

**Parameteroptimierung für zwei Verfahren zur markierungsfreien
Analyse biomolekularer Wechselwirkungen**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von
Cornelia Hänel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2003

Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Oberhammer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz, für die interessante Aufgabenstellung, seine andauernde Unterstützung meiner Arbeiten und das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und sein Interesse an dieser Arbeit.

Alexander Jung, Martin Mehlmann und Matthias Wegner danke ich für ihre beständige und intensive Arbeit am Computernetzwerk und die stete Bereitschaft, bei Problemen mit Hard- und Software sofort helfend zur Seite zu stehen.

Kerstin Länge und Alexander Jung danke ich für die Hilfe, die Einführung in die Arbeitstechniken, die ständige Bereitschaft, sich allen Fragen anzunehmen und für so manche kritische Diskussion.

Andreas Brecht danke ich für seine Idee zur Gestaltung der Tracermesszellen.

Jochen Mehne danke ich für die Einführung in die Präparation der RIfS-Transducerchips und den Umbau der Spektrometer, sowie die gute Zusammenarbeit.

Goran Markovic danke ich für die zuverlässige und, trotz zahlreicher Rückschläge, unermüdliche Durchführung von Messungen mit dem Young Interferometer.

Herrn Prof. Dr. Brandenburg, Andreas Wikerstål und David Hradestky vom Fraunhofer Institut für physikalische Messtechnik in Freiburg danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung des IBS 101 Interferometers.

Herrn Prof. Höltje und Herrn Thomas Kast des Max-Planck-Institutes Tübingen danke ich für die Überlassung des BIAcore 2000 für einige Messungen.

Der Analytik Jena AG danke ich für die gute Zusammenarbeit und das Vertrauen in die RIfS-Technik.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen, insbesondere der Biogruppe, die mit einer einzigartigen motivierenden und fröhlichen Arbeitsatmosphäre und ständiger Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beitragen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für Unterstützung und ihr stetes Interesse danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Motivation der Arbeit	5
1.2	Zielsetzung und Gliederung.....	8
1.2.1	Zielsetzung	8
1.2.2	Gliederung	9
2	Theoretische Grundlagen	11
2.1	Optische Nachweismethoden	11
2.1.1	Optische Transduktion	11
2.1.1.1	Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie	13
2.1.1.1.1	Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten	14
2.1.1.1.2	Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS)	15
2.1.1.2	Die Oberflächenplasmonenresonanz	18
2.1.1.3	Die Resonant Mirror Technik.....	19
2.1.1.4	Young-Interferometer.....	20
2.1.1.4.1	Wellenleiter und Evanszentfeldtechnik	20
2.1.1.4.2	Bau und Funktion eines Young-Interferometers	21
2.2	Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA).....	25
2.2.1	Aufbau eines Analysengerätes zur BIA	25
2.2.1.1	Probenhandhabung	26
2.2.1.2	Transducer mit sensitiver Oberfläche.....	26
2.2.1.3	Detektion	31
2.2.2	Affinitätsreaktionen an der Oberfläche	32
2.2.3	Ermittlung der Bindungskonstanten.....	34
2.2.3.1	Nach Kinetik pseudo-erster Ordnung.....	34
2.2.3.2	Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten aus der Oberflächenreaktion	37
2.3	Thrombin	41
2.4	G-protein-gekoppelte Rezeptoren.....	43

2.4.1	Das NPY5 - NPY5-Rezeptor System.....	45
3	Materialien und Methoden	47
3.1	Materialien	47
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	47
3.1.2	Lösungen	48
3.1.3	Verwendete Geräte, Aufbauten und Transducer	48
3.1.3.1	RIfS-Setup	49
3.1.3.2	Das SPR-Gerät (BIAcore 2000)	51
3.1.3.3	Das Resonant Mirror Gerät (IASys plus).....	52
3.1.3.4	Das Young-Interferometer (IBS 101).....	53
3.2	Methoden	58
3.2.1	Modifikation der Glastypoberflächen für die RIfS-Detektion	58
3.2.1.1	Reinigung.....	58
3.2.1.2	Silanisierung	58
3.2.1.3	Umsetzung mit einem Spacermolekül.....	58
3.2.1.4	Umpolen der Amino- in Carboxylgruppen.....	59
3.2.1.5	Modifikation der Oberfläche mit einem Liganden.....	59
3.2.1.6	Oberflächenmodifikationen zur Bestimmung kinetischer Konstanten	60
3.2.2	Modifikation der CM5 Chips für das Biacore.....	61
3.2.3	Immobilisierung auf CMD-Küvetten für IASys plus	61
3.2.4	Modifikation der SiO _x N _y -Wellenleiter-Oberflächen für das IBS 101	62
3.2.4.1	Reinigung und Silanisierung.....	62
3.2.4.2	Umsetzung mit DA-PEG	62
3.2.4.3	Immobilisierung von Liganden.....	63
3.2.4.4	Reinigung der Flusszellen.....	63
3.2.5	Kalibrierung der Methode RIfS mittels spezifischer Bindung eines radioaktiv markierten Proteins	64
3.2.5.1	Konstruktion der Stopped-flow-Messzellen	64
3.2.5.2	RIfS-Messungen mit radioaktiv markiertem Protein.....	65

3.2.5.3	Messungen der absoluten Proteinmenge mittels Szintillationszähler	66
3.2.5.4	Bestimmen der benetzten Fläche der Transducer mittels Fluoreszenz.....	66
4	Ergebnisse und Diskussion	68
4.1	Charakterisierung und Weiterentwicklung des IBS 101	68
4.1.1	Allgemeine Parameter	68
4.1.2	Limitierungen durch die Fluidik	71
4.1.3	Schichtpräparation und Limitierungen in der Detektion.....	77
4.1.4	Reproduzierbarkeit spezifischer Bindung	80
4.1.5	Spezifische Bindung von Antikörpern	85
4.1.6	Nachweis spezifischer Bindung kleiner Moleküle.....	87
4.1.7	Zusammenfassung	88
4.2	Vergleich der RfS mit kommerziellen Geräten zur markierungsfreien Detektion.....	91
4.2.1	Fluidik und Probenhandhabung	91
4.2.1.1	Die Fluidik des RfS-Systems	91
4.2.1.2	Die Fluidik des BIAcore 2000.....	94
4.2.1.3	Die Fluidik des IAsys plus	95
4.2.1.4	Zusammenfassung	97
4.2.2	Vergleich von Leistungsparametern.....	98
4.2.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten mit verschiedenen markierungsfreien Detektionsmethoden	99
4.2.3.1	Reproduzierbarkeit der Interaktionsmessungen	100
4.2.3.2	Assoziationsratenkonstanten	102
4.2.3.3	Dissoziationsratenkonstanten	109
4.2.4	Zusammenfassung	110
4.3	Absolute Kalibrierung des RfS Systems mit radioaktiv markierten biologischen Molekülen.....	114
4.3.1	Messung mit radioaktiv markierten Substanzen	114

4.3.2	Korrelation des RIfS-Signals mit der gebundenen Proteinmenge ...	115
4.3.3	Zusammenfassung	118
4.4	Interaktionen von NPY5 mit dem NPY5-Rezeptor mit der RIfS	118
4.4.1	Immobilisierung des NPY5	118
4.4.2	Wechselwirkung des NPY 5 mit dem NPY5-Rezeptor	119
4.4.3	Nachweis der Spezifität der Bindung	120
4.4.4	Zusammenfassung	122
5	Zusammenfassung und Ausblick	123
5.1	Zusammenfassung	123
5.2	Ausblick	127
6	Anhang	129
6.1	Veröffentlichungen	129
6.2	Akademische Lehrer	130
6.3	Lebenslauf	131
7	Literatur	132

1 Einleitung

1.1 *Motivation der Arbeit*

Optische Biosensoren auf der Basis von Oberflächenplasmonenresonanz, Wellenleitern und Prismenkopplern fanden im vergangenen Jahrzehnt breite Anwendung in der Analyse biomolekularer Wechselwirkungen. Diese Sensoren gestatten die Bestimmung von Affinitäten und kinetischen Konstanten einer großen Vielfalt an molekularen Interaktionen in Echtzeit und ohne die Notwendigkeit einer Markierung. Fortschritte in der Geräteentwicklung und im experimentellen Design führten zu einer zunehmenden und breiteren Anwendung von optischen Biosensoren in weiten Gebieten der Wirkstoffsuche, einschließlich der Targetidentifizierung, des „ligand fishing“, der Assayentwicklung, der Auswahl von Leitstrukturen, der Qualitätskontrolle und der „early ADME/Toxicology“ (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion und Toxicology), das heißt frühe Aussagen über z. B. Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit eines potentiellen Wirkstoffs im Organismus.

