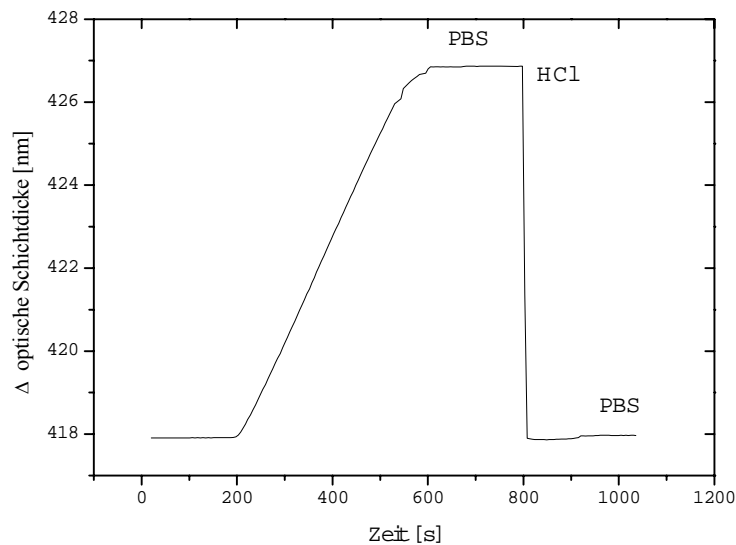


Abbildung 46: Hybridisierungskapazität eines Peptid-Transducers, Peptid Nr.5 immobilisiert, 10 $\mu\text{g/ml}$ α tTGase Ak, Änderung der optischen Schichtdicke: 7 nm.

In Abb. 46 ist eine erste Messung mit α tTGase Ak mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf einer Peptidoberfläche mit Peptid 6 gezeigt. Im Einkanal-RIFs im Fluss konnte nach ca. 400 sec eine Bindung von 6.8 nm detektiert werden. Der lineare Verlauf weist auf die spezifische Bindung hin und zeigt, dass die Gleichgewichtsbeladung für die Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ noch nicht erreicht ist. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Antikörperlösung, mit der normalerweise die maximale Oberflächenbeladung bestimmt wird, kann eine wesentlich höhere Änderung der optischen Schichtdicke erreicht werden. Der Einsatz dieser hohen Konzentration ist jedoch auf Grund des Preises des Antikörpers zu kostspielig. Unspezifische Bindung des Antikörpers konnte bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ weder auf reiner Dextranoberfläche noch auf einer Peptidoberfläche detektiert werden.

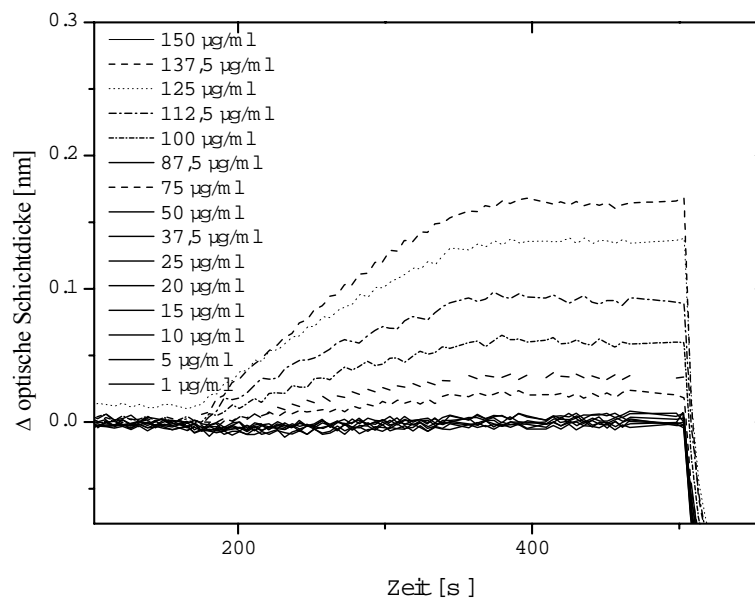


Abbildung 47: Unspezifische Bindung von Peptiden auf Peptidoberflächen

Für Messungen nach der Methode des Bindungshemmtests müssen Peptide einer Antikörperlösung zugesetzt werden. Die Peptide, welche an die Antikörper binden, verhindern die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche. Voraussetzung für die Methode ist, dass die Peptide weder spezifisch noch unspezifisch an die Oberfläche binden. Da Peptide agglomerieren, wurde untersucht, ab welcher Peptidkonzentration der injizierten Lösung das Agglomerieren auf einer Peptidoberfläche mit RIFs beobachtet wird. Wird eine Signaländerung durch Agglomerieren beobachtet, darf diese Konzentration des Peptids nicht eingesetzt werden, da die Ergebnisse des Bindungshemmtests dann verfälscht werden.

Hierzu wurde die unspezifische Bindung des Peptids mit der Sequenz EEREAFTRANHLNKEE auf einer mit Peptid 6 modifizierten Oberfläche nachgewiesen. Abb. 47 zeigt verschiedene Konzentrationen des Peptids. Ab einer Konzentration von 75 µg/ml Peptid in PBS konnte eine unspezifische Bindung auf der Oberfläche durch das Agglomerieren der Peptide nachgewiesen werden. Da bei den folgenden Untersuchungen unterschiedliche Peptidsequenzen zur Inhibierung der Bindung eines Antikörpers an die mit Peptid 6 modifizierte Oberfläche eingesetzt wurden, sollte auf Grund des zu erwartenden leicht unterschiedlichen unspezifischen Verhaltens von verschiedenen Peptidsequenzen die Inhibierung niemals mit einer Peptidkonzentration von 50 µg/ml und höher erfolgen.

Die hier immobilisierten Oberflächen auf Dextran sind bei Lagerung im Kühlschrank über ein halbes Jahr stabil.

5.4.2 Epitopmapping der Transglutaminase

Für die Zöliakiediagnostik existieren bislang Testsysteme, die auf bestimmten Gliadinpeptiden beruhen. Die Peptide sind mit Ausnahme des in [Mülbe_2001] nicht direkt spezifisch für Zöliakie [siehe Einleitung]. Weitere ELISA-Tests beruhen auf der Immobilisierung der vollständigen Transglutaminase, die jedoch teuer und aufwendig exprimiert werden muss. Deshalb soll hier anhand eines Beispiels gezeigt werden, wie ein Testsystem aussehen kann, das auf bestimmten Peptidsequenzen Transglutaminase statt auf dem kompletten Enzym Transglutaminase beruht und mit der markierungsfreien Methode RfS arbeitet.

Ein Antikörper (CUB7402) wurde für die Entwicklung des Testassays verwendet.

Der Antikörper erkennt 2 Regionen in der Transglutaminase, bindet jedoch mit höherer Affinität an das lineare Epitop, das den Bereich der Aminosäuren 441-475 des Enzyms abdeckt. Das Vorliegen eines linearen Epitops ist die Voraussetzung für diese Untersuchungen. Bei einem konformationellem Epitop sind Peptidsequenzen von unterschiedlichen Bereichen der Aminosäuresequenz an der Bindung beteiligt.

Es wurde ein 15mer Peptid gefunden, welches eine Bindung zum Antikörper aufwies. Dieses Peptid Nr. 6 wurde auf der gesamten Oberfläche des Glastransducers für die parallele RfS-Messung immobilisiert. Dies gewährleistet eine homogene Oberflächenbelegung, wie die Messung von 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper an allen Spots zeigt (Abb. 48).

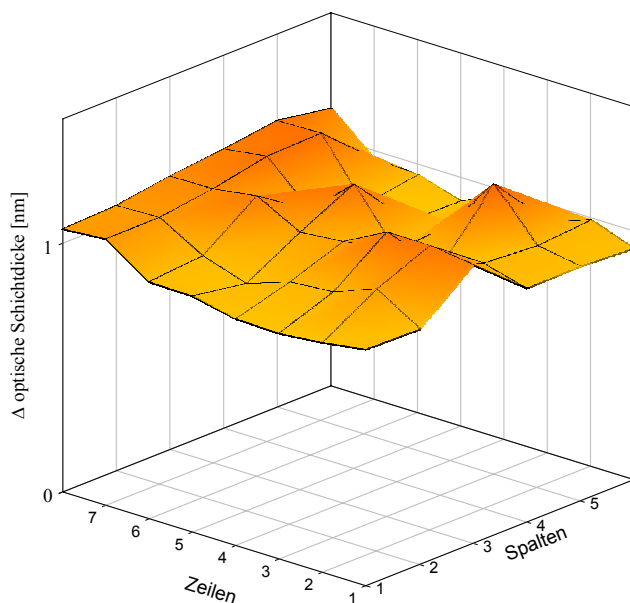


Abbildung 48: Referenzmessung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper

Vor jeder Benutzung eines neuen Chips muss eine Referenzmessung erfolgen. Nur wenn die Referenzmessungen, so wie in diesem Fall, einheitlich sind, kann man ohne Referenzierung weiterarbeiten. Eine homogene Oberflächenverteilung des Chips hängt nicht nur von der Oberflächenchemie ab, sondern es muss eine homogene Ausleuchtung der gesamten Oberfläche und eine gleichmäßige Interferenzschicht (Ta_2O_5 und SiO_2) auf dem Chip vorhanden sein. Dies ist bislang bei ca. 10 % der Chips der Fall.

Mit der auf Homogenität getesteten Oberfläche erfolgt über einen Bindungshemmtest das Epitopmapping mit den in Abb. 10 dargestellten Peptidsequenzen.

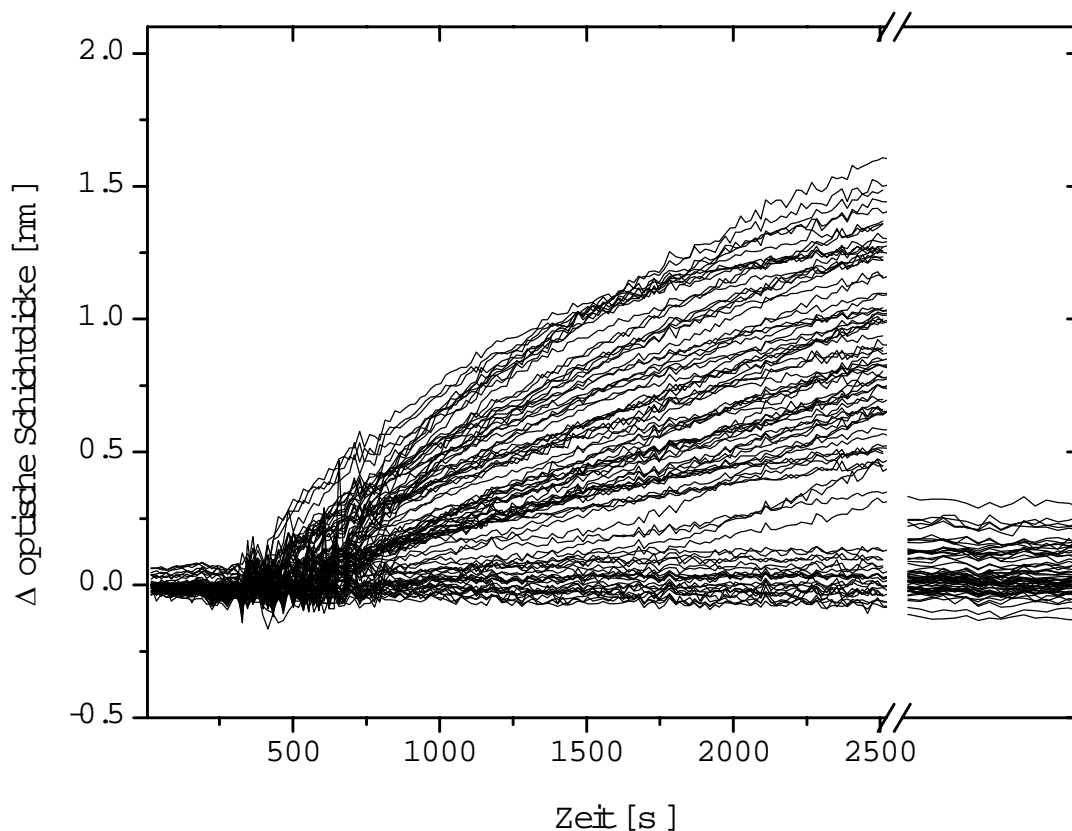
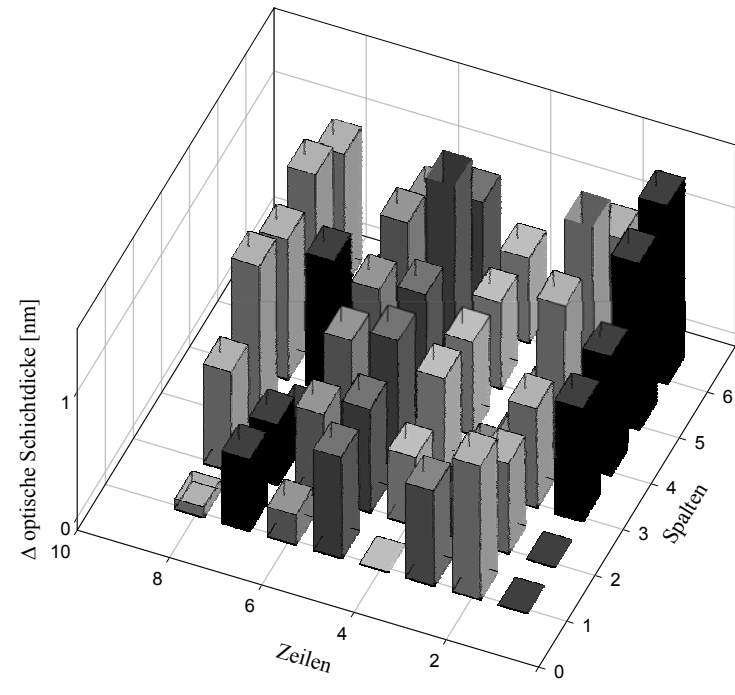
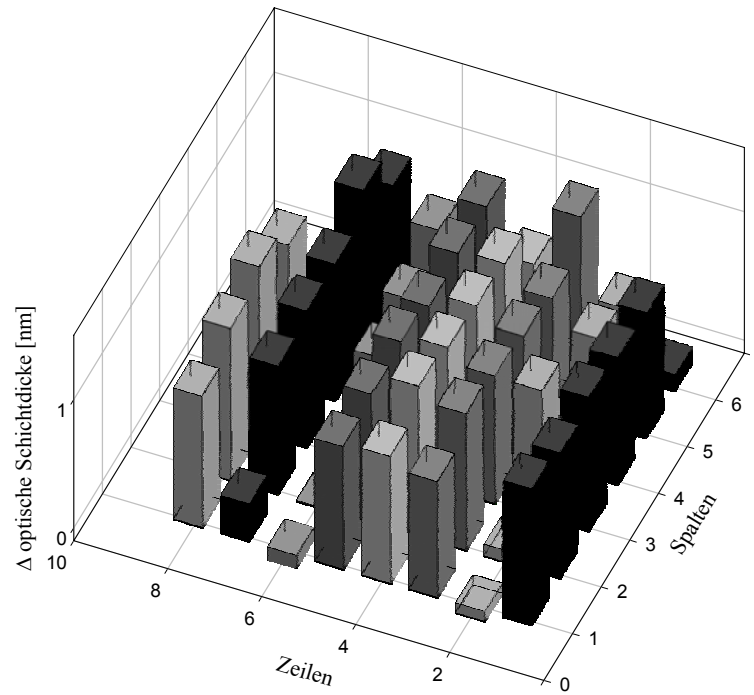


Abbildung 49: Originalmesskurven des Epitopmappings

In Abb. 49 sind die Originalmesskurven einer Beispielmessung aus dem Epitopmapping gezeigt. Man erkennt die typische spezifische Bindungskurve für eine Messung im Stop flow nach dem zweiten Fickschen Gesetz (siehe Kapitel 3.5). Es wurde eine Unterbrechung in der Abszisse zwischen Messung und Baseline nach erfolgter Regenerierung eingefügt, da hier die gesamte Lösung aus den Kavitäten entfernt wurde und somit bei Messung gegen Luft ein großer Brechungsindexsprung zu sehen ist. Die Auswertung erfolgte nach Schütz [Schütz_2000].



Belegung der Probenplatte

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Z8	18	19	20	21	0	0
Z7	13	14	15	16	AK	17
Z6	7	8	9	10	11	12
Z5	2	3	0	4	5	6
Z4	18	19	20	21	1	AK
Z3	12	13	14	15	16	17
Z2	7	8	AK	9	10	11
Z1	1	2	3	4	5	6

Belegung der Probenplatte

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Z8	6	5	4	3	2	1
Z7	11	10	9	AK	8	7
Z6	17	16	15	14	13	12
Z5	AK	1	21	20	19	18
Z4	6	5	4	AK	3	2
Z3	12	11	10	9	8	7
Z2	17	AK	16	15	14	13
Z1	0	0	21	20	19	18

Abbildung 50: Screeningergebnisse für das Epitopmapping, links erste Messung und Belegung, rechts zweite Messung Z1-Z8 entsprechen den Zeilen und S1-S6 entsprechen den Spalten des Probenarrays. Die Zahlen 1-21 geben die Nummern der eingesetzten Peptide an, 0 entspricht reinem Puffer und Ak reiner Antikörperlösung.

Die einzelnen Ergebnisse der Messungen sind in der Abb. 50 mit den entsprechenden Tabellen zur Chip-Belegungen gezeigt. Diese Abb. soll verdeutlichen, dass die Proben über den gesamten Chip verteilt waren und nicht ein Bereich für bestimmte Peptide ausgewählt wurde. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abb. 51 zusammengefasst.

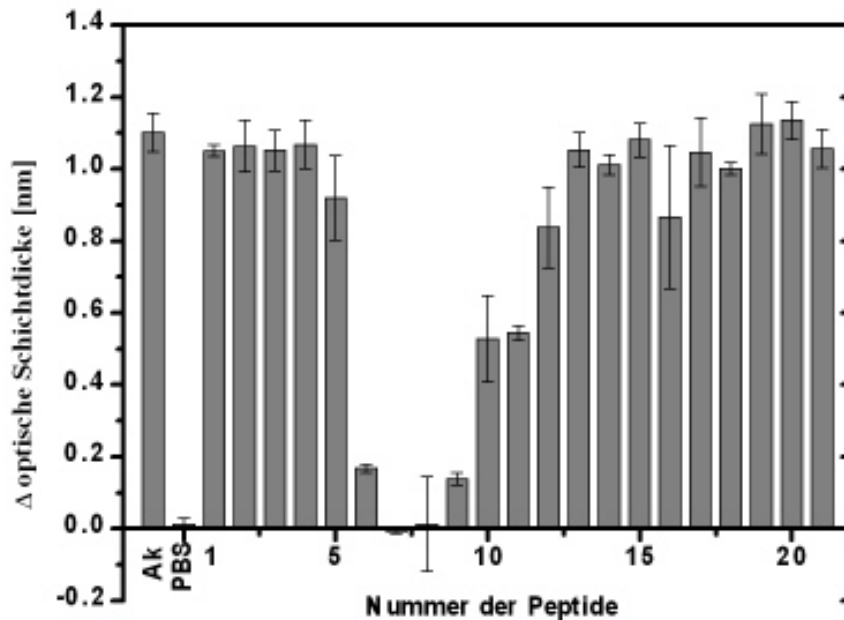


Abbildung 51: Zusammenfassung der Screeningergebnisse des Epitopmappings: Als positive Referenz wurde 5 µg/ml Antikörperlösung als negative Referenz PBS eingesetzt. 1-21 sind die Nummern der Peptide in den jeweiligen Lösungen nach Abb. 10.

Für den ersten Bindungshemmtest wurde eine hohe Konzentration der Peptide von 20 µg/ml gewählt. Damit liessen sich zunächst alle Peptide erfassen, die eine mindestens mittlere Affinität zum Antikörper aufweisen. Eine Referenzmessung mit 5 µg/ml Antikörper ergab ein Signal von 1.2 nm. Nur mit Puffer wurde keine Bindung detektiert. In Messungen mit geringer oder keiner Signaländerung wurden der Antikörperlösung Peptide zugesetzt, die eine Affinität zum Antikörper aufweisen. Dies waren die Peptide Nr. 6-11. Die Standardabweichungen entstand durch das im ersten parallelen RfS-Aufbau notwendige manuelle Pipettieren. Hinzu kam, dass nach einer Messung die Kavitäten unterschiedlich gut geleert wurden, so dass bei unzureichender Leerung bei nachfolgender Messung eine Verdünnung der Probe stattfand.

Um aus den Peptiden mit Affinität zum Antikörper das Peptid mit der höchsten Affinität zu bestimmen, wurde mit den Peptiden Nr. 5 -12 der Bindungshemmtest mit kleinerer Konzentration des inhibierenden Peptides wiederholt. Die Wahl der kleineren Konzentration

von 15 $\mu\text{g/ml}$ der Peptide ermöglichte eine Unterscheidung der unterschiedlich affinen Peptide.

In Abb. 52 sind die Originalmesskurven aus Dreifachmessungen dargestellt. Die unterschiedlichen Affinitäten der Peptide resultieren in unterschiedlichen Änderungen der optischen Schichtdicke.

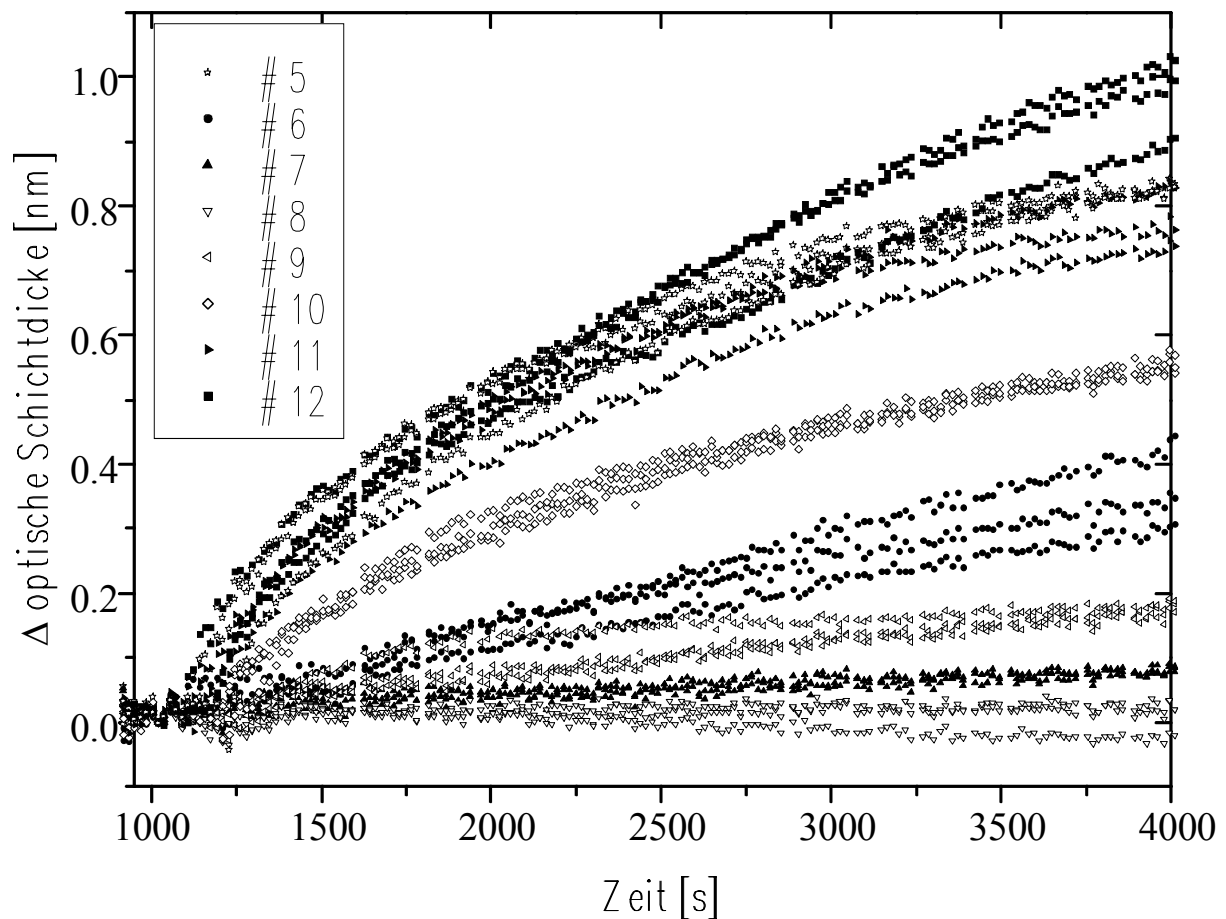


Abbildung 52: Originalkurven der Dreifachmessung des zweiten Screenings

Peptid Nr. 8 konnte bei diesem Bindungshemmtest als das Peptid mit der höchsten Affinität identifiziert werden, gefolgt von den Peptiden Nr. 7,9,6 und 10. Die Peptide 11,12 und 5 zeigen eine geringe Inhibierung.

Mit dem parallelen RfS-Aufbau lassen sich keine Affinitätskonstanten bestimmen, da hierzu Messungen im Flusssystem mit gleich bleibender Diffusion nach dem ersten Fickschen Gesetz notwendig sind. Um die genauen Affinitätskonstanten der Peptide zu bestimmen, wurde daher ein Bindungshemmtest nach Piehler [Piehler_1997a] im Einkanal-RfS-System hinzugezogen. Die Ergebnisse der Affinitätsbestimmung von einigen Peptiden, durchgeführt mit einer Antikörperkonzentration von 600 ng/ml, sind in Abb. 53 gezeigt.

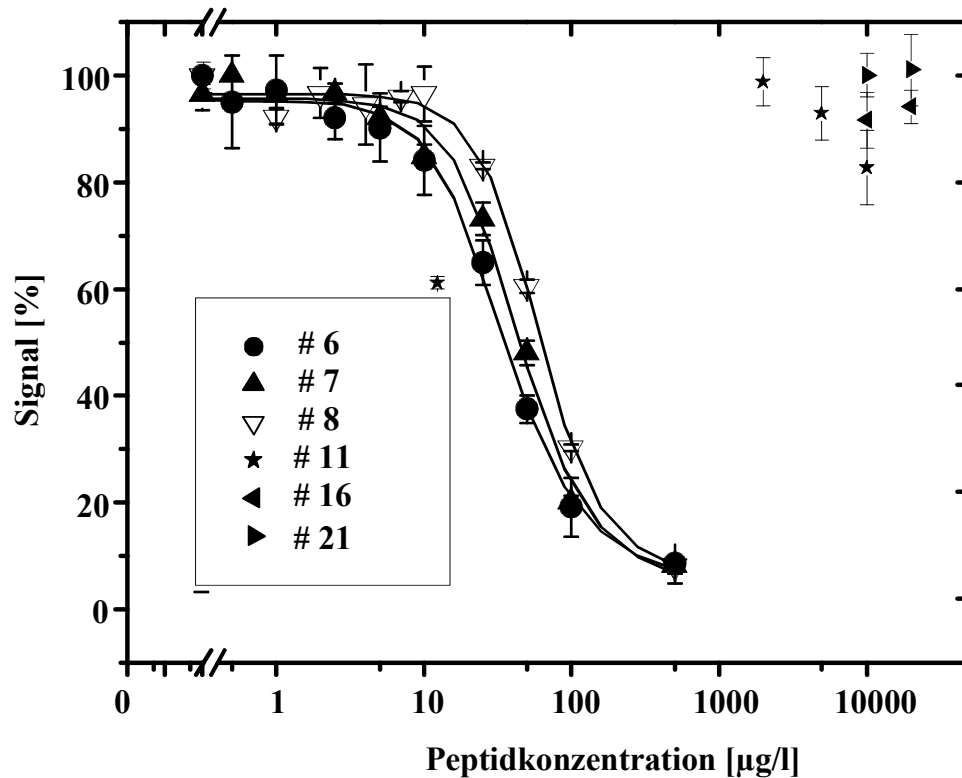


Abbildung 53: Bindungshemmtest mit Peptiden No 6,7,8,11,16,21

Es wurden von den Peptiden Nr. 8, 7, und 6 die Affinitätskonstanten mit $(2.0 \pm 0.6) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, $(1.8 \pm 0.7) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ und $(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmt.

Von den Peptiden Nr. 11, 16 und 21 konnten keine Affinitätskonstanten bestimmt werden. Peptid Nr. 11 zeigt eine geringe Inhibition, jedoch konnte auf Grund der Aggregation der Peptide auf der Oberfläche ab einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ keine höhere Peptidkonzentration zur möglichen Bestimmung der Affinität eingesetzt werden.

Mit der parallelen RfS ist bei einer entsprechenden Affinität eine exakte Unterscheidung auch bei der Verschiebung von nur einer Aminosäure möglich. Damit konnte das Proteinsegment der Transglutaminase vollständig erfasst und das Peptid Nr. 8 mit der höchsten Affinität sehr genau bestimmt werden. Da das für den diagnostischen Assay gesuchte Peptid später auf der Oberfläche immobilisiert werden sollte, trugen alle hier untersuchten Peptidsequenzen ein endständiges Cystein. Eine Änderung der Affinitätsunterschiede durch den Einfluss des für die Immobilisierung notwendigen Cysteins kann somit minimiert werden.

In Abb. 52 ist ein starker Abfall des Signals von Peptid Nr. 5 zu 6 und zwischen Nr. 12 und 11 zu erkennen. Bei Betrachtung der Peptidsequenz wird offensichtlich, dass polare Seitengruppen der Aminosäuren Asparagin und Glutaminsäure großen Einfluss auf die

Affinität haben, der mit der Bildung von Wasserstoffbrücken der polaren Seitengruppen mit dem Protein erklärt werden kann.

Schlussfolgerung:

Der Antikörper bindet mit einer Affinität von $2.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ an das Peptid Nr. 8, welches das Peptid mit der höchsten Affinität zum Ak ist [Kröger_2002a].

Die Ergebnisse des parallelen RfS-Systems stimmen mit den Messungen im Einkanalssystem überein. Dies zeigt zum einen die Konsistenz der Daten, aber auch die Genauigkeit des parallelen RfS-Systems.

Damit kann das parallele RfS konventionelle Methoden, wie z.B. den ELISA ersetzen. Zusätzlich ist mit RfS eine schnellere Bestimmung des passenden Peptides und eine einfache und schnelle Übertragung auf das Einkanalssystem zur genauen Bestimmung der Affinitätskonstante gegeben.

Ein Vergleich der Messung einer Titration des Antikörpers gegen Peptid 8 einmal im Flusssystem und einmal im parallelen RfS System zeigt die Genauigkeit des parallelen Systems hinsichtlich der Bestimmung von Konzentrationen. Jedoch muss für Messungen im parallelen RfS eine höhere Konzentration von Ak für eine Titration eingesetzt werden. Zum einen wird beim parallelen RfS in ruhenden Proben gemessen, und zum anderen ist nach [Rothmund_1999] die Änderung des Signals auf Grund des Einstrahlwinkels von 45° im Vergleich zum Einkanal-RfS (90°) um die Hälfte reduziert.