Gegenwärtig erfordern die meisten Verfahren der Wirkstoffsuche noch eine fluoreszente oder radioaktive Markierung, um die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor zu verfolgen. Dieser Markierungsschritt ist zusätzlich zeit- und kostenintensiv und kann unter Umständen die Wechselwirkung beeinflussen oder aufgrund von Störsignalen (Hintergrund) die Detektion erschweren. Idealerweise sollte ein Biosensor markierungsfrei und hochempfindlich sein, und es sollte die Möglichkeit zur Parallelisierung bestehen, um einen hohen Durchsatz im Screening von Wirkstoffen zu gewährleisten.

Der Beginn der Entwicklung einer solchen markierungsfreien Methode geht bis 1912 zurück, als R.M. Wood das Phänomen anormaler Lichtbrechung an Gittern aufgrund der Anregung von Oberflächenplasmawellen entdeckte [1]. Dieser Effekt wurde später als elektromagnetische „evaneszente“ Welle auf der Oberfläche dünner Metallschichten beschrieben [2]. Letztendlich wurden in den 80er Jahre die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und verwandte Techniken zur Klärung von

Fragestellungen biologischer oder chemische Wechselwirkungen etabliert [3-5]. Diese Technik erlaubt nun zeitaufgelöste und markierungsfreie Wechselwirkungsstudien und somit Bestimmung von Spezifität, Kinetik, Affinität oder Konzentrationen. Seit der Entwicklung des ersten kommerziellen Biosensors in den späten 80er Jahren, dem BIAcore, beschrieben unzählige wissenschaftliche Publikationen die Anwendung optischer Biosensoren in allen Gebieten der pharmazeutischen und diagnostischen Forschung, wie z. B. beim „ligand fishing“ [6-7], in der Bakteriologie [8-10], in der Virologie [11-13], beim Epitop Mapping [14-16], beim Molecular Engineering [17], in der Biotechnologie [18], in der Zellbiologie [19-21], bei der Zelladhäsion [22-23], bei der Signaltransduktion [24-25], bei der Nukleotid-Nukleotid-Bindung [26-29], bei der Nukleotid-Protein-Wechselwirkung [30-31], beim Aufklären von Enzym-Mechanismen [32-33] und vielen anderen Anwendungen. Ebenso beschreiben die zahlreich erschienenen Reviews [34-43] die Bedeutung der Sensoren.

Signifikante Verbesserungen und Weiterentwicklungen der Geräte und des experimentellen Designs gestatten eine immer aufwändigere und detailliertere Analyse. Ein immer vielfältigeres Angebot an Biosensoren ermöglicht verschiedenste Anwendungen bis hin zum Hochdurchsatz-Screening. In Tabelle 1 sind verschiedene Hersteller von optischen Biosensoren aufgelistet.

Hersteller	Internet-Adresse	Technologie
Affinity Sensors	www.affinity-sensors.com	Resonant mirror
Artificial Sensing Instruments	www.microvakuum.com/research/memocs	Wellenleiter
Aviv Instruments	www.avivinst.com	Gitterkoppler SPR
Biacore	www.biacore.com	SPR
Farfield Sensors	www.farfield-sensors.com	Wellenleiter
Graffinity Pharmaceuticals*	www.graffinity.com	SPR
HTS Biosystems	www.htsbiosystems.com	Gitterkoppler SPR
IBIS	www.ibis-spr.nl	SPR
Luna Analytics	www.lunaanalytics.com	Gitterkoppler Faseroptik
Nippon Lasers	www.rieki.com	SPR
Prolinx	www.prolinx.com	SPR
SRU Biosystems	www.srubiosystems.com	Guided-mode resonant filter

*Graffinity Pharmaceuticals verkauft keine Geräte, bietet aber Screening mit ihrem Plasmon Image Array System kommerziell an.

Tabelle 1: Hersteller verschiedener kommerzieller optischer Biosensoren [43]

Die zunehmende Zahl der kommerziell erhältlichen Geräte treibt auch die Entwicklung neuer Sensoroberflächen und Immobilisierungstechniken voran, so dass es vorstellbar ist, nahezu jeden Rezeptor-Ligand-Komplex zu charakterisieren. Ein markierungsfreies System erlaubt eine enorme Flexibilität im Assay-Design, da

Aufwand und Kosten einer Markierung wegfallen und, was noch wichtiger ist, die Wechselwirkung der unveränderten Komponenten erfasst werden kann. Die sowohl akademische als auch industriell motivierte Anwendung hat die Akzeptanz optischer Biosensoren verstärkt und einen gesteigerten Bedarf erzeugt.

1.2 Zielsetzung und Gliederung

1.2.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der nur eingebettet in seine Membran funktionell bleibt, und seinem Liganden zu ermöglichen und mit geeigneten Methoden zu untersuchen. Eine solche Charakterisierung erfolgte mit Biosensoren bisher noch nicht befriedigend, da diese Proteine schwer in eine lösliche Form gebracht werden können, ohne dass sie ihre Funktionalität verlieren. Eine Messung aus der Membranpräparation war mit rein brechungsindexsensitiven Methoden bisher schwer durchführbar. Hierzu sollten nun verschiedene Biosensoren grundsätzlich untersucht und verglichen, und bezüglich ihrer Eignung für die genannte Problemstellung gegenübergestellt werden.

Dabei sollte besonders die Methode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) auf ihre Eignung untersucht und zu diesem Zweck in den Gesamtzusammenhang optischer Biosensoren eingeordnet werden. Eine genaue Analyse der Leistungsparameter sollten im Vergleich zu bereits kommerzialisierten Verfahren eine Einordnung ermöglichen. Auch im Hinblick auf eine mögliche Kommerzialisierung der Methode RIfS sollten anhand höchster Anforderungen, gegeben durch die kinetische Charakterisierung eines Modellsystems, eine vergleichende Analyse gegenüber zweier ausgewählter kommerzialisierter und bekannter Technologien, der SPR und der Resonant-Mirror-Technik, repräsentiert durch das BIAcore 2000 und das IAsys plus, und ein Interferometersystem, das IBS 101 des IPM Freiburg, durchgeführt werden.

Um die Leistungsparameter der RIfS abzuschätzen, sollte eine Signalkalibrierung anhand von spezifischer Bindung radioaktiv markierter Proteine durchgeführt werden.

Um für das IBS 101, ein Prototyp eines Young-Interferometers, reproduzierbare Messungen der Wechselwirkungen von Biomolekülen zu ermöglichen, bestand jedoch zunächst die Notwendigkeit der Entwicklung einer organischen Schichtpräparation für eine reproduzierbare Immobilisierung von Biomolekülen an, welche innerhalb einer Kooperation gemeinsam mit einer Weiterentwicklung der Detektion und der Fluidik zum Bestandteil der Arbeit wurde.

1.2.2 Gliederung

Zunächst werden in einem theoretischen Teil die verschiedenen markierungsfreien optischen Detektionsmethoden vorgestellt und die Grundlagen der hier verwendeten Techniken, insbesondere der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie, diskutiert. Hierbei wird auch auf die Besonderheiten bei der Detektion an einer Phasengrenze hingewiesen. In einem Ergebnisteil wird durch die absolute Kalibrierung der RIfS mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen sowie durch Vergleich der verschiedenen Techniken RIfS, SPR und RM die Tauglichkeit des RIfS-Systems für die biomolekulare Interaktionsanalyse aufgezeigt.

Das Young-Interferometersystem IBS 101 wird hier zum Teil gesondert betrachtet, da es für die Anforderungen eines Vergleiches anfangs nicht geeignet war. Dadurch ergab sich die Möglichkeit einer Kooperation und es wurde hierfür im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Oberflächenpräparation für biomolekulare Anwendungen speziell entwickelt. Der Prototyp wurde hinsichtlich Detektion, Fluidik und Anwendung weiterentwickelt. Die Entwicklung ist hierbei noch nicht abgeschlossen und wird bezüglich Fluidik und Anwendung auf biomolekulare Fragestellungen im IPM Freiburg weitergeführt.

Ein Hauptziel war es nun hier für eine derzeit besonders relevante biologische Problemstellung, die Wechselwirkungscharakterisierung des NPY 5 mit seinem NPY-Rezeptor sollte nun eine geeignete Messmethode gefunden werden. Die hierbei auftretenden Probleme des Verlustes der Funktionalität des Rezeptors bei

einer Charakterisierung der gereinigten Substanz sollten umgangen werden. Eine Messung direkt aus der Membranpräparation ist hierbei von Vorteil, aufgrund des geringen Anteils an Rezeptor aber mit Schwierigkeiten bei der Detektion behaftet. Hierbei gelang es mit der RIfS, diese Problemstellung zu lösen und die besondere Stellung der Methode RIfS innerhalb der markierungsfreien Techniken wurde gezeigt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Optische Nachweismethoden*

Optische Sensoren spielen als Bio- und Chemosensoren nicht nur in der Umweltanalytik [44], sondern auch zunehmend in der Genom- und Proteomforschung sowie in der Diagnostik eine wichtige Rolle. Sie gewinnen daher immer mehr auch kommerzielles Interesse und stehen somit im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsaktivitäten.

Der Messeffekt beruht bei den meisten dieser Chemo- und Biosensoren auf Veränderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften einer dünnen sensitiven Schicht, die durch Sorption in eine Polymerschicht oder durch direkte Wechselwirkung von Molekülen mit den auf der Oberfläche immobilisierten Bindungspartnern hervorgerufen werden. Mit elektrischen [45], elektromechanischen [46] oder optischen Messwandlern [47] kann die Änderung der dielektrischen Funktion oder der Schichtdicke nachgewiesen werden.

Optische Sensoren detektieren Änderungen in der Lichtintensität bzw. im Spektrum, die überwiegend von der Änderung von Brechungsindices oder aber, im Falle von RIfS, von Änderungen in der optischen Schichtdicke (Produkt aus physikalischer Schichtdicke und Brechungsindex) herrühren.

Im Folgenden soll kurz auf optische Detektionsprinzipien eingegangen werden.

2.1.1 **Optische Transduktion**

Direkte optische Detektion nutzt die intrinsischen Eigenschaften der betrachteten Moleküle, wie zum Beispiel Brechungsindex, Absorptionskoeffizient oder Eigenfluoreszenz.

Steht der Analyt in Kontakt mit einer Matrix, kann auch die induzierte Änderung der Matrix nachgewiesen werden. Eine solche indirekte optische Detektion über nicht-intrinsische Eigenschaften, kann zum Beispiel über Markierung des wechselwirkenden Analyten oder die Beeinflussung einer markierten Matrix erfolgen. Eine Markierung, wie z. B. mit Fluoreszenzmarkern, bietet den Vorteil

einer hohen Empfindlichkeit, kann aber die biochemische Aktivität der Biomoleküle selbst beeinflussen. Direkt optische Verfahren vermeiden diese Markierungen und vereinfachen somit den analytischen Prozess und die Komplexität der Reagenzien.

Optische Sensoren können im einfachsten Fall Absorption, Fluoreszenz oder diffuse Reflexion bei einer einzigen Wellenlänge erfassen. Zusätzliche Information wird von einem gesamten Spektrum erhalten. Dies kann durch verschiedene Anordnungen ermöglicht werden [48].

Durch Änderungen in der Phasenbeziehung der Welle oder in der Polarisierung der Strahlung kann bei einer in einem Licht- oder Wellenleiter geführten Welle die Wechselwirkung in der Probe detektiert werden [49-51]. Mit interferometrischen Methoden können bei Beleuchtung der sensitiven Schicht Informationen über die Wechselwirkung mit einem Analyten erhalten werden [52].

Strahlung wird in einem Medium mit hohem Brechungsindex an der Phasengrenze zu einem optisch dünneren unterhalb eines kritischen Winkels totalreflektiert. Eine solche Wellenleitung erzeugt nahe der Oberfläche ein evaneszentes Feld, das in das Medium mit niedrigerem Brechungsindex exponentiell abklingt. Dieses Abklingen des elektrischen Feldes ist abhängig vom Brechungsindex und der Durchlässigkeit [53]. Jede Änderung dieser Eigenschaften ist daher in der Veränderung der Ausbreitung der Strahlung detektierbar. Die Sensitivität bezüglich des Brechungsindex wird zum Beispiel bei Mikrorefraktometern und die Sensitivität bezüglich der Durchlässigkeit bei der Geschwächten Totalreflexion (ATR) [54], [55] genutzt. Auch die Anregung von Fluorophoren nahe der Grenzschicht durch das evaneszente Feld kann zur Detektion dienen, wie etwa bei der Totalen Internen Reflexionsfluoreszenz (TIRF) [56].

Der Polarisationszustand elektromagnetischer Strahlung, bestimmt durch die TE (transversal elektrisch) und die TM (transversal magnetisch) Moden wird in einem planaren Wellenleiter durch die angrenzende Schicht beeinflusst [51], [53], [61]. Beide Moden werden durch den effektiven Brechungsindex definiert, der mit dem

Polarisationszustand variiert [49], [53]. Sie verhalten sich im Wellenleiter unterschiedlich und finden in (Polarisations-) Interferometern Anwendung.

Oberflächenplasmonen, d. h. kollektive Schwingungen des Elektronengases, können auf der Oberfläche eines wellenleitenden Materials angeregt werden. Meist werden die Plasmonen in einer zweiten Grenzschicht (Metall) durch den parallel polarisierten Teil der Strahlung (TM Mode) angeregt und oszillieren in Resonanz mit der Frequenz der anregenden Strahlung [57]. Die Plasmonen werden bei hinreichend dünner Metallschicht an der Grenzfläche zum Analyten hin angeregt und erzeugen, abhängig vom Einfallswinkel und dem Brechungsindex des angrenzenden Mediums, unter Resonanzbedingungen eine Art „Absorptionspeak“ im winkelabhängigen Spektrum der anregenden Strahlung für den reflektierten Strahl.

Bei Modenkopplern können die Moden, bei passenden optischen Bedingungen, über ihr evaneszentes Feld in ein anderes Dielektrikum koppeln. Die Strahlung kann anschließend in einen weiteren Wellenleiter einkoppeln, wie beim Prismenkoppler (Resonant Mirror) [58] oder beim Gitterkoppler [59].

Interferometrische Techniken können die Phasendifferenz der Moden, abhängig vom Brechungsindex nahe der Grenzfläche, nutzen. Hingegen ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie, die das aus dem Gangunterschied resultierende Interferenzmuster der an verschiedenen Grenzflächen reflektierten und überlagerten Teilstrahlen detektiert, zusätzlich abhängig von der physikalischen Schichtdicke der sensitiven Schicht [64].

Im Folgenden soll näher auf die in dieser Arbeit verwendeten optischen Detektionsmethoden eingegangen werden.