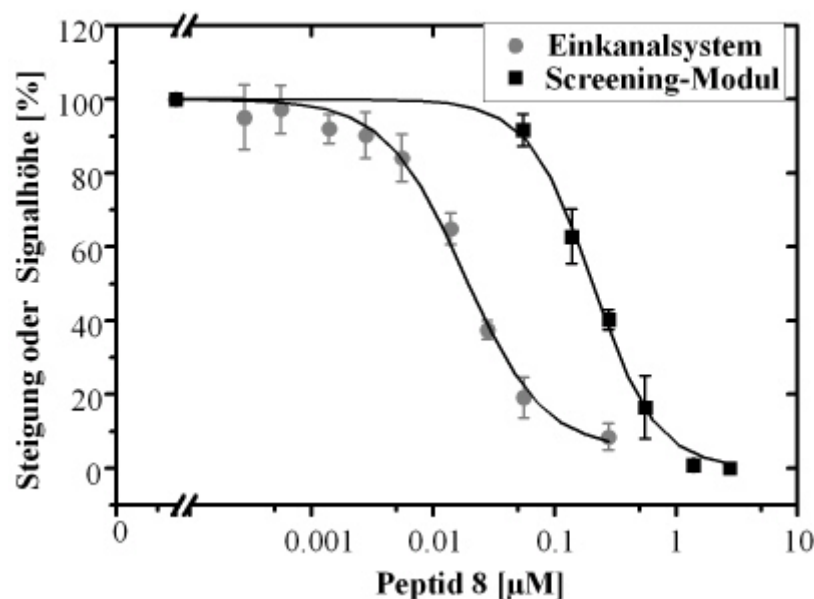


Abbildung 54: Titration der Antikörper im Demonstrator null

Für die Messungen im Einkanalssystem wurde die Steigung der Bindungskurve, für die Messung im parallelen RIFs die Signalhöhe zur Auswertung herangezogen. Der Testmittelpunkt wurde über die Anpassung beider Kurven nach der logistischen Funktion bestimmt und beträgt $0.02 \mu\text{M}$ für die Messung im Fluss und $0.2 \mu\text{M}$ für das parallele System. Daraus ergab sich eine Affinität für das Flusssystem (berechnet aus dem Testmittelpunkt) von $1.4 \cdot 10^8 \text{ M}$ und für die Messung im parallelen System von $1.3 \cdot 10^7 \text{ M}$. Die Messung von Affinitäten in ruhenden Lösungen kann um den Faktor 5 bis Faktor 10 von der wahren Affinitätskonstante abweichen [Schütz_2000].

Zusammenfassung und Diskussion:

In diesem Abschnitt wurde eine optimale Oberfläche für die Peptidimmobilisierung gefunden, mit der sich eine ausreichend hohe Immobilisierungsdichte erzielen lässt. Diese Oberfläche wurde auf das HTS-RIFs übertragen. Mit dem Epitopmapping wurde die genaue Bindungsstelle der Transglutaminase für diesen Antikörper ermittelt, womit die Peptidsequenz dann in einem kompetitiven Assay auf der Basis der entwickelten Peptidoberfläche eingesetzt werden kann. Weiterhin kann für andere Testsysteme das Enzym Transglutaminase mit diesem Ak und der hier ermittelten Peptidsequenz in homogener Lösung oder aber im heterogenen Nachweisverfahren über einen kompetitiven Assay schnell quantifiziert werden. Auch kann mit dieser Peptidsequenz und diesem Ak die aktive Bindungsstellendichte von schon immobilisiertem Enzym auf den ELISA-Platten ermittelt werden.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auf der Basis des hier entwickelten Assays eine weitere Entwicklung in Richtung des Nachweises eines im Blut von Zöliakiepatienten befindlichen Antikörpers sinnvoll ist. Mit dem bekannten monoklonalen Antikörper konnte ein Testsystem aufgebaut werden, das die Genauigkeit des HTS-RIFs mit der Möglichkeit der Unterscheidung von einzelnen ausgetauschten Peptiden und die Übereinstimmung des Einkanalsystems mit dem HTS-System zeigt.

Die Konzentration des Antikörpers konnte über eine Titration im HTS-System ermittelt werden. Die Nachweisgrenzen dieser Titration sind im Vergleich zu ELISA und auch dem Einkanalssystem RIFs noch sehr hoch. Es lässt sich jedoch auch in der parallelen RIFs etwa ein fünftel der hier verwendeten Antikörperkonzentration einsetzen, so dass die Nachweisgrenzen des System erniedrigt werden können.

5.4.3 Messung von Antikörpern in Blutserum mit dem parallelen RIfS-System

Nachdem das Testsystem auf der Basis eines Peptides etabliert war, sollte jetzt dazu übergegangen werden, im Blutserum zu messen.

Im Moment werden ELISA-Kits für den Nachweis der Antikörper im Blutserum von Zöliakiepatienten entwickelt, bei denen das Enzym der Transglutaminase als Ganzes auf dem Träger immobilisiert wird. Die Transglutaminase muss jedoch aufwendig und kostenintensiv extrahiert, isoliert, aufgereinigt und quantifiziert werden. Daher sollte ein Assay aufgebaut werden, bei dem Peptide auf der Oberfläche immobilisiert werden. Diese lassen sich schnell und kostengünstig synthetisieren und die Oberfläche gewährleistet eine wesentlich höhere Vergleichbarkeit der heterogenen Träger untereinander.

Jedoch lassen sich mit der Immobilisierung eines Peptids nicht alle von Patienten gebildeten Antikörper erfassen, da der Patient Antikörper gegen unterschiedliche Epitope auf der Transglutaminase bildet. Insgesamt kennt man heute sechs verschiedene Bereiche auf dem Enzym, welche von Antikörpern, von denen die genaue Peptidsequenz jedoch noch nicht ermittelt wurde, erkannt werden. Dies ist eine weiterführende Aufgabe in diesem Projekt, welche in genau derselben Weise durchgeführt werden muss, wie sie beim Modellsystem erfolgt ist.

Bei Messungen im Blutserum sind folgende Fragen bei Verwendung eines Biosensors zu klären:

1. Absorption des Blutserums
2. Brechungsindexsprünge
3. unspezifische Bindung
4. Nachweisgrenze
5. Probenverbrauch

Um mit dem optischen Biosensor der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie im Serum messen zu können, darf das Serum nicht in dem spektralen Bereich, der mit RIfS erfasst wird, absorbieren. Daher wurde ein Spektrum des Serums aufgenommen.

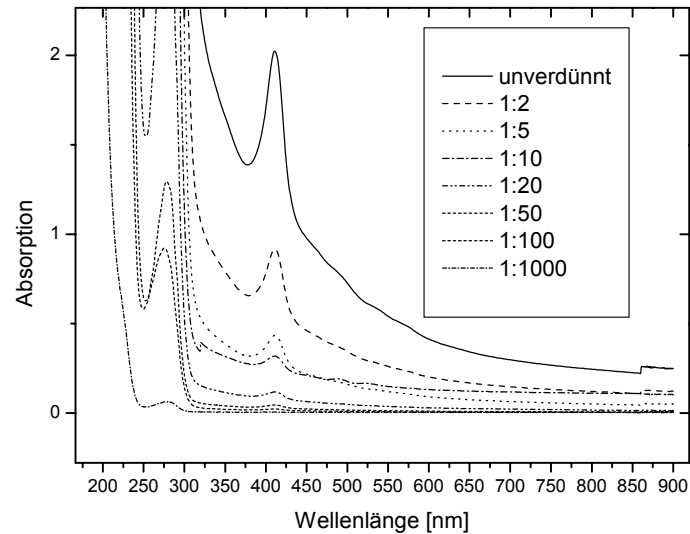


Abbildung 55: Absorptionsspektrum von Blutserum

Von 200 bis 300 nm sind die erwarteten Proteinabsorptionen zu sehen. Der Peak bei 410 nm wird durch die Absorption des im Serum befindlichen Bilirubins, eines Abbauproduktes des Hämoglobins, ausgelöst. Im Einkanalssystem misst RfS im Spektrum von 400-800 nm. Bei einer Verdünnung von 1:10 kann im Blutserum gemessen werden, jedoch sollte im Einkanal-RfS die Auswertung erst ab 450 nm beginnen. Bei kleineren Verdünnungen muss entsprechend referenziert werden. Im der parallelen RfS sind die Messbereiche durch die jeweils benutzten Filter vorgegeben (siehe Abschnitt 3.4).

Nach der Messung von fötalen Kälberserum (FCS) sowie reinen Blutserum konnte bei entsprechender Verdünnung kein Brechungsindexsprung beobachtet werden.

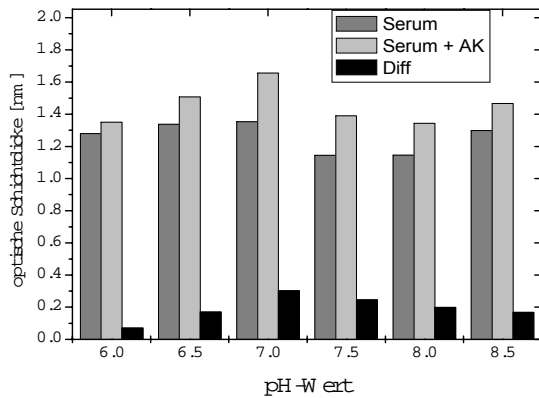
Größere Probleme bereitet die unspezifische Bindung des Blutserums auf den RfS-Oberflächen. Hier können verschiedene Vorreinigungsschritte unternommen werden, wie z.B. die Einführung einer vorherigen Affinitätsäule oder aber die Aufreinigung über Microbeads. Das Ziel des Einsatzes gerade der RfS-Methode liegt jedoch immer in der direkten Messung der Antikörper aus dem Blutserum ohne Aufreinigung und ohne Markierung.

Für die Minimierung der unspezifischen Bindung des Blutserums auf der Oberfläche wurden verschiedene Methoden angedacht, z.B. das Herstellen einer Teflonoberfläche. Hier ist jedoch die kovalente Anbindung von Biomolekülen mit entsprechend großer Bindungskapazität schwierig. Deswegen wurde auf schon im Arbeitskreis etablierte Oberflächenchemie zurückgegriffen. Zur Verfügung standen Dextranoberflächen und Polyethylenglycoloberflächen. Prinzipiell weisen die PEG-Oberflächen gegenüber biologischen Proben eine wesentlich geringere unspezifische Bindung im Vergleich zu Dextranoberflächen auf.

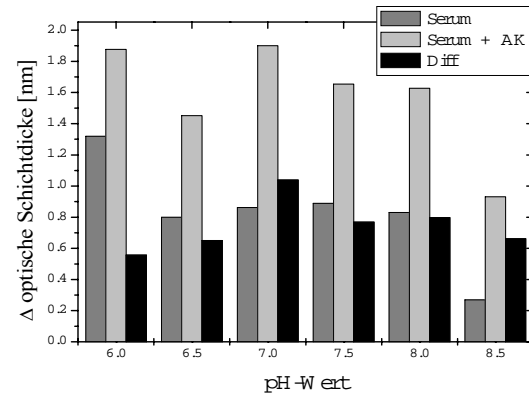
Das immobilisierte Peptid trägt ganz entscheidend zur Erhöhung der unspezifischen Bindung bei. Reine Dextranoberflächen weisen in jedem Fall eine geringere unspezifische Bindung im Vergleich zu 15mer peptidfunktionalisierten Oberflächen auf. Aus diesem Grunde ist eine Referenzierung gegen eine reine Dextranoberflächen nicht zulässig. Die Detektion von 5 µg/ml Ak in Tris-Puffer bei peptidfunktionalisierten Dextranoberflächen ergab im Demonstrator ein spezifisches Signal von durchschnittlich 600 pm zusätzlich zu einem unspezifischen Signal von durchschnittlich 200 pm bei einer 1:10 Verdünnung des Blutserums. Dies entspricht einem Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung von 4:1. Bei peptidfunktionalisierten PEG-Oberflächen wurde ein spezifisches Signal der Bindung von 5 µg/ml Ak von durchschnittlich 140 pm zu einem unspezifischen Signal von durchschnittlich 80 pm bei 1:10 Verdünnung erzielt. Dies entspricht einem Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung von 2.5:1. Zur Erhöhung der spezifischen Bindung auf PEG-Oberflächen wurden Dendrimerstrukturen basierend auf Lysinen [Haake_2000] untersucht. Jedoch stieg mit zunehmendem Lysin-Schichtaufbau auch die unspezifische Bindung auf der Oberfläche (hier mit FCS überprüft) an, so dass auch auf diese Alternative verzichtet werden musste. Da im parallelen System auf Peptidoberflächen gut referenziert werden kann und eine möglichst hohe Sensitivität erzielt werden muss, werden auf Grund des besseren Verhältnisses von spezifischer zu unspezifischer Bindung Dextranoberflächen für nachfolgende Versuche verwendet.

In der Literatur gibt es weitere Lösungsversuche häufig basierend auf Teflon, wobei zwar die Minimierung von unspezifischer Bindung bei Systemen wie Blutkathetern und Schläuchen für Blutanalyse und Dialyse gelöst ist, aber für mit Biomolekülen funktionalisierte Oberflächen ist noch kein wirklicher Durchbruch erzielt worden.

Die größten Erfolge sind mit Änderungen von Puffersystemen, vor allem pH-Wert-Änderungen, sowie verschiedenen Blockierungslösungen auf unterschiedlichen Oberflächen erzielt worden [Krapf_2001]. Ein Vergleich der Puffersysteme und unterschiedlicher pH-Werte ist in Abb. 56 gezeigt. In PBS war die unspezifische Bindung bei von hier gemessener 1:4 Verdünnung nach dem Blocken mit FCS noch so hoch (bis 5 nm), dass eine Unterscheidung zwischen Antikörper enthaltende Probe und reiner Blutprobe nicht getroffen werden konnte. Deshalb sind hier die beiden Untersuchungen für Tris-Puffer und Hepes-Puffer dargestellt.



HEPES-Puffer



TRIS-Puffer

Abbildung 56: Variation von Puffer und pH-Wert

Vergleicht man die Ergebnisse der Puffersysteme, so fällt auf, dass in beiden Fällen die unspezifische Bindung im Säuren höher ist als im Basischen, aber die spezifische Bindung des Antikörpers im Basischen kleiner wurde, so dass der optimale pH-Wert mit der höchsten Differenz als der höchsten spezifischen Bindung pH 7 war. Zudem waren im HEPES-Puffer die unspezifischen Bindungen größer, die spezifischen Signale aber kleiner. Hier ist anzumerken, dass alle Messungen auf derselben Oberfläche mit dem Demonstrator null vorgenommen wurden, weswegen nur Einfachmessungen erfolgten. Bei Wiederholung auf einem neuen Chip ergab sich prinzipiell das gleiche Bild. Dreifachmessungen wurden wegen zu geringer Antikörpermengen unterlassen. Alle weiteren Messungen im Blutserum wurden deshalb mit dem hier untersuchten TRIS-Puffer ausgeführt. Auch in anderen Blutanalyse-Systemen wurde bevorzugt TRIS-Puffer eingesetzt [Krapf_2001].

In Abb. 57 wurde die Spezifität der Bindung des Antikörpers im Blutserum aufgezeigt.

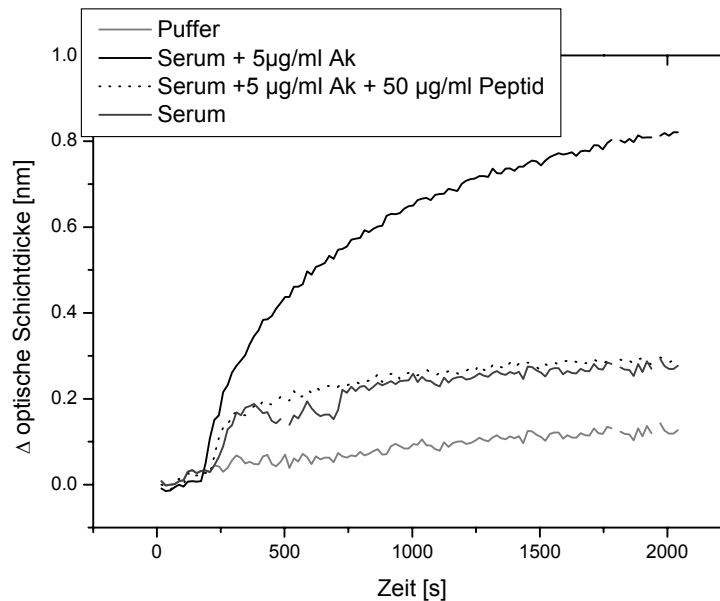


Abbildung 57: Inhibierungsmessungen in Blutserum

Es wurden Puffer, reines Blutserum (Verdünnung 1:5 in TRIS-Puffer pH 7.0), Blutserum mit Ak und zum Beweis der spezifischen Bindung eine vorinkubierte Probe aus Blutserum mit zugesetztem Ak und inhibierendem Peptid Nr. 8 vermessen. Die Messung des reinen Puffers ergibt das Nullsignal und weist in diesem Fall eine sehr hohe Drift auf. Die Bindung von Antikörper ergab ein Signal von 800 pm. Mit Inhibierung durch das Peptid Nr. 8 ergibt sich ein Signal von 240 pm. Dies entspricht exakt der Messung von reinem Blutserum in entsprechender Verdünnung. Damit liegt eine spezifische Bindung von 560 pm vor. Somit ist es möglich, mit RfS im Blutserum spezifisch Antikörper nachzuweisen. Auch die Möglichkeit, dass Antikörper an bestimmte Proteine im Blutserum adsorbiert wurden und somit nicht zur Bindung an die Oberfläche zur Verfügung standen, konnte in diesem Fall ausgeschlossen werden. Ob dies allerdings in jeden Fall zutrifft, ist fraglich. In diesem Versuch wurde eine recht hohe Antikörperkonzentration eingesetzt. Ziel ist jedoch das Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze.