2.1.1.1 Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) beruht auf dem Prinzip der Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten, mit deren Hilfe die optische Schichtdicke bestimmt werden kann [60-61]. Bei bekannten Dispersionsverläufen kann daraus auch die physikalische Schichtdicke ermittelt werden. Bereits 1937

wurde von Langmuir und Schäfer Weißlichtinterferenz zur Abschätzung der Dicke dünner Proteinfilme verwendet [62].

Bei der RIfS wird die zeitliche Veränderung im Spektrum des reflektierten Lichts detektiert, die aus einer Veränderung der Dicke eines dünnen Films resultiert.

Dadurch kann zum Beispiel das Quellen von Polymerfilmen während der Sorption von Stoffen oder die Wechselwirkung von Biomolekülen mit ihren immobilisierten Bindungspartnern in Submonolagen untersucht werden.

Im Gegensatz zu den ausschließlich berechnungsindexsensitiven Methoden wie Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) oder Resonant Mirror (RM) wird hierbei die optische Schichtdicke bestimmt, also das Produkt aus Brechungsindex n und physikalischer Schichtdicke d . Dadurch ist die Methode weniger anfällig gegen Schwankungen im Brechungsindex des Trägerstroms, z. B. bei Wechsel des Puffers, und gegen Temperaturschwankungen in der Umgebung, d. h. sie kommt ohne aufwändige Temperaturstabilisierung aus. Eine genauere Beschreibung der Grundlagen der Technik ist im Folgenden gegeben.

2.1.1.1.1 Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten

Fällt ein Lichtstrahl unter einem bestimmten Einfallswinkel θ_i auf eine ebene Grenzfläche, tritt er teilweise unter Brechung in das zweite Medium ein (Transmission unter dem Winkel θ_t) und zum anderen Teil wird er unter dem Winkel θ_r reflektiert, wie in Abbildung 1 dargestellt ist. Für die Transmission gilt das Snelliussche Brechungsgesetz $n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t$ und für die Reflexion gilt $\theta_r = \theta_i$.

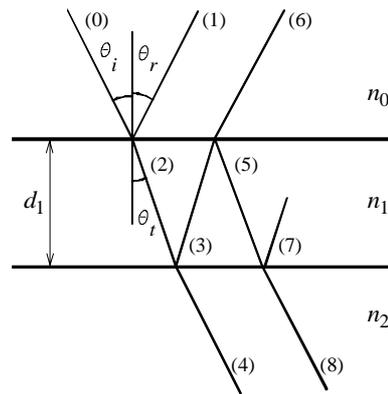


Abbildung 1: Mehrfachreflexion an einer planparallelen Schicht

Der einfallende Strahl (0) wird zu einem Teil an der Phasengrenze reflektiert (1) und zum anderen Teil gebrochen (2), wobei in diesem Fall $n_0 < n_1$ gewählt wurde. Der gebrochene Strahl wird an der zweiten Phasengrenze ($n_1 > n_2$) erneut reflektiert (3) und nochmals gebrochen (4). Der reflektierte Strahl (3) wird wiederum an der ersten Phasengrenze reflektiert (5) und gebrochen (6). Strahl (1) und (6) können nun interferieren [63-64].

Aus der Überlagerung von elektromagnetischen Wellen ergibt sich, bei Erfüllung der Kohärenzbedingung, ein Interferenzspektrum. Bei weißem Licht, das aus sehr vielen unterschiedlichen, nicht miteinander korrelierten Wellenzügen besteht, deren Phasenbeziehung rasch wechselt, ist die Kohärenzlänge sehr klein. Beim Überlagern zweier Teilstrahlen, wie in Abbildung 2 (1) und (6), erhält man nur dann ein Interferenzmuster, wenn die Schicht hinreichend dünn ist und der Gangunterschied im Bereich der Kohärenzlänge liegt. Die Detektion erfolgt dann wellenlängenaufgelöst.

2.1.1.1.2 Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS)

Das Prinzip der Detektion bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie beruht auf der zuvor beschriebenen Mehrfachreflexion an dünnen Schichten. Die Messung erfolgt bei senkrechtem Lichteinfall, das bedeutet, der Lichtweg entspricht der zweifachen Schichtdicke d_1 .

Je nach Schichtdicke kommt es dabei zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Teilstrahlen. Bei senkrechtem Strahlungseinfall auf eine Schicht gilt für die Phasenverschiebung:

$$\delta = \frac{2\pi nd}{\lambda} \quad (1)$$

wobei n_1 der Brechungsindex und d_1 die Dicke der Schicht ist.

Bedingung für das Auftreten von Extrema m der Intensität ist:

$$\frac{2nd}{\lambda} = m \quad (2)$$

$$m_{max} = 1, 2, 3, \dots$$

$$m_{min} = 1/2, 3/2, 5/2, \dots$$

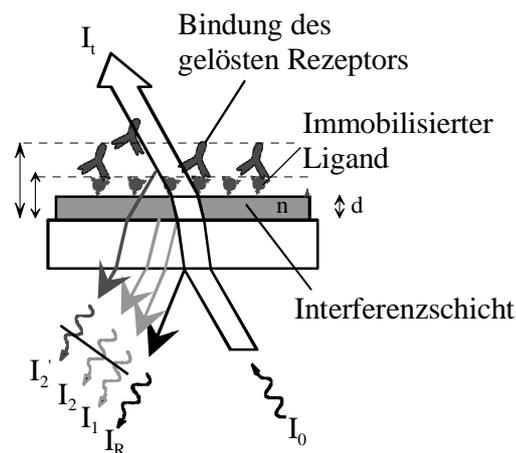


Abbildung 2: Reflexion und Interferenz an dünnen Schichten

Bei Interferenz der reflektierten Strahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2 , wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, gilt für die resultierende Intensität bei senkrechtem Einfall (Gleichung 3).

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi nd}{\lambda}\right) \quad (3)$$

Da bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie die optische Schichtdicke aus dem gemessenen Reflexionsspektrum ermittelt wird, muß die Ordnungszahl m mindestens eines Extremums bekannt sein. Für benachbarte Extremwerte weist m

einen Unterschied von 0.5 auf. Damit kann die Ordnungszahl eines Extremums aus der Lage zweier Extrema und der Differenz ihrer Ordnungszahlen berechnet werden. Mit der Lage der Extrema λ_1 und λ_2 , sowie der Differenz der Ordnungszahlen $m_1 - m_2 = \Delta m$ ergibt sich für m_1

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (4)$$

Dies gilt uneingeschränkt nur für „dispersionsfreie“ Systeme (Dispersion = Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex) [64], [65].

Die optische Schichtdicke selbst wird aus dem Interferogramm durch Polynomanpassung an den Kurvenverlauf eines Extremums bekannter Ordnung ermittelt, wie in Abbildung 3 demonstriert. Die Auflösung bei derartiger Detektion der Schichtdickenänderung beträgt ca. 1 pm, d. h. etwa 1/1000 einer Proteinmonolage.

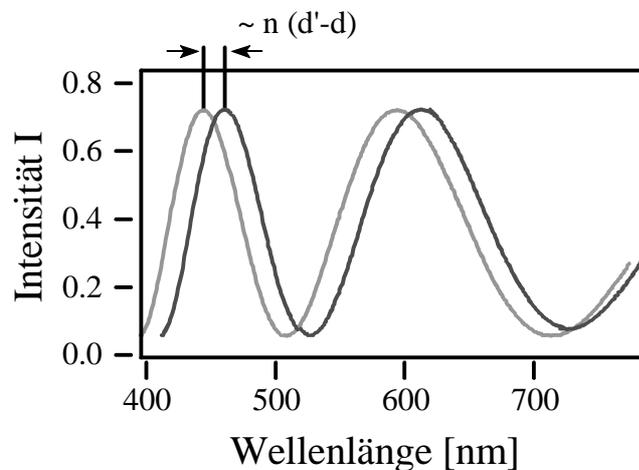


Abbildung 3: Verschiebung der Extremwerte bei einer Änderung der optischen Schichtdicke nd

Bei der zeitaufgelösten Detektion der Änderung der optischen Schichtdicke während der Oberflächenreaktion sollten Schicht und Adsorbens einen ähnlichen Brechungsindex haben, sich aber vom Lösungsmittel unterscheiden.

Als Referenz wird das von einem Glasplättchen ohne Interferenzschicht reflektierte Licht benutzt. Die Änderung der physikalischen Schichtdicke d oder des

Brechungsindex n verursacht eine Änderung der Phasenverschiebung $\Delta\delta$ der interferierenden Strahlen. Die so gemessene Intensität $I_{mess}(\lambda)$ kann nun mit der Referenzintensität $I_{ref}(\lambda)$ und der auf dem Dunkelstrom des Spektrometers beruhenden „Intensität“ $I_d(\lambda)$ korrigiert werden

$$I_{korr}(\lambda) = \frac{I_{mess}(\lambda) - I_d(\lambda)}{I_{ref}(\lambda) - I_d(\lambda)} \quad (5)$$

Der sogenannte Nutzsignalanteil NA wird aus dem korrigierten Spektrum errechnet, wobei I_{max} und I_{min} die Extrema der korrigierten Intensität sind.

$$I_N = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} \quad (6)$$

2.1.1.2 Die Oberflächenplasmonenresonanz

Das Phänomen anormaler Lichtbrechung an Gittern aufgrund der Anregung von Oberflächenplasmawellen wurde zum ersten Mal zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Wood [66] beschrieben. Die Oberflächenplasmonenresonanz oder englisch Surface Plasmon Resonance (SPR) wurde allerdings erst in den 60er Jahren von Ritchie theoretisch beschrieben und erklärt [67], obwohl sie sich schon durch die Theorien von Fresnel und Maxwell hätte ableiten lassen. In den späten 60er Jahren wurde die Anregung von Oberflächenplasmonen durch geschwächte Totalreflexion von Kretschmann [68] und Otto [69] demonstriert. 1982 wurde SPR für die Detektion in der Gasphase und für biochemische Interaktionen von Nylander und Liedberg angewandt [70-72].

Oberflächenplasmonen sind als Quanten kollektiver Schwingungen des Elektronengases, d. h. Oszillationen der Ladungsdichte, an der Grenzfläche eines Metalls und eines Dielektrikums aufzufassen. Verbunden damit ist das Auftreten eines elektrischen Feldes, das als Evaneszentfeld bezeichnet wird. Auf das Evaneszentfeld wird in Kap. 2.1.1.4.1 näher eingegangen.

Durch das evaneszente Feld kann es zur Impulsübertragung vom einfallenden Licht auf den Impuls der entstehenden Oberflächenplasmonen kommen. Die

Oberflächenplasmawelle ist eine TM-polarisierte Welle, d. h. der magnetische Feldvektor steht senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Oberflächenwelle und parallel zur optischen Ebene auf der Grenzfläche.

Beim am häufigsten gebrauchten Aufbau, dem Kretschmannaufbau, wird parallel polarisiertes Weißlicht unter einem konstanten Winkel unter Bedingungen der Totalreflexion auf ein mit z. B. Gold bedampftes Prisma eingestrahlt [73]. Durch das evaneszente Feld des totalreflektierten Lichts können auf der Metallfläche eines Prismas Oberflächenplasmonen angeregt werden, wobei das Evaneszentfeld der Oberflächenwelle in das an der Grenzfläche zum Metall befindliche Dielektrikum eindringt, woraus eine Abhängigkeit der Resonanzwellenlänge auch von der Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums auf der Metallschicht folgt. Es wird die Resonanzwellenlänge im reflektierten Licht detektiert.

Eine Übersicht der verschiedenen Oberflächenplasmonen-Sensoren ist in [34] gegeben.

2.1.1.3 Die Resonant Mirror Technik

Der Resonant Mirror, ein Vertreter des Prismenkopplers, ist in seiner Konstruktion ähnlich dem SPR-Sensor [58]. Licht wird mittels eines Prismas an der Sensoroberfläche intern totalreflektiert. Im Gegensatz zum SPR befindet sich auf der Oberfläche statt einer Metallschicht eine dielektrische Resonanzschicht mit hohem Brechungsindex (wie zum Beispiel Titandioxid) von etwa 100 nm Dicke. Diese ist vom Prisma durch eine Schicht mit niedrigem Brechungsindex (wie zum Beispiel durch Siliziumdioxid) getrennt. Die Dicke dieser Schicht beträgt typischerweise etwa 1 μm , ist also hinreichend dünn, um Licht über ein evaneszentes Feld in die Resonanzschicht koppeln zu lassen. Eine effiziente Kopplung wird nur für bestimmte Einstrahlwinkel erreicht, bei denen die Phasen von einfallendem Strahl und resonanten Moden der hochbrechenden Schicht korrelieren. Am Resonanzpunkt koppelt Licht in die Schicht mit hohem Brechungsindex, breitet sich über eine bestimmte Strecke entlang der sensitiven Grenzfläche aus und koppelt wieder in das Prisma ein.

Der Anregungswinkel ist sehr empfindlich gegenüber kleinsten Änderungen des Brechungsindex. Somit können Reaktionen an der Oberfläche über die Verschiebung dieses Anregungswinkels erfasst werden. Im Gegensatz zur SPR, bei der ein „Dip“ in der reflektierten Intensität des Lichtes sichtbar wird, sobald Licht in der Metallschicht absorbiert wird, reflektiert der Resonant Mirror bei jedem Einfallswinkel, jedoch verschiebt sich die Phase des reflektierten Lichtes bei Resonanz.

Die Phasenverschiebung des reflektierten Lichtes mit dem Einfallswinkel wird mit Hilfe von Standard-Matrix-Methoden für Mehrschichtsysteme berechnet [50].

Normalerweise wird die Phasendifferenz in optischen Instrumenten interferometrisch bestimmt. Der Referenzstrahl sollte hierbei idealerweise dem Messstrahl so nahe sein, dass andere phasenverschiebende Einflüsse, wie z. B. Temperaturänderungen, beide Strahlen gleich betreffen und sich somit aufheben. Beim Resonant Mirror sind die Resonanzen für die beiden Moden TM und TE weitgehend separiert, so dass jede als Referenz für die andere dienen kann.

2.1.1.4 Young-Interferometer

2.1.1.4.1 Wellenleiter und Evanszentfeldtechnik

Die Technik des Young-Interferometers gehört zu den integriert optischen Methoden, die sich der Wellenleitertechnik bedienen, um optische Signale zur Detektion für Biosensoren zu nutzen. Auch hier werden optisch transparente Medien unterschiedlicher Brechungsindizes genutzt, um das Licht im Innern durch wiederholte innere Totalreflexion zu führen.

Die gängigen Dimensionen der Wellenleiterstrukturen liegen in einem Bereich von $0,1 \mu\text{m}$ bis einigen μm , d. h. von Bruchteilen von Wellenlängen bis hin zu einem Vielfachen.

Die mathematische Beschreibung ist den Methoden der Resonatoroptik verwandt. Es werden stationäre Lösungen der Wellengleichungen gesucht, die Lösungen der Eigenwertgleichungen (Eigenwerte) werden als Moden bezeichnet. Die Anzahl der

Moden hängt von den Dimensionen des Wellenleiters im Vergleich zur Wellenlänge und von den Brechungsindexprofilen ab. Besitzt ein Wellenleiter nur eine Lösung, so wird er als monomodig bezeichnet und für interferometrische Sensoren bevorzugt [56]. Besitzt ein Wellenleiter mehrere Eigenlösungen, so wird er als multimodig bezeichnet (Wellenleiterdimensionen von einigen bis einigen hundert μm). Bei Wellenleiter-Dimensionen, die sehr viel größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind, spricht man von „bulkoptischen“ Wellenleitern.