Somit wurde im nachfolgenden Versuch (Abb. 58) die Nachweisgrenze (Dreifachmessung) mit dem bekannten System bestimmt. Um eine hohe Nachweisgrenze zu bekommen, wurde eine Verdünnung von 1:5 für den Antikörper gewählt. In der Abb. 58 ist die wahre Konzentration des Antikörpers in der unverdünnten Probe angeben.

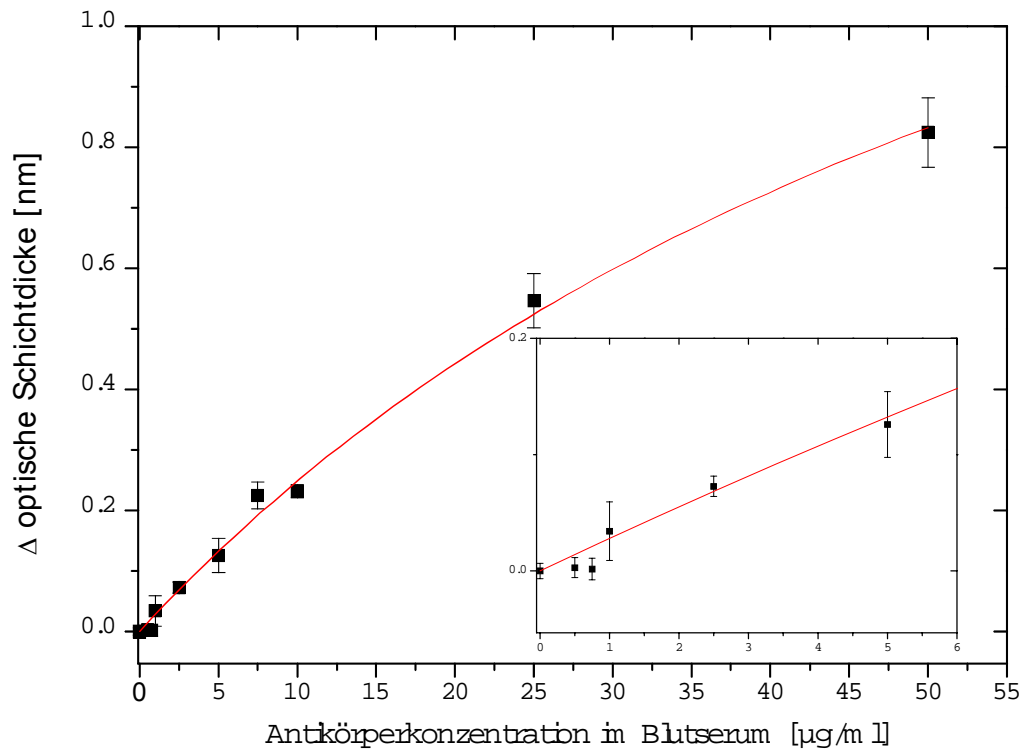


Abbildung 58: Ermittlung der Nachweisgrenze von Antikörpern auf Peptidoberflächen in Blutserum

Für den hier eingesetzten Antikörper ergibt sich eine Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/ml}$ entsprechend 6.6 nM im Blutserum.

In [Labodia_2003] ist eine Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ als höchste vorkommende Antikörperkonzentration im menschlichen Blutserum von für Zöliakie signifikante Antikörper angegeben. Allerdings liegt nach [Sollid_2000] gegen Transglutaminase eine Mischung aus IgG- und IgA- Fraktionen vor, wobei die IgA Fraktionen meistens geringere Affinitäten aufweisen als die hier verwendeten IgG-Moleküle. Dennoch kann nach diesen Messungen das parallele RfS-System als einfache und schnelle Methode für die Zöliakiediagnostik eingesetzt werden.

Der Probenverbrauch bei diesem System liegt mit $6\text{-}9 \mu\text{l}$ je nach notwendiger Verdünnung in ähnlichen Bereichen wie herkömmliche Analyseverfahren wie z.B. ELISA.

5.4.4 Patientenproben

Da noch keine Peptidkollektionen vorlag, aber dennoch Blutseren von Patienten vermessen werden sollten, wurde zur Erfassung aller gegen Transglutaminase gerichteten Antikörper das Enzym selbst kovalent an die Oberfläche gebunden. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Anbindung des Enzyms zu finden, die zu einer maximalen Beladung der Oberfläche

führen, wurde die Bindung des Enzyms zeitaufgelöst verfolgt. Nach der Zugabe von EDC/NHS [150 mM/100 mM] in wässriger Lösung auf eine Carboxylgruppen tragende Transduceroberfläche wurde eine Konzentration von 50 µg/ml Protein zur Immobilisierung eingesetzt. Es ist die hohe Enzymkonzentration nötig, da die Aminogruppen, welche spontan unter Bildung einer Amidbindung reagieren, in Konkurrenz zur Hydrolyse des Aktivesters durch das Lösungsmittel Wasser stehen. Zudem sollte das Protein eine leicht positive Gesamtladung tragen, damit die Proteinkonzentration in der Nähe der negativ geladenen Carboxyoberfläche sehr hoch ist. Daher muss der pH-Wert des Puffersystems so gewählt werden, dass die Gesamtladung des Enzyms etwas unterhalb seines isoelektrischen Punktes liegt. Zudem wird HEPES-Puffer von geringer Ionenstärke (50 mM) eingesetzt, um die elektrostatischen Wechselwirkungen von Enzym zur Oberfläche zu unterstützen. Bei pH 4 und kleiner ist jedoch mit einer beschleunigten Hydrolyse des Aktivesters zu rechnen. Außerdem liegen die Aminogruppen des Proteins protoniert vor, so dass der Einsatz von pH 4 und kleiner keinen Sinn macht. Die Messungen wurden im Kavitätensystem am Einkanalssystem gemessen, um den Probenverbrauch möglichst gering zu halten.

Abb.59 zeigt die pH-Wert Abhängigkeit.

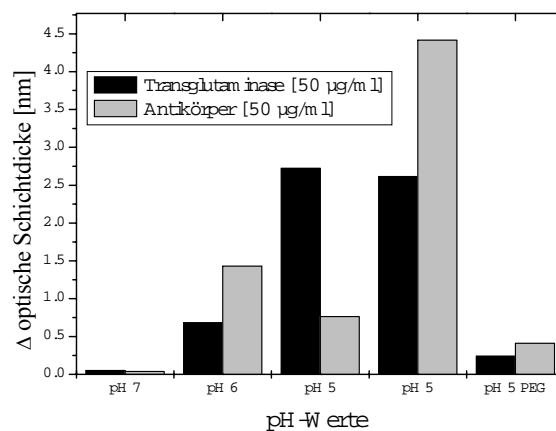


Abbildung 59: Abhängigkeit der Kopplungseffizienz vom pH-Wert

Nach der Anbindung des Enzyms wurde jeweils mit 50 µg/ml des bekannten monoklonalen Antikörpers die Effizienz der Anbindung überprüft. Bei pH 7 und höheren pH-Werten konnte keine Bindung des Enzyms an die Oberfläche beobachtet werden. Bei pH 5 wurde die maximale Beladung erzielt. Bei den ersten Versuchen wurde die Bindung des Antikörpers in demselben Puffer vermessen, mit dem auch die Anbindung des Enzyms beobachtet wurde. Da jedoch die Antikörperbindung bei pH 7 in TRIS-Puffer optimal wird, wurde die Messung bei pH 5 wiederholt mit anschließender Anbindung des Antikörpers von 4.4 nm in Tris pH 7.

Zum Vergleich wurde auf PEG-Oberflächen in HEPES Puffer pH 5.0 eine wesentlich geringere Bindung des Enzyms und demzufolge auch eine geringere Antikörperbindung als in TRIS-Puffer pH 7 beobachtet. Nach Abb. 59 wurden die nachfolgenden Immobilisierungen des Enzyms in HEPES-Puffer pH 5.0 auf Dextranoberflächen durchgeführt. Zudem ergab diese Messung, dass der monoklonale Mausantikörper α tTGase gegen Transglutaminase als positive Testprobe benutzt werden kann. Für die Immobilisierung im Sandwich für den Demonstrator muss eine Mindestkonzentration von 1 mg/ml gewählt werden. Kleinere Konzentrationen (untersucht wurden 50 μ g/ml, 100 μ g/ml und 500 μ g/ml) ergaben sehr kleine Belegungen. So wurde mit 500 μ g/ml nur eine Änderung der optischen Schichtdicke von 100 pm mit einer Antikörperkonzentration von 5 μ g/ml erzielt.

Zum Schluss wurden sieben verschiedene Blutseren aus Patienten der Kinderklinik Oslo getestet. Da die Blutseren je nach Proteingehalt und pH-Wert unterschiedliche unspezifische Bindung aufwiesen, musste für jede Blutprobe eine Negativprobe bestimmt werden. Zur Referenzierung ist normalerweise eine orts aufgelöste Immobilisierung unterschiedlicher Peptide oder Enzyme notwendig, welche zwar prinzipiell über EDC/NHS in den einzelnen Kavitäten möglich ist. Hier sind aber nach [Birkert_2001] große Schwankungen zu erwarten. Deswegen wurden die einzelnen Blutseren zur Simulation einer negativen Probe mit einer Konzentration von 50 μ g/ml Transglutaminase versetzt und vorinkubiert.

Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 60 gezeigt. Für einen besseren Vergleich sollten alle Messungen auf einem Chip erfolgen. Es konnten deswegen nur Zweifachmessungen durchgeführt werden, allerdings für die einzelne Blutprobe in den Verdünnungen von 1:5 und 1:10, so dass quasi Vierfachmessungen vorliegen. Nach der eigentlichen Messung wurde eine Referenzmessung mit dem monoklonalen Ak α tTGase vorgenommen. Die Blutseren wurden gegen diese referenziert und die Messung der negativen Probe subtrahiert.

Messung von Patientenseren:

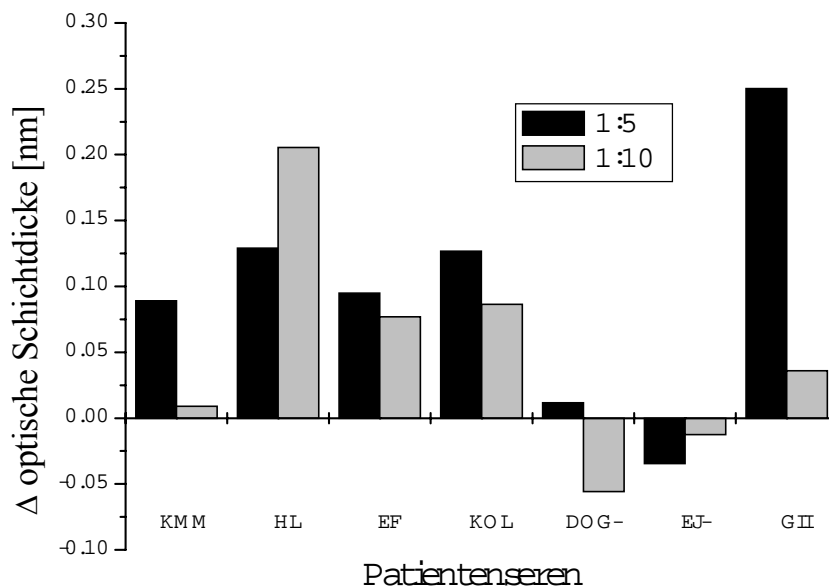


Abbildung 60: Ergebnis des Patientenscreens

Die Messung von reinem monoklonalen α tTGase Ak als Referenz in der Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ ergab eine Änderung der optischen Schichtdicke von 500 pm. Die Patientenseren stammen von Patienten, welche auf Zöliakie mittels Biopsie getestet wurden. Die Seren mit der Benennung DOG und EJ sind negativ, alle anderen sind positiv auf Zöliakie getestet. Mit RfS konnte dies nachvollzogen werden. Die positiven Seren konnte alle identifiziert werden. Die negativen ergaben negative oder nur sehr kleine positive Werte. Dies zeigt, dass mit entsprechender Referenzierung Diagnostik von Patientenseren in Blut mit RfS möglich ist.

Hier handelt es sich um Zweifachmessungen, weswegen keine Standardabweichungen angegeben werden konnten. Die Abweichungen in den Messungen sind allerdings sehr hoch. Der Hauptgrund für die großen Fehler in diesen Messungen liegt in der Referenzierung. Bei der Verwendung von Enzymen kann nicht exakt referenziert werden. Die Referenzierung erfolgte nach der eigentlichen Messung nur durch Spülen mit Puffer. Um eine gute Referenzierung auf dieser Oberfläche zu erzielen, muss ein geeignetes Regenerationsmittel gefunden werden, bei dem der Enzymkomplex stabil bleibt. Da bei der Entwicklung dieses Assays gerade der Vorteil in der Verwendung von Peptidoberflächen anstelle der Enzymoberfläche liegen soll und die Peptidoberflächen sich ohne Probleme regenerieren lassen, ist bei Vorhandensein eines entsprechenden Antikörpers eine Referenzierung kein Problem. Damit würden sich auch die Fehler sehr stark minimieren, wie aus den Messungen von Blutserum auf Peptidoberflächen zu ersehen ist.

Schlussfolgerung:

Unterscheidungen von Patienten mit Zöliakie und ohne sind durch Messung der Blutseren mit RIfS möglich. Jedoch ist es sinnvoll auf den hier entwickelten Peptidoberflächen zu detektieren. Da hierzu jedoch zunächst viele Peptidbibliotheken hergestellt und auf Bindung untersucht werden müssen, soll im Anschluss daran zur Minimierung des Substanzverbrauches mit der Miniaturisierung des parallelen RIfS für die Messung in sehr kleinen Kavitäten begonnen werden.

5.5 Miniaturisierung von parallelem RIfS

Zum Aufbau eines optischen Messsystems sind mindestens drei Komponenten nötig:

1. optische Ausleseeinheit
2. Probenhandhabung (Fluidik / Pipettiersysteme)
3. Probenhalter (Messzelle oder Kavitäten)

Die optische Ausleseeinheit ist in diesem Fall die miniaturisierte parallele RIfS-Optik, die zur Verfügung stand (Abb. 17).

Als nächstes sollte ein Pipettiersystem bereitgestellt werden, welches in der Lage ist, 96 Nanokavitäten gleichzeitig zu befüllen. Hierzu wurde das einzige Gerät verwendet, welches momentan diese Aufgabe erfüllen kann. Dies ist der TopSpot E mit einem 96er Dosierkopf (Abb. 18). Um den Vorteil der zeitaufgelösten Messung bei RIfS ausnutzen zu können, musste das System auf den Aufbau der miniaturisierten Optik aufgesetzt werden (Abb. 66).

Für die Herstellung der Kavitäten soll zunächst kurz erwähnt werden, dass für die Messung mit RIfS eine bestimmte Kavitätenstruktur hergestellt werden musste.

1. Die Kavitäten mussten einen Abstand von 500 μm von Mitte zu Mitte aufweisen, da sie an den käuflich erworbenen TopSpot Dosierkopf angepasst werden mussten.
2. Die Kavitäten mussten eine bestimmte Höhe in Abhängigkeit vom Durchmesser besitzen, um Störungen der Messung durch Reflexion an der oberen Grenzfläche zwischen dem Lösungsmittel in den Kavitäten und der Luft zu verhindern (Abschnitt 3.2.3). Zudem sollten sie ein Mindestfassungsvermögen von 40 nl aufweisen. Mit diesem Mindestfassungsvermögen liegen sie gerade noch in einem Bereich in dem schon Messungen durchgeführt wurden [Seidel_2003]. Kleinere Kavitäten sind wegen zunehmenden Verdunstungsproblems nicht möglich.
3. Die Kavitäten sollten einen Minstdurchmesser von 250 μm haben, da mit dieser Größe Messungen auf verschiedenen Spots im Flusssystem mit dem zur Verfügung stehenden optischen Aufbau schon erzielt worden sind [Matthias]. Kleinere

Durchmesser sind nicht sinnvoll, da im optischen Aufbau dann zu wenig Pixel für die Auswertung einer Kavität zur Verfügung stehen. Mit der Festlegung dieses Durchmessers liegt auch die Mindesthöhe auf Grund der Verhinderung von Reflexionen am Flüssigkeitsmeniskus bei 250 μm .