Allen Wellenleitertypen ist gemeinsam, dass das elektromagnetische Feld der geführten Welle an unstetigen Brechungsindexsprüngen nicht abrupt auf null abfällt, sondern exponentiell in das Umgebungsmedium abklingt, was aus den Stetigkeitsbedingungen bei Totalreflexion vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium folgt [56]. Dieser Feldanteil wird Evaneszentfeld genannt und ist ein Teil der Modenstruktur des Wellenleiters. Er trägt einen Teil der geführten Lichtleistung und besitzt Eindringtiefen, die kleiner als die Lichtwellenlänge sind. Dies nutzt man in der Evaneszentfeldsensorik aus. Beim Young-Interferometer detektiert man die Änderung der Modenstruktur aufgrund von Änderungen im Brechungsindex des Umgebungsmediums. Die geringe Eindringtiefe des Evaneszentfeldes führt zu einem sehr sensitiven Oberflächennachweisverfahren und verhindert Störeffekte aus dem Volumen [74].

2.1.1.4.2 Bau und Funktion eines Young-Interferometers

Ein integriert-optischer Y-verzweigter Wellenleiter ist die Hauptkomponente des Young-Interferometers [75], [76]. Er fungiert nicht nur als Strahlteiler, sondern auch als Sensorkopf. Auf der Oberfläche hinter der Verzweigung befinden sich die sensitive Region und der Referenzkanal. Der sensitive Zweig ist so modifiziert, dass hier die biochemischen Reaktionen stattfinden können, während der Referenzkanal zumeist unmodifiziert bleibt.

Licht wird in den Wellenleiter über die Stirnfläche eingekoppelt. Am Ende der planaren Struktur werden die Strahlen in Form zweier Kegel emittiert, welche

interferieren und ein typisches Interferenzmuster ergeben. Die Intensitätsverteilung (Spektrum) wird dann mit Hilfe eines eindimensionalen Detektorarrays detektiert (Abbildung 4). Durch beispielsweise Adsorption von Molekülen an einen der beiden Wellenleiter wird dieses Muster verschoben.

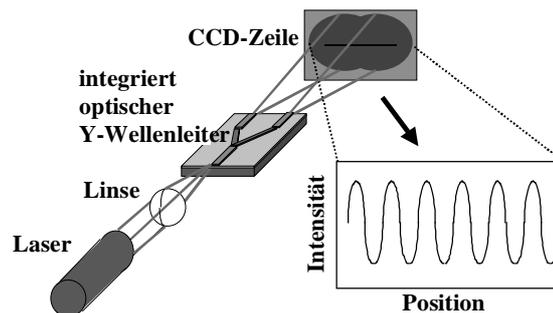


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines integrierten optischen Young Interferometers (IPM, Freiburg)

Die Empfindlichkeit des Sensors wird limitiert durch die Abschätzung der Änderung des effektiven Brechungsindex durch Ermitteln der Verschiebung des Interferenzmusters [77].

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in der einfachen Anordnung, der Detektion der gesamten Intensitätsverteilung und in der Tatsache, dass die optische Weglänge der beiden Wellenleiter-Äste gleich lang ist, eine wichtige Voraussetzung für die Kompensation von Wellenlängen- und Temperaturfluktuationen.

Die Sensorwirkung ergibt sich aus der Änderung des Brechungsindex, die in der geführten Mode in einer dünnen Schicht auf der Oberfläche des Wellenleiters durch die Berechnung der resultierenden Verschiebung des Interferenzmusters ermittelt wird.

Ein Modell zur Bestimmung der Sensitivität der Evaneszenzfeldmethode für Schichtwellenleiter ist beschrieben in [78]. Die theoretische Abhandlung geht von der folgenden Gleichung [79] aus:

$$2kt_f (n_f^2 - n_{eff}^2)^{1/2} + \varphi_0 + \varphi_s = 2\pi m \quad (7)$$

wobei $k=2\pi/\lambda$ die Wellenzahl und t_f die Dicke der wellenleitenden Schicht beschreibt. n_f steht für den Brechungsindex des Wellenleiters, n_{eff} für den effektiven Brechungsindex und m für den Modenindex. Der effektive Brechungsindex n_{eff} wird von der zusätzlichen Deckschicht auf dem Wellenleiter und dem Umgebungsmedium beeinflusst und resultiert aus der Phasenverschiebung, der die Welle bei Totalreflektion an den Grenzen unterliegt. Bei nicht-porösen wellenleitenden Schichten mit konstantem Brechungsindex gibt es zwei Möglichkeiten zur Änderung des effektiven Brechungsindexes n_{eff} . Einmal kann sich eine zusätzliche Schicht an der Wellenleiteroberfläche durch Adsorption oder Bindung von Molekülen herausbilden, welche dann als homogen mit einer bestimmten Dicke t_{ad} und Brechungsindex n_{ad} angenommen wird. Zum zweiten kann sich der Brechungsindex n_c des Umgebungsmediums, das den Wellenleiter umgibt, ändern, etwa durch Aufnahme einer Probe auf die Oberfläche des Sensors. Zur theoretischen Abschätzung der Empfindlichkeit des Sensors dient die Oberflächenbeladung Γ als Maß für die adsorbierte Masse pro Flächeneinheit. Die Korrelation zwischen der Oberflächenbeladung Γ und der Schichtdicke t_{ad} der zusätzlichen Schicht ergibt sich zu:

$$\Gamma = \frac{n_{ad} - n_c}{dn_{ad} / dc} \cdot t_{ad} \quad (8)$$

Da der Brechungsindex einer adsorbierten Schicht n_{ad} linear mit der Proteinkonzentration korreliert [80] ergibt sich:

$$dn_{ad} / dc = 0,188 \text{ ml / g} \quad (9)$$

Mit

$$\Delta\Gamma = (d\Gamma/dt_{ad}) \cdot (dt_{ad}/dn_{eff}) \cdot \Delta n_{eff} \quad (10)$$

kann die Änderung der Oberflächenbeladung direkt aus der Änderung des gemessenen effektiven Brechungsindex Δn_{eff} bestimmt werden. Bei Annahme von $n_{ad} = 1,45$ und $n_c = 1,33$ für Wasser folgt aus Gleichung 8 und 9:

$$d\Gamma/dt_{ad} = 6,38 \cdot 10^{-4} \text{ g/mm}^3$$

Mit $n_f = 1,57$ für die TE-Polarisation ($d_{ad}/d_{neff} = 0,013 \text{ mm}$) ist

$$d\Gamma/n_{eff} = 8,29 \cdot 10^{-6} \text{ g/mm}^2 .$$

Dieser Wert ist vom Brechungsindex der adsorbierten Schicht unabhängig. Damit korreliert also eine Signaländerung um $1 n_{eff}$ mit einer Änderung der Oberflächenkonzentration von $8,29 \text{ ng/mm}^2$ [76]. Eine Bestätigung dieser theoretischen Berechnungen durch eine Kalibration über radioaktiv markierte Binder erfolgte bisher noch nicht.

Bisherige Messungen mit dem IBS 101 zeigten die Bindung eines Proteins an seinen nur adsorptiv immobilisierten Bindungspartner. Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar.

2.2 Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)

Der Begriff Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) wurde vor einigen Jahren von der schwedischen Firma *Pharmacia Biosensors of Sweden* (jetzt *Biacore AB*) geprägt. Er bezeichnet die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen biologisch relevanten Stoffen, wie zum Beispiel zwischen Antigen-Antikörper, Rezeptor-Ligand, DNA-DNA und DNA-Protein.