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Herstellung von Kavitäten in der Größe von Nanowells. Dazu zählen Photolithographie / Photoresiste, Polymer Imprinting Techniken, Adhäsionsfolien mit entsprechender Lochmaske, Spritzguss, Erzeugung von hydrophoben/hydrophilen Strukturen und der Siebdruck.

Viele der hier aufgezählten Methoden sind für die klassische Chiptechnologie entwickelt worden und eignen sich für die Herstellung von Strukturen im Nanometerbereich. Jedoch erreichen selbst Methoden wie der Siebdruck bei einer Ortsauflösung der Strukturen von 250 μm eine maximale Höhe von 100-150 μm . Auch die Dicken von Adhäsionsfolien liegen im Nanometerbereich. Die Herstellung von hydrophilen/hydrophoben Strukturen ergibt ebenfalls eine Höhe der Strukturen, die unterhalb von 20 μm liegt. Der Spritzguss mit dem z.B. die Nanotiterplatte [Seidel_2003] oder auch Legosteine hergestellt werden, eignet sich nicht für die Aufbringung auf Glas.

Für die Herstellung der Kavitäten für das miniaturisierte RIFS wurden schwarze Polystyrolplatten verwendet, die eine Höhe von 500 μm haben. Für die Aufbringung auf Glas wurde ein spezieller Kleber sehr homogen auf eine Seite der Polystyrolplatte aufgebracht, mit der die Polystyrolplatte dann auf der Glasplatte befestigt wurde.

Zur Herstellung der Kavitäten wurden mit einem Laser Löcher in die Polystyrolplatte geschossen. Erst nach der Herstellung der Kavitäten wurden diese auf den Chip aufgeklebt. Nach einigem Austesten erwies sich eine Wellenlänge von 355 nm eines Nd-YAG-Lasers mit einer Impulsdauer von 10 nsec als geeignet. Zum einen waren hier die Strukturen der Löcher sehr homogen, zum anderen konnte aber auch nur bei dieser Wellenlänge der Kleber komplett aus den Löchern für die Kavitäten herausgelöst werden.

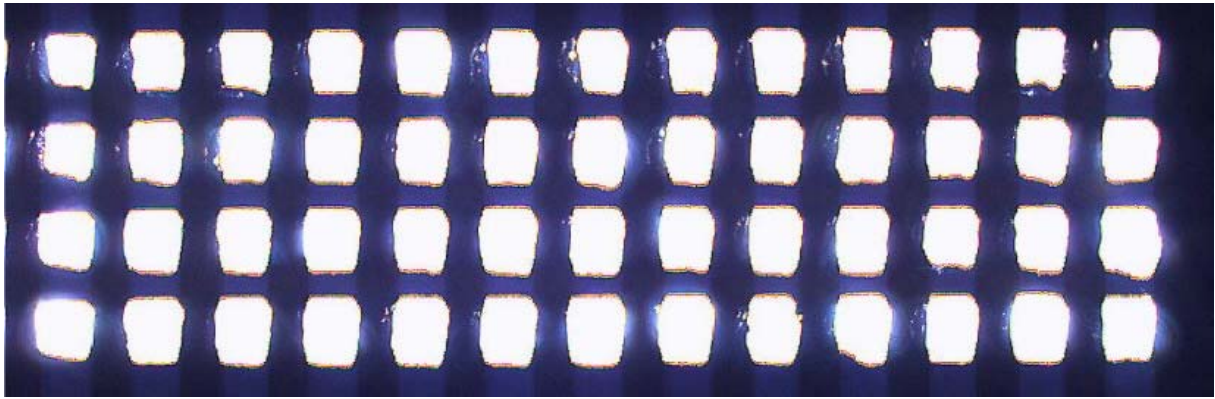


Abbildung 61: Abbildungen der Lochstruktur aufgenommen mit einem Mikroskop

In Abb. 61 sind die entstandenen Kavitätenstrukturen gezeigt. Eine Ansicht über das komplette Array wurde mit einem Mikroskop aufgenommen. Der Abstand der Kavitäten ist $250\ \mu\text{m}$ in einer regelmäßige Anordnung.

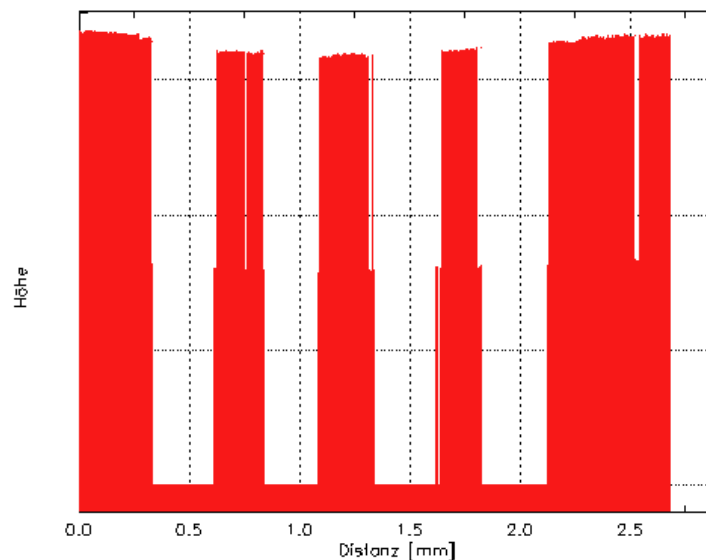


Abbildung 62: Profil der Kavitäten auf dem Glastransducer aufgenommen mit dem Oberflächenprofilometer. Es konnte keine exakte Höhe bestimmt werden.

Aus Abb. 62 ist die Struktur der Kavitätenwände zu erkennen. Die Kavitäten haben gerade Wände. Dies ist von Vorteil, da so eine maximale untere Detektionsfläche und damit die maximal mögliche Pixelzahl für die Messungen mit dem Mini-RIfS bereitgestellt wurde. Die Höhe konnte mit dem Oberflächenprofilometer auf Grund von Reflektivitäten nicht bestimmt werden. Die Höhe wurde meachnisch auf $450\text{-}500\ \mu\text{m}$ bestimmt.

Die folgende Zusammenstellung zeigt einen Vergleich zwischen Mikrotiterplatte und Nano-RIfS.

Tabelle 7: Vergleich der Struktur von Mikrotiterplatte und Nano-RIfS

	<i>Mikrotiterplatte</i>	<i>Nano-RIfS</i>
Wells	96	96
Volumen	250 μ l	40 nl
Wells/cm²	1	400

Der statische Kontaktwinkel des aufliegenden Tropfens des ausgewählten Polystyrols wurde mit $85 \pm 1^\circ$ mit dem in Abschnitt 4.3.5 angegebenen Kontakwinkelmessgerätes ermittelt. Dies entspricht den für Polystyrol typischen Kontaktwinkeln. Der relativ hohe Kontaktwinkel des Polystyrols ist auf das unpolare CH-Gerüst des Polystyrols zurückzuführen. Mit diesem Kontaktwinkel ist der Einsatz der Strukturen basierend auf Polystyrol möglich. Die Benetzung der Kavitäten mit Wasser ist möglich und damit ist auch eine Befüllung durchführbar. Mit einer Querkontamination ist auf Grund der hydrophoben Eigenschaft des Materials nicht zu rechnen.

Polystyrol ist instabil gegenüber einigen Lösungsmitteln, wie DMF und DMSO. Gegenüber Wasser ist es dagegen nahezu dauerhaft beständig. Um eine homogene Beschichtung der Transducer zu gewährleisten, erfolgte die Immobilisierung der biologischen Rezeptorschicht vor dem Aufbringen der Kavitäten auf den Chip. Deswegen ist eine Beständigkeit des Kavitätenmaterials gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht notwendig. Gegenüber dem Regenerationsmittel HCl ist Polystyrol beständig, so dass der Peptidchip außerhalb des RIfS-Gerätes regeneriert werden kann.

Das Eintropfen in die Kavitäten mit Hilfe des TopSpots verdeutlicht die Abb. 63.

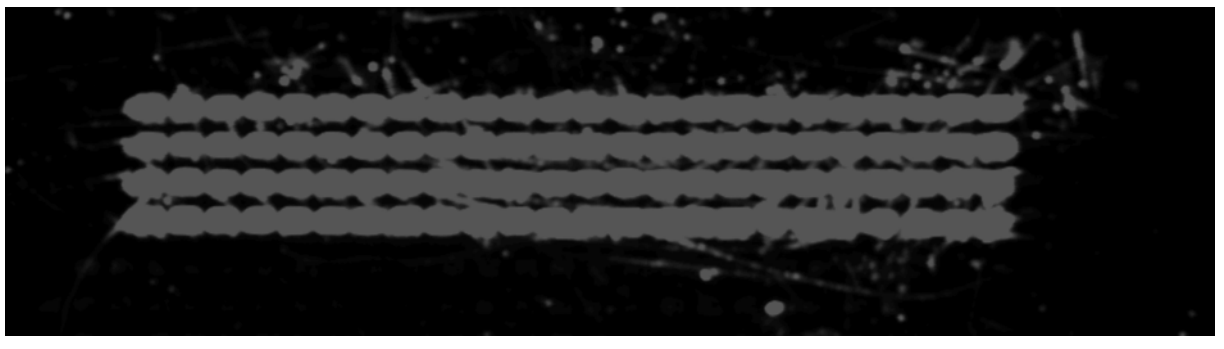


Abbildung 63: Befüllung der Löcher mit dem Topspot, hier zwecks Sichtbarkeit Fluoreszenzlösung,

Aus Abb. 63 wird ersichtlich, dass der TopSpot die Löcher exakt befüllt und auch auf Grund der Hydrophobizität keine Lösung über die Wände tritt, so dass Querkontamination ausgeschlossen werden kann.

Vor der eigentlichen Messung noch einige Vorüberlegungen zur Messung in Nanokavitäten:

In [Schütz_2000] wird eine Wurzelanpassung von mit dem Demonstrator null aufgenommenen Bindungskurven nach dem 2. Fickschen Gesetz mit der folgenden Formel vorgenommen:

$$S_t = A\sqrt{t} + S_0 \quad (38)$$

mit S_t = Signal zum Zeitpunkt t , S_0 = Signal zum Zeitpunkt $t=0$ und A als Proportionalitätsfaktor.

Die Kurven, die mit dem Nano-RIfS gemessen wurden, lassen sich nicht mehr nach diesem Modell anpassen. Dazu gibt es zwei Gründe:

Die Berechnung der Approximation bei der Lösung der homogenen Gleichung zweiter Ordnung geht im Wesentlichen von drei Bedingungen aus:

Anfangsbedingung: homogene Verteilung der Lösung in der gesamten Kavität ($C_{R(x,t=0)}=C_{R0}$)

1. Randbedingung: die Rezeptorkonzentration am oberen Ende der Flüssigkeitssäule (siehe Abb. 12) bleibt während der gesamten Messung konstant.

2. Randbedingung: auf der Oberfläche des Transducers bindet jeder Rezeptor sofort an den immobilisierten Liganden, so dass die Rezeptorkonzentration in der Lösung am unteren Rand der Flüssigkeitssäule während der gesamten Messung null ist.

Mit Hilfe dieser Randbedingungen lässt sich die Diffusionsgleichung des 2. Fickschen Gesetz

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2}, \quad (39)$$

der Rezeptorkonzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt t an einem beliebigen Ort x in der Flüssigkeitssäule über einer Oberfläche mit D als Diffusionskoeffizienten

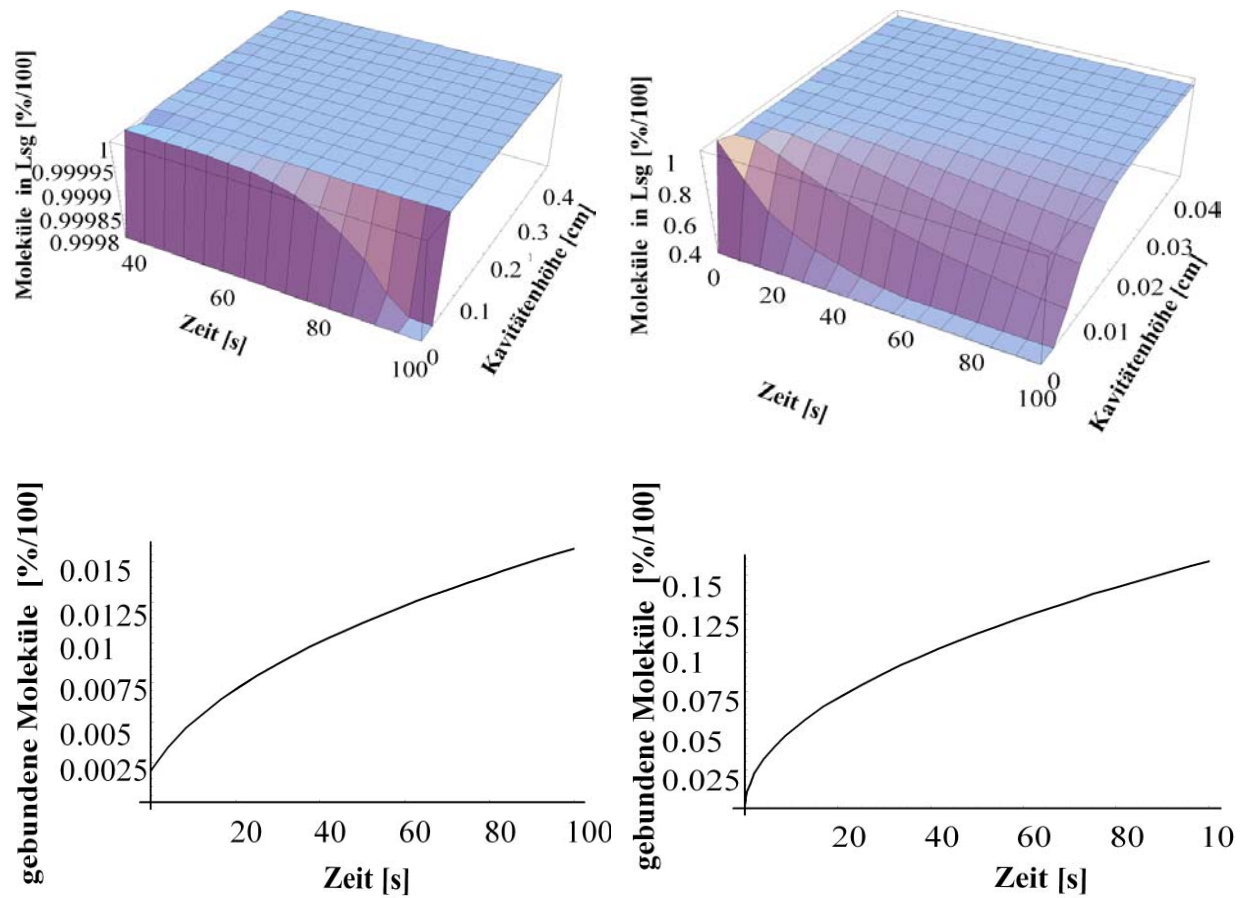
lösen:

$$C_R = \sum_n \frac{4C_{R0}}{(2n-1)\pi} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 D t}{l^2}} \sin \frac{(2n-1)\pi x}{l}, (n \in \mathbb{N}), \quad (40)$$

Diese Berechnungen stimmen mit denen von Eddowes [Eddowes_1988] überein, der nur auf Grund anderer Festlegung der Parameter seiner Flüssigkeitssäule (oben/unten) einen Kosinus statt des Sinus in die Gleichung einführt.

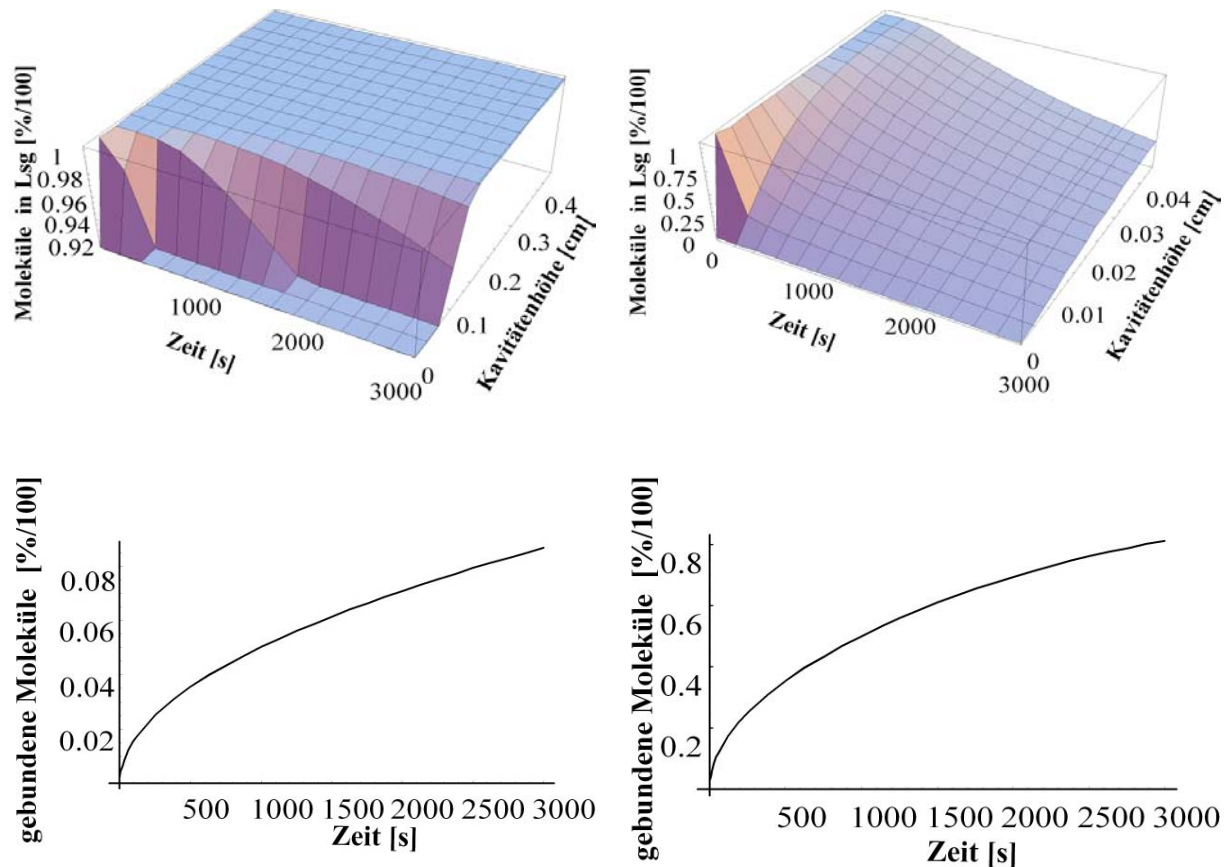
In der Simulation ergeben sich für verschiedene Diffusionsprofile verschiedene Bindungskurven des RIfS-Signals. In Abb. 64 werden die Diffusionsprofile für die Höhen der

Kavitäten vom Demonstrator null und Nano-RiFS gegenübergestellt für den für IgG-Antikörper (MW 150 000 g/mol) mittleren Diffusionskoeffizienten von $D_{IgG} = 4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [Juros_1993].



Demonstrator null $h = 4.5 \text{ mm}$ bei Füllung mit $30 \mu\text{l}$ zu Beginn des Messung nach 100 s

Nano-RiFS $h = 0.45 \text{ mm}$ bei Füllung mit 22 nl zu Beginn der Messung nach 100 s.



Demonstrator null $h = 4.5$ mm bei Füllung mit $30 \mu\text{l}$ zu Beginn des Messung nach 3000 s

Nano-RiFS $h = 0.45$ mm bei Füllung mit 22 nl zu Beginn der Messung nach 3000 s.

Abbildung 64: Simulation der Diffusion von Biomolekülen in Kavitäten, Vergleich Demonstrator zu Nano-RiFS

In Mikrotiterplatten ist die erste Randbedingung bei dieser Lösung des 2. Fickschen Gesetzes während der ganzen Messung erfüllt. Dies ist auf Grund der geringen Höhe beim Nano-RiFS nicht mehr der Fall. Hier kommt es nach 500 s auf Grund der Verschiebung der Diffusionsgrenzschicht in der Flüssigkeitssäule über die eigentliche Höhe der Kavität hinaus zu einer Verarmung der Lösung in der gesamten Kavität. Dies wird in den in Abb. 67 gezeigten Diffusionsprofilen deutlich. Während beim Demonstrator null keine Änderung der Konzentration am oberen Rand der Kavität bei 0.42 cm eintritt, ist die Konzentration am oberen Rand der Kavität nach 3000 s beim Nano-RiFS fast auf null abgesunken.

Die dieser Simulation zu Grunde liegenden Bedingungen stimmen beim Nano-RiFS nicht mehr. In der Anfangsbedingung, der homogene Verteilung der Moleküle in der Flüssigkeitssäule, unterscheiden sich die beiden Systeme voneinander. Während beim

Demonstrator null direkt die gesamte Lösung zugegeben wird und somit eine homogene Verteilung vorliegt, erfolgt die Tropfzugabe beim Nano-RiFS mit Hilfe des TopSpots in mehreren Schritten nacheinander. Die Tropfen vermischen sich auf Grund der geringen Größe der Kavität mit der schon vorhandenen Lösung gut. Aber es kann deshalb noch nicht von einer einfachen homogenen Gleichung zweiter Ordnung ausgegangen werden. Die dynamischen Randbedingungen müssen bei weiteren Messungen beachtet werden.

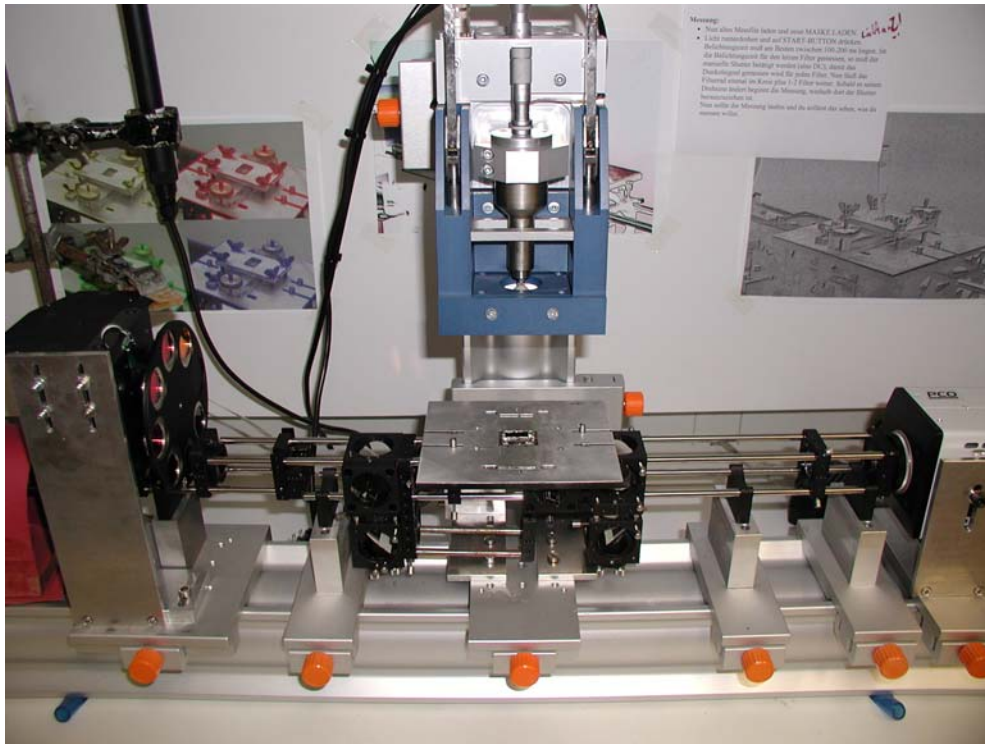


Abbildung 65: Aufbau des Nano-RiFS

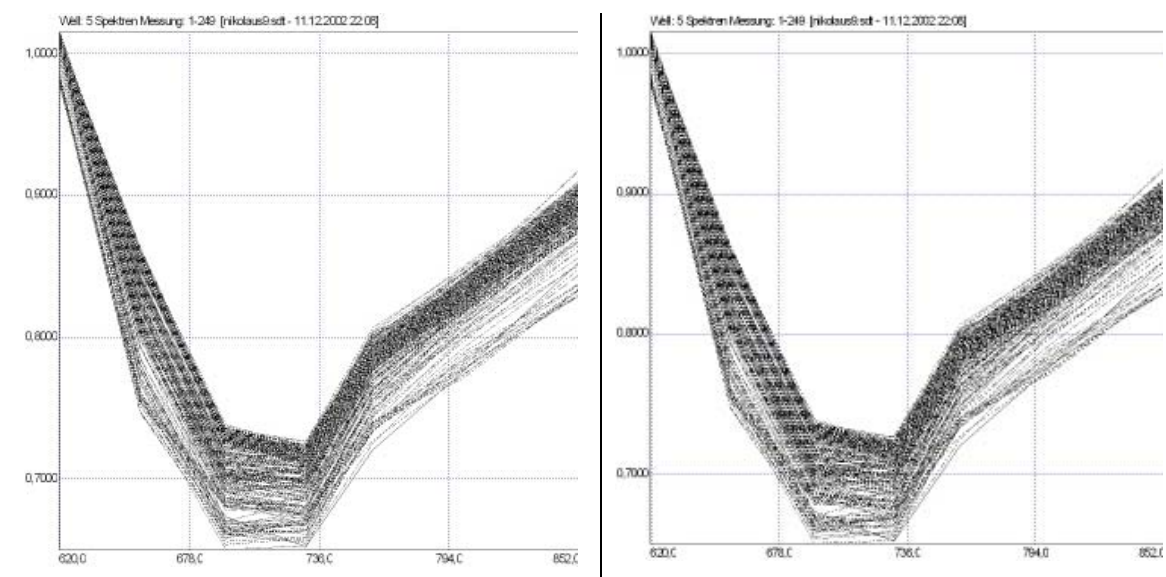


Abbildung 66: Spektren im Mini-RiFS gemessen in den Kavitäten.

Abb. 66 zeigt die Reflexionsspektren gemessen in den Löchern über einen Zeitraum von 3000 Sekunden. Es wurde pro Kavität eine Pixelzahl von durchschnittlich 30 Pixeln verwendet. Die Spektren zeigen, dass keinerlei Störungen durch Reflexion durch den Meniskus der Flüssigkeit in den Kavitäten oder durch das Material erfolgen.

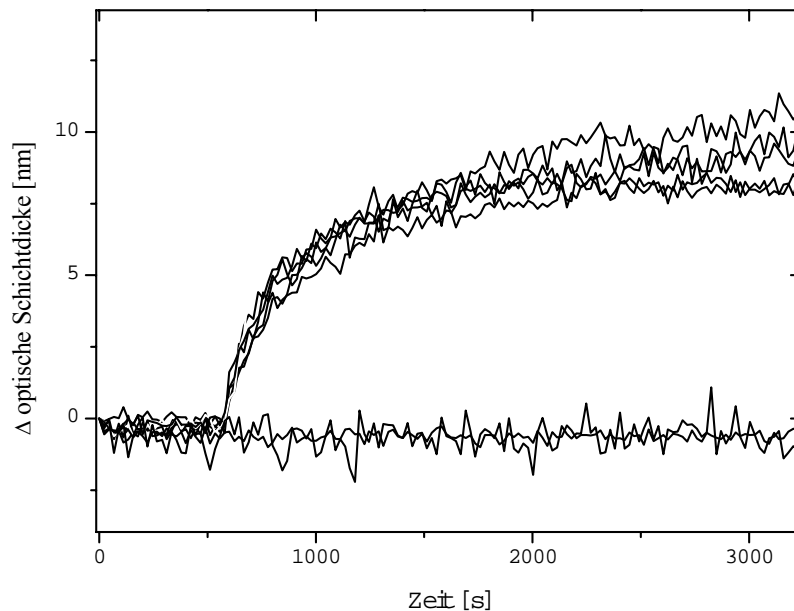


Abbildung 67: Messung von 200 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper, manuelles Tropfen in die Löcher, Bindung des Antikörpers in Kavitäten, die mit Antikörperlösung befüllt wurden. In Kavitäten, die nur mit Puffer befüllt wurden, wurde keine Bindung detektiert.

Zunächst wurde die Antikörperlösung manuell an unterschiedlichen Stellen auf den Chip getropft. Dabei wurde ein ganzflächig mit ACA beschichteter Chip und eine Antikörperlösung der Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Vorgelegt wurde eine PBS-Pufferlösung mit einem Zusatz von Tween 80. Bei der Zugabe ohne TopSpot sind Detergenzien erforderlich, da sonst sich auf Grund der Oberflächenspannung des Wassers ein Wasserfilm über den Kavitäten bildet und die Luft nicht aus den Kavitäten verdrängt werden kann. An einige Stellen auf dem Chip wurde die Antikörperlösung zugegeben. Aus Abb. 67 geht hervor, dass an Stellen mit Antikörperlösung eine Bindung des Antikörpers in den Kavitäten zu beobachten ist, während an Stellen, wo nur Puffer vorlag, nur Baseline gemessen wurde. Damit wurde gezeigt, dass eine Antikörperbindung in den hier entwickelten Kavitäten gemessen werden kann. Unspezifische Bindung liegt nicht vor.

Messungen, bei denen die Antikörperlösung mit Hilfe des Top-Spots zugetropft wurde, zeigt Abb. 68. Hier ist keine Zugabe von Detergenzien erforderlich, da der TopSpot die Löcher genau trifft und sich so kein Wasserfilm bilden kann.

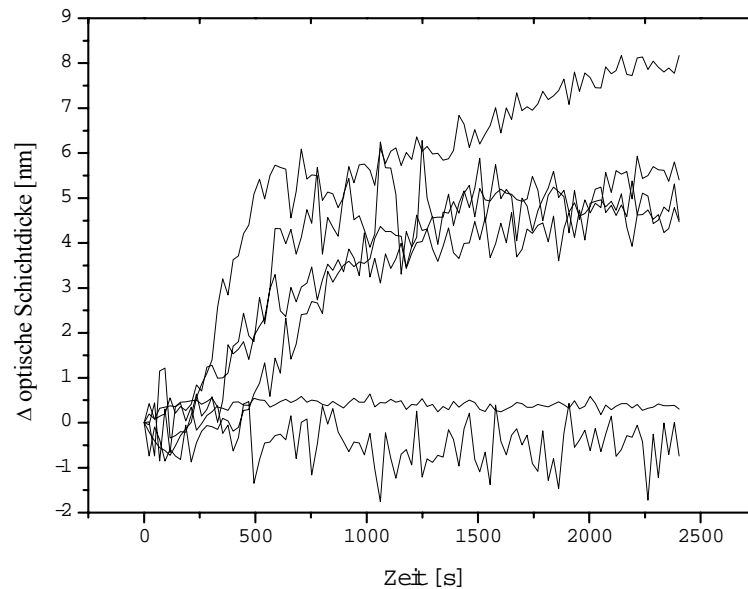


Abbildung 68: Messung der Bindung von Antikörpern an die Oberfläche in Nanokavitäten mit TopSpot

Die Messkurven in Abb. 68 zeigen eine Bindung des Antikörpers an die Oberfläche in den Kavitäten. Bei diesen Messungen konnte nur eine Antikörperkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden, da nur mit dieser Konzentration noch Tropfen mit dem TopSpot erzeugt werden konnten. Eine Bindung des Antikörpers kann beobachtet werden. Die Auswertung bezog sich diesmal auf etwa 20 Pixel pro Kavität, weswegen das Rauschen höher ist, als bei der vorherigen Messung. Das Signal/Rausch-Verhältnis kann durch eine Optimierung der Optik in einem kommerziellen Aufbau erheblich verbessert werden.