Obwohl die Erforschung biomolekularer Wechselwirkungen nicht erst zu diesem Zeitpunkt begann, wurde nun erstmals ein kommerziell erhältliches, auf Sensoren basierendes Gerät vorgestellt, das nicht von speziellen molekularen Eigenschaften, wie UV-Absorption, intrinsischer Fluoreszenz, biokatalytischer Aktivität oder Schmelzpunkt abhängig war. Dies machte die Methode universell anwendbar.

Der wesentliche Vorteil der BIA ist die Möglichkeit des markierungsfreien und zeitaufgelösten Beobachtens von Bindungen zwischen biologisch oder biochemisch relevanten Systemen. Zeitaufgelöstes Verfolgen einer Bindung hat den Vorteil, nicht nur thermodynamische, sondern auch kinetische Daten der Wechselwirkung erhalten zu können.

Zudem entfallen beim Arbeiten mit einem markierungsfreien Verfahren aufwendige Synthese und Reinigung der markierten Komponenten.

Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines planar optischen Transducers und den entsprechenden optischen Transduktionsmethoden. Die Vorteile beim Einsatz optischer Sensoren sind im Gegensatz zu anderen analytischen Methoden, dass Sensoren schnell, kontinuierlich und reversibel arbeiten und somit ein effizientes Werkzeug zur Analyse biologisch interessanter Systeme sind. Die spezifische Bindung kann online verfolgt werden, und die Ausarbeitung eines Testformates ist vergleichsweise einfach.

2.2.1 Aufbau eines Analysengerätes zur BIA

Ein Analysengerät zur BIA besteht im wesentlichen aus drei Komponenten: einem Probenhandhabungssystem, einem planaren optischen Transducer mit einer

sensitiven Oberfläche sowie einer entsprechenden Detektionseinheit. Im Folgenden soll die Bedeutung der einzelnen Komponenten näher erläutert werden.

2.2.1.1 Probenhandhabung

Eine bedeutende Rolle bei der BIA spielt die Probenhandhabung. Reproduzierbare Ergebnisse sind nur mit einer präzisen Probenaufgabe erzielbar.

Bei der Reaktion an einer Oberfläche genügt für eine thermodynamische Auswertung der Messergebnisse eine ruhende Lösung, um den Endpunkt der Bindung zu bestimmen. Bei einer kinetischen Auswertung, also bei einer Bestimmung der Ratenkonstanten der Bindung, sollte die Konzentration des mobilen Reaktanden über die Zeit gleich bleiben. Jedoch verarmt die Lösung über der Oberfläche an Reaktand durch dessen Bindung an den immobilisierten Partner. Wird die Lösung jedoch gerührt oder wird im gleich bleibenden Fluss gemessen, so wird die fehlende Komponente permanent nachgeliefert und die Konzentration über der Oberfläche konstant gehalten. Es gilt das erste Ficksche Gesetz.

In der BIA wird grundsätzlich im Fluss oder unter Konvektion gemessen, um auch kinetische Daten zu erhalten. Bei einer Messung im Durchfluss können Limitierungen wie z. B. eine Dispersion der Probe im Trägerstrom auftreten, die die gesamte Analyse beeinflussen können.

2.2.1.2 Transducer mit sensitiver Oberfläche

Für die Wandlung der zu erfassenden Oberflächenreaktion in ein messbares Signal dient ein Transducer mit einer sensitiven Oberfläche. An eine solche Oberfläche wird in der Hauptsache der Anspruch nach einer hohen Selektivität, einer den Ansprüchen entsprechenden Bindungskapazität, der Regenerierbarkeit und einer hohen Regenerations- und Temperaturstabilität gestellt. Eine hohe Selektivität bedeutet geringe unspezifische Wechselwirkungen, die Bindung von Proteinen oder anderen Stoffen, die nicht charakteristisch mit dem immobilisierten Bindungspartner wechselwirken, sondern z. B. adsorptiv an die Oberfläche binden. Die immobilisierte Komponente sollte leicht zugänglich, homogen verteilt und

möglichst konzentriert sein. Zudem ist eine unkomplizierte Immobilisierung der Zielmoleküle für eine einfache und schnelle Handhabung des Sensors wünschenswert.

Zur Immobilisierung biochemischer Komponenten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Physisorption von Proteinen ist die einfachste Methode. Mit ihr werden nur geringe Oberflächenkonzentrationen erreicht, und die Bindung an die Oberfläche ist nicht besonders stabil. Hauptsächlich werden hydrophobe Oberflächen zur Immobilisierung von Membranen benutzt.

Durch Affinitätsreaktionen, zum Beispiel mit dem Biotin-Streptavidin-System, wird die Bindung an die Oberfläche stabiler. Zudem ist diese Methode universell einsetzbar. Die kovalente Bindung der Komponenten an die Oberfläche ist die bevorzugte. Sie ist ebenfalls universell anwendbar, und die so modifizierten Oberflächen zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus [81].

Mit Affinitätsreaktionen können auch mit bestimmten TAGs (Affinitätsmarker) modifizierte Moleküle an die Oberfläche gebunden werden. Mit diesen TAGs werden die aus biologischen Proben zu isolierenden Komponenten modifiziert, um sie mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können. Eine Immobilisierung von Molekülen aus biologischen Proben kann also über eine spezifische Bindung an eine dementsprechend modifizierte Oberfläche erfolgen. Es gibt hierfür verschiedene zur Verfügung stehende Oberflächenmodifikationen. Als Beispiel wären hier mit Histidin versehene Analyten zu nennen, die über eine Bindung an Ni koordiniert werden.

Da innerhalb dieser Arbeit hauptsächlich die kovalente Immobilisierungsmethode angewendet wird, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden. Eine universelle und meist problemlose Immobilisierung kann über Peptidbindungen mittels Standardkupplungschemie an ein beispielsweise mit Amino- oder Carboxylgruppen funktionalisiertes Polymer erfolgen, welches leicht darstellbar ist und die Oberfläche durch seine räumliche Ausdehnung abschirmt.

Ein häufig eingesetztes und für alle untersuchten Methoden anwendbares Polymer ist das Dextran, welches sich vor allem durch gute Abschirmung der Oberfläche und

über eine hohe Hydratisierung auszeichnet. Durch seine dreidimensionale, komplexe Struktur werden besonders hohe Beladungsdichten von bis zu 20 ng/mm^2 Protein erreicht [82].

Ein weiteres geeignetes Polymer ist das Polyethylenglykol (PEG), das nur für das RIfS-System etabliert ist. Mit ihm werden zwar etwas geringere Beladungsdichten von maximal einer Monolage erzielt, das entspricht etwa $5\text{-}6 \text{ ng/mm}^2$, dafür zeichnet es sich jedoch durch noch bessere Abschirmung der Oberfläche als das Dextran aus. Durch seine bürstenartige Anordnung an der Oberfläche wird diese nahezu vollständig abgeschirmt. Beide Polymere werden über ein Silan an die Oberfläche gebunden [83], wie in Abbildung 5 gezeigt ist.

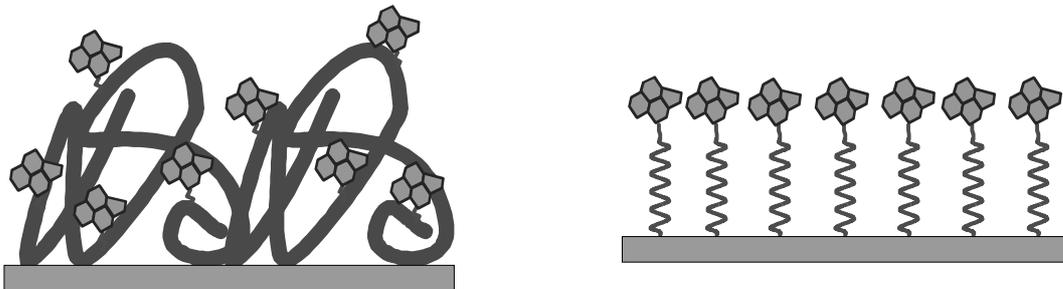


Abbildung 5: Vergleich beider Polymere Dextran (links) und PEG (rechts) auf der Oberfläche

Die Liganden können durch Peptidbindungen mit Standard-Kupplungschemie über funktionelle Gruppen wie Aminogruppen und Carboxylgruppen an das bereits immobilisierte funktionalisierte Polymer gebunden werden.