Für die exakte Messung in Nano-Kavitäten ist eine Kühlung notwendig, da die Flüssigkeit sonst innerhalb weniger Sekunden verdunstet. Hierzu muss exakt auf 2-3 $^{\circ}\text{C}$ unterhalb des Taupunktes heruntergekühlt werden. Dazu wurde eine integrierte Kühlung entwickelt, mit der die Probenhaltungsplatte mit einem Kryostaten gekühlt werden kann. Ein Temperatursensor wurde in die Probenträgerplatte integriert. Allerdings ist zu erwarten, dass die Temperatur in den Kavitäten geringer ist als die vom Sensor angezeigte. Das Problem liegt im optischen Aufbau des RfS-Systems. Eine Messung ist nur dann möglich, wenn die Kavitäten direkt über dem aus Glas bestehenden Prisma liegen. Zwar kann das Prisma gekühlt werden, allerdings muss auf Grund der schlechten Wärmeübertragung von Glas die Kühltemperatur

drastisch abgesenkt werden. Zudem ist auch der RfS-Objektträger, auf dem sich die Kavitäten befinden, aus Glas. Eine exakte Temperaturmessung ist in den Kavitäten somit sicherlich nicht möglich. Dennoch kann bei entsprechenden Versuchen eine geeignete Kühltemperatur eingestellt werden.

Mit dem Aufbau der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie im Nanoliterplattenformat steht erstmals auch eine Methode zur Verfügung, mit der on-line die Bindung an die Oberfläche in Nanoliterkavitäten beobachtet werden kann. Mit der Möglichkeit der direkten Beobachtung der Bindung in Nanokavitäten kann ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung von Reaktionsverhalten im Nanoliterbereich geleistet werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Assays auf der Basis von Peptiden etabliert. Mit der Entwicklung dieser neuartigen Assaysysteme wurden neue Ansätze beim Einsatz von Biosensoren in der DNA-Analytik, Umweltanalytik sowie der medizinischen Diagnostik erarbeitet.

Auf DNA-Oberflächen konnte die DNA/Peptid-Wechselwirkung mit RIfS analysiert werden. Hintergrund ist die Suche nach Peptidsequenzen, die die Einschleusung von Antisense-Oligonukleotiden in die Zelle verbessern sollten. Dazu mussten Peptidsequenzen mit hoher Affinität zu Oligonukleotiden gefunden werden. Die mit RIfS ermittelte Affinitätsreihenfolge der Peptidsequenzen wurde mit Untersuchungen auf der Basis der Affinitätschromatographie überprüft. Peptidsequenzen mit aromatischen Aminosäuren zeigten erhöhte Bindung zu kurzen DNA-Sequenzen. Auch die Einführung eines zusätzlichen Lysins steigerte die Affinität der Peptidsequenzen zu Oligonukleotiden.

Die DNA-Oberflächen erwiesen sich bei den Untersuchungen der Peptid-DNA-Wechselwirkungen als nicht sehr stabil. Daher sollte die Stabilität der DNA-Oberflächen im Zuge der Entwicklung eines Sensors verbessert werden. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von der in der Antisense-Technologie entwickelten Peptidnukleinsäure (PNA). Dieses Peptid hat eine ähnliche räumliche Struktur wie die DNA, ist aber sehr viel stabiler. In dieser Arbeit wurden Oberflächen auf der Basis der Peptidnukleinsäure etabliert. Diese PNA-Oberflächen sind über mehr als 300 Regenerationsschritte und für mindestens ein halbes Jahr stabil. Die PNA-Oberflächen stehen jetzt für den Einsatz in der DNA-Chiptechnologie zur Verfügung.

Da die PNA ein rein synthetisches Molekül ist, wird sie im Gegensatz zu Oligonukleotiden nicht von Nukleasen angegriffen. Dieser Vorteil wurde in dieser Arbeit für die Entwicklung eines Nuklease-Assays genutzt. An die PNA-Oberfläche wurde eine DNA-Sequenz gebunden, die im verlängerten nicht PNA-komplementären Teil die für die DNA-Analytik interessante Sequenz enthielt. An diese Sequenz konnte Proben-DNA hybridisiert werden. Damit dieser Assay für die Expressionsanalyse eingesetzt werden kann, wurde als Nuklease die Exonuklease III eingesetzt. Es wurde mit einer RIfS/TIRF-Kopplung nachgewiesen, dass Nuklease nur dann schneidet, wenn die Proben-DNA hybridisiert war. Danach wurde die Reaktion mit RIfS hinsichtlich der Konzentration von DNA und Nuklease charakterisiert. Damit konnte der Nukleaseassay im Projekt nanoMAP auf einen Fluoreszenzassay in Nanotiterplatten übertragen werden.

Auf der Basis der nun etablierten PNA-Oberflächen konnte für die Umweltanalytik mit Hilfe der so genannten flexiblen Immobilisierung die Einsatzmöglichkeiten des Wasseranalytatorsystems erweitert werden. Dieses portable RIANA-System arbeitet mit sechs Messpunkten. Es wurden verschiedene DNA-Analytderivat-Konjugate hergestellt. Enthielten diese Konjugate die gleiche DNA-Sequenz aber unterschiedliche Analytderivate, so konnten sequentiell unterschiedliche Analyte durch die Hybridisierung der Konjugate an die immobilisierte PNA am selben Messpunkt detektiert werden. Bei dieser Methode braucht der Transducer bei unterschiedlicher Bestimmung von Analyten nicht aus dem System ausgebaut werden. Mit PNA-Oberflächen, die bis zu sechs Monaten gelagert wurden, konnten drei unterschiedliche endokrine Substanzen quantifiziert werden. Damit wurde die Methode der flexiblen Immobilisierung auf der Basis von PNA-Oberflächen auf dem Multi-Spot-TIRF-Sensor implementiert.

Nachdem stabile Oberflächen auf der Basis anormaler Peptide etabliert wurden, folgte die Entwicklung von stabilen Peptidoberflächen, welche im Weiteren zum Aufbau eines Assays zur Detektion von Antikörpern, welche mit der Autoimmunerkrankung Zöliakie assoziiert werden, herangezogen wurden. Mit dem linearen Epitop der Transglutaminase, das Autoantigen der Zöliakie, wurde ein Epitopmapping durchgeführt. Hier wurden 15mer Peptide eingesetzt, die mit einer Verschiebung von einer Aminosäure das Epitop abdeckten. Für das Epitopmapping wurde die parallele RIfS eingesetzt. In einem Bindungshemmtest konnte die Peptidsequenz mit der höchsten Affinität zum Antikörper gefunden werden. Im Einkanal-RIfS wurden anschließend die Affinitätskonstanten der relevanten Peptidsequenzen bestimmt. Die Ergebnisse der etablierten Einkanal-RIfS stimmten exakt mit den Ergebnissen des parallelen RIfS-System überein. Mit dem im Epitopmapping gefundenen Peptid wurden mit der parallelen RIfS im Blutserum Antikörper detektiert. Im parallelen RIfS-System wurde die reine unspezifische Bindung des Blutserum referenziert. Die Nachweisgrenze für die Messung von Antikörpern in Blutseren lag bei diesem biologischen System mit dem parallelen RIfS bei 1 µg/ml. Damit lassen sich Antikörpertiter von Zöliakiepatienten erfassen. Für erste Messungen von Patientenseren wurde eine Oberfläche auf der Basis der Transglutaminase verwendet. Es konnte eine Unterscheidung zwischen negativen und positiven Seren über die Detektion mit dem parallelen RIfS-System getroffen werden.

Für den Einsatz von Peptidoberflächen für das Screening von Patientenseren müssen viele Peptidsequenzen auf die Bindung von unterschiedlichen Antikörpern im Blutserum getestet werden. Um dies zu ermöglichen, wurde das Nano-RIfS aufgebaut. Ein miniaturisierter optischer Aufbau der RIfS stand für die Detektion zur Verfügung. Dieser wurde für die

Probenhandhabung mit dem TopSpot kombiniert. Es wurden auf der Basis von Polystyrol neuartige Nanowells mit einem Durchmesser von 250 μm und einer Höhe von 500 μm , durch Laserbeschuss hergestellt. Diese wurden mit einem speziellen Kleber auf die RfS-Glasobjektträger geklebt. Mit dem TopSpot wurden die Nanowells, welche ein 96er Array bilden, mit Puffer oder Antikörperlösung befüllt. So konnten Messungen in Nanowells mit der markierungsfreien optischen Messmethode RfS aufgezeigt werden.

Ausblick

Das Potential der in dieser Arbeit etablierten Assaysysteme ist bei Weitem nicht ausgeschöpft. Weitere Ergebnisse mit den entwickelten PNA-Oberflächen sind vor allem für den auf RfS basierenden Gensensor zu erwarten. Die Stabilität des Sensors wird erhöht. Die weiteren Vorteile der PNA, z. B. die bessere Diskriminierung und die Möglichkeit der direkten Detektion von PCR-Produkten, erweitern die Einsatzmöglichkeiten des Gensensors beträchtlich.

Der Nuklease-Assay auf der Basis von PNA-Oberflächen sollte auf die Technologie-Plattform für SNP-Analytik und Expressionsanalyse, welche im Projekt nanoMAP entwickelt wird, übertragen werden. Dadurch können die Oberflächen der Plattform wiederverwendet und die Stabilität und Reproduzierbarkeit der DNA-Analytik erhöht werden.

In der Abwasseranalytik wurde mit der Methode der flexiblen Immobilisierung auf PNA-Oberflächen die Möglichkeit eröffnet, in einem portablen System mehr Analyte als Messpunkte nachzuweisen. Dafür kann der Feldversuch mit dieser Methode bei entsprechender Programmierung des Systems von nicht geschultem Personal durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollten noch andere PNA-Sequenzen und andere Analyte getestet werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die parallele RfS in der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden kann. Zwar lässt sich die unspezifische Bindung des Blutserum herausreferenzieren, jedoch wäre es für die weitere Etablierung des Antikörpernachweises in Blut wünschenswert, andere Oberflächen zu etablieren, die eine geringere unspezifische Bindung bei aber ebenso hoher Bindungskapazität aufweisen. Bei parallelen RfS-Messungen kann eine Verbesserung der Referenzierung durch die Entwicklung einer orts aufgelösten Oberflächenchemie erreicht werden.

Das in dieser Arbeit entwickelte Nano-RfS sollte hinsichtlich der Positionierung des TopSpots und des Signal/Rausch Verhältnisses verbessert werden. Außerdem ist es sinnvoll, das mathematische Modell der Diffusion auf dynamischen Randbedingungen zu erweitern.

Dann kann mit der Nano-RfS einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsverhaltens von Molekülen in Nanoliterkavitäten geleistet werden, da mit dem Nano-RfS erstmals die Möglichkeit der direkten Beobachtung des Bindeverhaltens von Molekülen ohne Markierung in Nanoliterkavitäten gegeben ist.

7 Literaturverzeichnis

- Albers, J.; Bernt, H., Bredehorst, R., Hintsche, R.; Seitz, R. (2000) *Method for the preparation of electronic sensor arrays and their application as electrochemical transducers in DNA chips* International Patent (WO 2000 EP3404).
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1990) *Molekularbiologie der Zelle* zweite Auflage, VCH, Weinheim.
- Applied Biosystems (2002) *Peptide nucleic acid (PNA) user's guide*.
- Azzam R.M.A., Bashara N.M. (1989) *Ellipsometry and polarized light* North Holland Physics Immunol. Rev. 164, 139-155.
- Bach J.F., Koutouzov S., van Endert P.M. (1998) *Are there unique autoantigens triggering autoimmune disease?* Immunological Reviews 164, 139-155.
- Beier M., Hoheisel J.D. (1999) *Versatile derivatization of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips* Nuc. Ac. Res. 27(9), 1970-1977.
- Beier M., Hausch M., Mueller M., Staehler C., Staehler F., Staehler P. (2002) *Geniom technology: the first automated solution for DNA microarrays* PharmaChem. 1(7/8), 6-8.
- Ben-Jonathan N., Steinmetz R. (1989) *Xenoestrogens: The emerging story of Bisphenol A* TEM 9 (3), 124-128 Publishing, Amsterdam.
- BIAcore, Instrumenta (2002) 18 (22).
- Bier F.F., Kleinjung F., Schmidt P.M., Scheller F.W. (2002) *Determination of the turn over number of the restriction endonuclease EcoRI using evanescent wave technology* Anal. and Bioanal. Chem. 372 (2), 308-313.
- Bier F.F., Kleinjung F., Ehrentreich-Förster E., Scheller F.W. (1999) *Changing Functionality of Surface by direct self-assembly using oligonucleotides – The Oligo-Tag* Biotechniques 27,752-760.
- Birkert O. (2001) *Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie* Dissertation Universität Tübingen.
- Bongardt P. (1999) *Synthese und Analyse kurzkettiger Peptid-Oligonukleotid-Konjugate zur Anwendung in der Antisense-Therapie* Dissertation Universität Tübingen.
- Brecht A., Kraus G., Nahm W., Gauglitz G. (1993) *Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layer*, Sens. Actuators B 11, 21-27.

- Brockman J.M., Fernandez S.M. (2001) *Grating-coupled surface plasmon resonance for rapid, label free, array-based sensing* American Laboratory 33 (12), 37-40.
- Budach, W., Abel, A.P., Bruno, A. E.; Neuschäfer, D. (1999) *Planar waveguides as high-performance sensing platforms for fluorescence-based multiplexed oligonucleotide hybridisation assays* Anal. Chem. 71, 3347-3355.
- Bühler B. (2001) *Aufbau und Charakterisierung eines Systems zur Untersuchung intermolekularer Wechselwirkungen mit hohen Ratenkonstanten* Dissertation Universität Tübingen.
- Burbaum J.J., Sigal N.H. (1997) *New technology for high-throughput screening* Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 72-78.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkabeak N.E. (1999) *Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years* Br. Med. J. 305 (1), 609-613.
- Cho, Y. K.; Lim H. K. (2002) *DNA chip for detecting hybridized nucleic acid with improved sensitivity by removing residual non-hybridized single strand probe with nuclease* International Patent WO 0283949.
- Colborn T., Dumanoski D., Myers J.P., (1996) *Die bedrohte Zukunft – Gefährden wir unsere Fruchtbarkeit und Überlebensfähigkeit ?* Droemer Knaur , München.
- Deng H., Apple R., Clare-Salzler M., Trembleau S., Mathis D., Adorini L., Sercarz E. (1993) *Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease* J. Exp. Med. 178, 1675-1680.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M. (1998) *Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening* Environ. Sci. Technol. 32, 1549.
- Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O. Schuppan D. (1997) *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease* Nat. Med. 3, 797–801.
- Dobschal, H.J., Fuchs, W., Gräfe, D., Gauglitz, G., Brecht, A., (1997) *Process and device for detecting physical, chemical, biological or biochemical reactions and interactions* International patent WO 9740366.
- Dove A. (2002) *Antisense and sensibility* Nature Biotechnol. 20(2), 121-124.

- Ducree J., Gruhler H., Hey N., Müller M., Bekesi S., Freygang M., Sandmaier H., Zengerle R. (2000) *TopSpot – a new method for the fabrication of microarrays* Annual Int. Conf. Micro Electro Mechanical Systems, Proceedings, 13th, Miyazaki, Japan 317-322.
- During M. J. Janson C. G. (1999) *PNAs breach the blood-brain barrier?* Nature Biotechnol. 17, 753-754.
- Eddowes M. J. (1987/88) *Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations* Biosensors 3, 1-15.
- Egholm, M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C. Freier, S. M., Driver D A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B., Nielsen P. E. (1993) *PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules* Nature 365, 566-8.
- Einolf H.J., Guengerich F.P. (2000) *Kinetic Analysis of Nucleotide Incorporation by Mammalian DNA Polymerase δ* The Journal of Biological Chemistry 275 (21), 16316-16322.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) *Duplex of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells* Nature 411, 494-498.
- Fägerstam L., Frostell A., Karlsson R., Kullman M., Larson A., Malmquist M. Butt H. (1990) *Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance Application to epitope mapping* J. Mol. Rec. 3, 208.
- Feynman R.P. (1960) Eng. Sci. 23, 22.
- Freudemann T. Brocke v. A., Bayer E. (2001) *On-Line coupling of capillary gel electrophoresis with electrospray mass spectrometry for oligonucleotide analysis* Anal. Chem. 73 (11), 2587-2593.
- Gilbertson M., Kubiak T., Ludwig J., Fox G. (1991) *Great Lakes embryo mortality edema and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease* J. Toxicol. Environ. Health. 33, 455-520.
- Gilles P. N., Wu D. J., Foster C. B., Dillon P. J., Chanock S. J. (1999) *Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips* Nature Biotechnol. 17 (4), 365-70.
- Gimeno S., Gerritsen A., Bowmer T., Komen H. (1996) *Feminization of male carp* Nature 384, 221-222.

- Glaser, R.W. (1993) *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, 153-161.
- Gregory S. G. et al. (2002) *A physical map of the mouse genome* Nature 418, 743-750.
- Haake, H.M. (2000) *Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifischer Detektion in der HPLC mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie* Dissertation Universität Tübingen.
- Hecht E., Siemsen F. (1989) *Optik* Adison-Wesley, Bonn, München.
- Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K. (1992) *Immobilized Affinity Ligand Techniques* Academic Press, San Diego 100–103.
- Hilscherova K., Machala M., Kannan K., Blankenship A.L., Giesy J.P. (2000) *Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples* Environ. Sci.& Pollut. Res. 7 (3), 159-171.
- Hoheisel J. D.; Vingron M. (1999) *DNA chip technology* Biochemica (3), 31-35.
- Invarsson, B. (1998). *Analytical method and apparatus* International Patent WO 9834098.
- Jensen K.K., Orum H., Nielsen P.E., Norden B. (1997) *Kinetics for Hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA Studied with the BIAcore Technique* Biochemistry 36 (16), 5072-5077.
- Johne B., Gadnell M. Hansen K. (1993) *Epitope mapping and binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance* J. Immunol. Methods 160, 191–198.
- Joos T.O., Schrenk M., Höpfl P., Kröger K., Chowdhury, U., Stoll, D., Schorner, D., Dürr, M., Herick, K., Rupp, S., Sohn, K., Hämmerle, H. (2000) *A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics*. Electrophoresis 21, 2641-2650.
- Jung A (2003) *Parallele markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an miniaturisierten Arrays* Dissertation Universität Tübingen.
- Jung G (Hrsg.) (1999) *Combinatorial Chemistry* Wiley-VCH, Weinheim.
- Juroš S., Pučar Z., Pokrić B., (1993) *Quantitative and qualitative characterization of virus envelope proteins and specific polyclonal antibodies* J. Biochem. Biophys. Methods 27 (1), 65-75.

- Karlsson R., Michaelsson A., Mattsson L. (1991) *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor analytical system* J. Immunol. Methods 145, 229-240.
- Kuch H., Ballschmiter K. (1999) *Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden Württembergs* Arbeitsbericht Nr. 151 Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg Stuttgart.
- Klotz A., Brecht A., Barzen C., Gauglitz G., Harris R. D., Quigley G. R., Wilkinson J. S., Abuknesha R. A. (1998) *Immunofluorescence sensor for water analysis* Sens. Actuators B 51, 181-187.
- Krapf R. (2001) *Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen* Dissertation Universität Tübingen.
- Kröger K. (1998) *Hybridisierungskinetiken von DNA und PNA an Oberflächen* Diplomarbeit Universität Braunschweig.
- Kröger K., Jung A., Reder S., Gauglitz G. (2002) *A flexible immobilisation strategy based on PNA-surfaces for quantification of endocrine disruptors* Analytica Chimica Acta 469, 37-48.
- Kröger K., Bauer J., Mülbe F.v.d., Fleckenstein B., Rademann J., Jung G., Gauglitz G. (2002a) *Epitope-mapping of transglutaminase with labelfree detection* Biosens. Bioelectron. 17, 937-994.
- Kröger K., Seidel M., Gauglitz G. (2003) *Optical Spectroscopic Methods in High Throughput Screening* Review in Book of Analytical Methods, in preparation.
- Labodia *Tests serologiques puor la maladie coeliaque* www.Labodia.com.../review_coeliac.
- Länge K. (2000) *Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse in markierungsfreien Bindungsassays* Dissertation Universität Tübingen.
- Laricchia R.L., Uboldib P., Marcovina S., Revoltellaa R.P., Catapano A.L. (2001) *Epitope mapping analysis of apolipoprotein B-100 using surface plamon resonance-based biosensor* Biosens. Bioelectron. 16, 963-969.
- Lemieux B., Aharoni A., Schena M. (1998) *Overview of DNA chip technology* Molecul. Breed. 4, 277-289.

- Liu, S., Cerione, R. A., Clardy, J. (2002) *Structural Basis for the Guanine Nucleotide-Binding Activity of Tissue Transglutaminase and its Regulation of Transamidation Activity* Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99, 2743.
- Livak K.J., Flood D.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995) *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation* PCR Methods Applic. 4, 357-362.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., Sussman, J.L. (1993) *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5076-5080.
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998) *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Marsh M.N. (Editor) (1992) *Mucosal pathology in gluten sensitivity. Coeliac disease* 136-191 Oxford, Blackwell.
- Marsh S. G. (2000) *Nomenclature for factors of the HLA system, update February 2000. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Tissue Antigens* 55 (6), 571-2.
- Matysiak S., Reuthner F., Hoheisel J. D. (2001) *Automating parallel peptide synthesis for the production of PNA library arrays* Biotechniques 31(4), 896-904.
- Mehlmann M. (2003) Dissertation Universität Tübingen in Vorbereitung.
- Mere L., Bennett T., Coassin P., England P., Hamman B., Rink T., Zimmerman S., Negulescu P. (1999) *Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening* Drug Discovery Today 4, 363-369.
- Merrifield, R.B. (1963) *Solid Phase Peptide Synthesis* J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154.
- Molberg O., Mcadam S.N., Korner R., Quarsten H., Kristiansen C., Madsen L, Fugger L., Scott H., Noren O., Roepstorff P., Lundin K.E.A., Sjostrom H., Sollid L.M. (1998) *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease* Nat. Med. 4, 713-717.
- Moll C.D. et al. (1995) *Structure and function of the multifunctional DNA repair enzyme exonuclease III* Nature 374, 381-386.
- Morin P.A., Saiz R., Monjazebe A. (1999) *High throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay* Biotechniques 27, 538-552.

- Mülbe von der F. (2001) *Einfluss der Gewebstransglutaminase auf die Pathogenese der Autoimmunerkrankung Zöliakie* Dissertation Universität Tübingen.
- Nice E., Layton J., Fabri L., Hellman U., Engstrom A., Persson B., Burgess A.W. (1993) *Mapping of the antibody- and receptor-binding domains of granulocyte colony-stimulating factor using an optical biosensor. Comparison with enzyme-linked immunosorbent assay competition studies* J. Chromatogr. 646, 159–168.
- Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R.H., Buchard, O. (1991) *Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide* Science 254, 1497-1500.
- Nielsen, P., Egholm, M., Buchard, O. (1994) *Peptide nucleic acids (pnas). A DNA mimic with peptide backbone* Bioconj. Chem. 5, 3-7.
- Okano K., Kambara H. (1995) *DNA Probe Assay Based on Exonuclease III Digestion of Probes Hybridized in Target DNA* Anal. Biochem. 228, 101-108.
- Piehler J. (1997) *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern* Dissertation Universität Tübingen.
- Piehler J., Brecht A., Giersch T., Hock B., Gauglitz G. (1997a) *Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system* J. Immunol. Meth. 201, 189-206.
- Reder S. (2003) *Multi-Analyt-Bestimmung von endokrinen Disruptoren im Wasser mit Hilfe eines Fluoreszenz-Immunoassays unter Verwendung von neuronalen Netzen* Dissertation Universität Tübingen.
- Richards, F.M. (1990) *Reflections* Meth. in Enzymol. 184, 3-4.
- Robinson W.H. et al. (2002) *Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses* Nature Med. 8 (3), 295-301.
- Rothmund M. (1999) *Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche* Dissertation Universität Tübingen.
- Rothmund M., Schutz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Graefe D. (1997) *Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening* Fresenius J. Anal. Chem. 359, 15-22.

- Sato Y., Fujimoto K., Kawaguchi H. (2003) *Detection of a K-ras point mutation employing peptide nucleic acid at the surface of a SPR biosensor* Coll. Surf. B 27(1), 23-31.
- Sawata S., Kai E., Ikebukuro K., Iida T., Honda T., Karube I. (1999) *Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction* Biosens.Bioelectron. 14(4), 397-404.
- Scheller F., Schubert F. (1989) *Biosensoren* Birkhäuser Verlag Berlin.
- Schmitt H-M., Brecht A., Gauglitz G. (1997) *An integrated System für optical biomolecular interaction analysis* Biosens.Bioelectron. 12 (8), 809-816.
- Schobel U., Egelhaaf H. J., Brecht A., Oelkrug D., Gauglitz G. (1999) *New donor-acceptor pair for fluorecent immunoassay by energy transfer* Biocon. Chem. 10, 1107-1114.
- Schütz A. (2000) *Einsatz der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening* Dissertation Universität Tübingen.
- Schullek JR, Butler JH, Ni ZJ, Chen D., Yuan Z (1997) *A high density screening format for encoded combinatorial libraries: assay miniaturization and its application to enzymic reactions* Anal. Biochem. 246 (1), 20-29.
- Seidel M. (2003) *Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Fluoreszenz-Bioassays basierend auf FRET in Nanoliterkavitäten aus Kunststoff* Dissertation Universität Tübingen.
- Shifman S., Pisante-Shalom A., Yakir B. Darvasi A. (2002) *Quantitative technologies for allele frequency estimation of SNPs in DNA pools* Molec. Cell. Prob. 16(6), 429-434.
- Sjölander S., Urbaniczky C. (1991) *Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis* Anal Chem. 63, 2338-2345.
- Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P. (1999) *Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures* Environ.Sci. Technol. 33, 2841.
- Sollid L.M (2000) *Molecular Basis of Celiac disease* Annu. Rev. Immunol. 18, 53-81.
- Sonnenschein C., Soto A.M. (1998) *An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists* J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 65, 143-150.
- Stemmler I. (1999) *Miniaturisierte Affinitätsanalytik – orts aufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion* Dissertation Universität Tübingen.

- Stevens F.J. (1987) *Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination correction necessary for use with bivalent antibody* Mol. Immunol. 24, 1055-1060.
- Tajima H., Tsujimura K., Yamaguchi M. (2000) *Development of an analytical method of 17 beta-estradiol in river water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry* Bunseki-Kagaku 49 (11), 843.
- Terray A., Oakey J., Marr D.W.M. (2002) *Microfluidic control using colloidal devices* Science (296), 1841-1844.
- Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. (1999) *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications* Pure Appl. Chem. 71 (12), 2333-2348.
- Tomb J.F. et al. (1997) *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori* Nature 388, 539-547.
- Vetter, D., Dickopf S., Schmidt K., (2000) *Set-up of measuring instruments for the parallel readout of SPR sensors* Internatational Patent WO 0031515.
- Vlassov V.V., Vlasso I.E., Pautova L.V. (1997) *Oligonucleotides and polynucleotides as biologically active compounds* Progr. Nucl. Acid Res. 57, 95-143.
- Wang J. (1999) *PNA biosensors for nucleic acid detection* Curr. Issu. Molec. Biol. 1(2), 117-122.
- Wegner G.J., Lee H.J., Corn R.M. (2002) *Charakterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Epitope-Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging* Anal. Chem. 74, 5161-5168.
- Wegner M, Jung A, Hänel C, Gauglitz G (2003) in preparation.
- Wucherpfennig K.W., Strominger J.L. (1995) *Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity. Viral peptides activate human T cell clones specific for MBP* Cell 80, 695-705.
- Zhuang G., Katakura Y., Omasa T., Kishimoto M., Suga K.I. (2001) *Measurement of association rate constant of antibody-antigen interaction in solution based on enzyme-linked immunosorbent assay* J. Bioscie. Bioeng. 92 (4), 330-336.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACA.	Atrazincapronsäure
AMD	Aminodextran
Ag	Antigen
Ag-Ak	Antigen-Antikörper-Komplex
Ak	Antikörper
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	eng. Enzyme linked immunosorbent assay
EMCS	6-Maleinimido-capronsäure-N-succinimidylester
Exo III	Exonuklease III
FRET	Fluoreszenz Resonanter Energie Transfer
Gl.	Gleichung
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
IgG	Immunglobulin G
K	Affinitätskonstante
k_a	Assoziationsratenkonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
λ	Wellenlänge
MTP	Mikrotiterplatte
NHS	N-Hydroxysucciniimid
NTP	Nanotiterplatte
n	Brechungsindex
OVA	Hühner-Ovalbumien
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Kettenreaktion (eng. Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PML	Polymerlichtleiter
PNA	Peptidnukleinsäure (eng. acid)
ppb	parts per billion (entspricht z.B. $\mu\text{g/l}$)
RIANA	River Analyser
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SPR	Oberflächenplasmonen-Resonanz (eng. Surface plasmon resonance)
Tab.	Tabelle
Tab.	Trifluoressigsäure
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
tTgase.	Transglutaminase

8.2 Publikationen

T.O. Joos, M. Schrenk, P- Höpfl, K. Kröger, etc. *A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics* Electrophoresis 21 (2000), 2641-2650.

K. Kröger, A. Jung, S. Reder, G. Gauglitz *A flexible immobilisation strategy based on PNA-surfaces for quantification of endocrine disruptors* Analytica Chimica Acta 469 (2002), 37-48.

K Kröger, J. Bauer, F.v.d. Mülbe, B. Fleckenstein, R.Rademann, G. Jung, G. Gauglitz *Epitope-mapping of transglutaminase with labelfree detection* Biosensors&Bioelectronics 17 (2002), 937-944.

K. Kröger, M. Seidel, G. Gauglitz *Optical Spectroscopic Methods in High Throughput Screening* Review in „Book of Analytical Methods” , accepted.

K. Kröger, G.Gauglitz *Label free HTS with Optical Spectroscopy* Screening-Trends in Drug Discovery 06/2002 (2002), 52-54.

8.3 Akademische Lehrer

H. H. Arnold, E. Bayer[†], F.F. Bier, U. Billitewski, J. Bode, M. Bohnet, H.K. Cammenga, R. Cerff, W. D. Deckwer, G. Gauglitz, P. Grathwohl, L. Fischer, H. Hanert, D. Hempel, V. Hoffmann, U. Hohm, H. Hopf, G. Jung, N. Käufer, B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, H.Liebich, F. Münnich, A. Munack, R. Näveke, E. Riedel, F. Scheller, A. Schumpe, V. Schurig, J. Schwedes, K. D. Vorlop

8.4 Lebenslauf

Name	Kerstin Kröger
Geburtstag	11. Juli 1973
Geburtsort	Friesoythe
Mai 1993	Abitur am Albertus Magnus Gymnasium in Friesoythe
1993-1994	Studium der Biotechnologie an der TU Berlin
1995-1998	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig
Juli-Oktober 1996	Studienarbeit bei Prof. Dr. K. D. Vorlop, Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Technologie Thema: „Charakterisierung verschiedener <i>Klebsiella</i> - und <i>Citrobacter</i> - Stämme und Fermentation immobilisierter Zellen von <i>Klebsiella pneumonia</i> zur 1,3-Propandiol-Produktion“.
März-Oktober 1998	Diplomarbeit in der Gruppe von Dr. F. F. Bier bei Prof. Dr. F. W. Scheller, Institut für Biochemie der Universität Potsdam zum Thema: „Hybridisierungskinetiken von DNA und PNA an Oberflächen“.
21.12.1998	Diplom in Biotechnologie
Januar - Juli 1999	wiss. Angestellte am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut in Reutlingen im Projekt: „Entwicklung Adressierbarer Biochips“.
August 1999-März 2003	Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gauglitz am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Tübingen zum Thema „Entwicklung von Assaysystemen für die parallele Detektion biomolekularer Interaktionen an peptidfunktionalisierten Sensoroberflächen“.
Oktober 1999- März 2003	Stipendiat und Kollegiat im DFG- Graduiertenkolleg „Quantitative Analyse und Charakterisierung pharmazeutischer und biochemisch relevanter Substanzen“