Die Auswahl der Oberfläche richtet sich nach dem Verwendungszweck. Soll die Kinetik der Bindung an die Oberfläche bestimmt werden, sind Oberflächen mit sehr geringen unspezifischen Wechselwirkungen und weniger hoher Beladungskapazität zu bevorzugen. Zudem ist eine zweidimensionale Oberfläche von Vorteil, so dass alle Bindungsstellen gleich gut zugänglich sind. Wird die Oberfläche als Sonde zur Konzentrationsbestimmung verwendet, wird eine hohe Beladungskapazität benötigt. Die unspezifischen Wechselwirkungen fallen dabei weniger ins Gewicht und auch Bindungsstellen im Volumen sind, trotz einer eventuell von Bindungsstellen an der

Oberfläche abweichenden Bindungskinetik, zur Erhöhung der Beladungsdichte von Nutzen [84].

Im Folgenden (Tabelle 2) ist eine Übersicht über die für RIfS entwickelten etablierten Oberflächenmodifikationen und über bei den benutzten kommerziellen Geräten eingesetzten gegeben. Da für das Young-Interferometer noch keine sensitive Oberfläche zur Verfügung stand und verschiedene Modifikationen erst im Rahmen dieser Arbeit etabliert worden sind, ist dieses aus der Übersicht ausgenommen.

RfS	SPR (BIAcore)	RM (IAsys)	Vorteil
Carboxymethyl-dextran	Carboxymethyl-dextran	Carboxymethyl-dextran	Schnelle kovalente Immobilisierung über Peptidchemie, große Signaländerung durch Volumeneffekt
Polyethylenglykol	-	-	Planare Oberfläche geeignet für kinetische Messungen, Abschirmung gegen unspezifische Bindung
Hydrophobe Oberfläche	Hydrophobe Oberfläche	Hydrophobe Oberfläche	Immobilisierung von Membranen
-	planare Oberflächen mit Amino- bzw. Carboxyfunktionen	planare Oberflächen mit Amino- bzw. Carboxyfunktionen	Planare Oberflächen, aber keine Abschirmung gegen unspezifische Bindung
Streptavidin-Oberflächen	Streptavidin-Oberflächen	Streptavidin-Oberflächen	Immobilisierung biotinylierter Komponenten
Nickeltetraethylen-triacetyl (NTA)	Nickeltetraethylen-triacetyl (NTA)	-	Immobilisierung von Liganden mit Histidin-Resten über einen Chelatkomplex

Tabelle 2: Oberflächenmodifikationen etabliert für RfS im Vergleich mit den kommerziell für BIAcore und IA_{sys} verfügbaren, Anwendungsvorteile

2.2.1.3 Detektion

Die Effizienz einer Detektionsmethode hängt in erster Linie von allgemeinen Leistungsparametern wie Rauschen und Drift des Signals ab. Sie schränken die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit ein.

Man unterscheidet systematisches und statistisches Rauschen. Unterhalb der Sättigung ist in jedem Signalniveau eines Detektors neben einem eventuellen systematischen Rauschen vor allem ein statistisches anwesend. Das statistische, auch fundamentale Rauschen bei optischen Detektionsmethoden, rührt von der Partikelnatur von Licht und Materie her. Es kann im Gegensatz zum systematischen Rauschen durch keinen zusätzlichen Messaufwand (z. B. Referenzmessungen) beseitigt werden und limitiert so eine Detektionsmethode. Beim systematischen Rauschen ist hingegen das entsprechende Signalereignis mehr oder weniger offensichtlich mit einem anderen, äußeren Ereignis zeitlich korreliert und kann z. B. durch Referenzierungen gegen die Messung des Störsignals reduziert werden [85].

Driften können von Schwankungen in der Lichtintensität (z. B. bei der RIfS) sowie von Temperaturänderungen hervorgerufen werden, oder aber sie treten während einer Messung von Instabilitäten der biologischen Schichten als eine echte Signaländerung auf. Auch hier kann durch eine Referenzierung des Signals eine Reduktion des Effektes erzielt werden.

Sogenannte Bulkeffekte treten auf, sobald eine Änderung der Umgebung, z. B. durch Änderung des Brechungsindex bei der Injektion der Probe, die eigentliche physikalische Messgröße beeinflusst. Besonders bei ausschließlich brechungsindexsensitiven Methoden, wie der SPR oder des RM, sind diese Effekte ausgeprägt, können jedoch durch eine online-Signalreferenzierung fast ganz unterdrückt werden. Bei der RIfS ist die Messgröße das Produkt aus Brechungsindex und Schichtdicke $n \cdot d$, welche sich zum Beispiel bei Temperaturschwankungen näherungsweise umgekehrt proportional verhalten. So kommt die Methode diesbezüglich ohne eine Signalreferenzierung aus.

Um die Nachweisgrenze (Erfassungsgrenze = limit of detection) einer Methode angeben zu können, muss eine Kalibration des Signals vorgenommen

werden. Die Empfindlichkeit der Methode ist definiert durch die Steigung der Kalibrierfunktion, das heißt als Quotient aus der Änderung in der Signalebene, also der Messgröße, und der Änderung in der Konzentrationsebene. Für die Nachweisgrenze projiziert man den entsprechenden Wert auf der Kalibrierkurve auf die Konzentrationsachse und erhält die Nachweisgrenze (limit of detection) [86]. In der Literatur wird in der Signalebene oft ein Signal definiert, das dreifach über dem RMS-Rauschen liegt und dann die entsprechende Konzentration dazu angegeben.

Eine Kalibrierkurve korreliert die Änderung Messgröße mit der tatsächlichen Konzentrationsänderung, d. h. bei Oberflächenmethoden mit der auf der Oberfläche gebundenen Menge an Protein. Derartige Kalibrierungen werden zur exakten Massenbestimmung mit Hilfe von radioaktiv markiertem Protein durchgeführt und sind bei kommerziellen Geräten oft in den Herstellerangaben enthalten.

2.2.2 Affinitätsreaktionen an der Oberfläche

Mit Hilfe der BIA wird die Bindung an eine Oberfläche untersucht. Reaktionen an einer Oberfläche unterscheiden sich häufig von denen in homogener Phase, da sie durch Transportprozesse limitiert werden können. Die Bindung eines Moleküls an seinen immobilisierten Partner können hierbei zeitaufgelöst verfolgt und kann der Reaktionsfortschritt der Affinitätsreaktion online zu jedem Zeitpunkt beobachtet werden.

Durch die zeitaufgelöste Messung wird es möglich, die untersuchten biologischen Systeme nicht nur thermodynamisch, sondern auch kinetisch zu charakterisieren. Die Vorgehensweise für die Bestimmung von thermodynamischen und kinetischen Konstanten ist im Folgenden genauer beschrieben.

Bei Messungen mit markierten Komponenten besteht die Möglichkeit, dass nicht die reine Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor beobachtet wird. Wenn der Marker in Nähe des Zentrums der Wechselwirkung bindet, kann die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor stark beeinflusst werden. Bei der markierungsfreien Messung kann dies nicht auftreten,

thermodynamische und kinetische Konstanten können bestimmt werden. Jedoch muss, aufgrund der Immobilisierung einer der Bindungspartner an der Oberfläche zwischen der Messung in homogener Phase und an der Oberfläche unterschieden werden.

Die Affinitätsreaktion an einer Grenzfläche kann formal als eine Folgereaktion betrachtet werden. Als erstes findet die Diffusion zur Oberfläche statt, anschließend folgt die eigentliche Bindung an den immobilisierten Liganden wie in Abbildung 6 gezeigt.

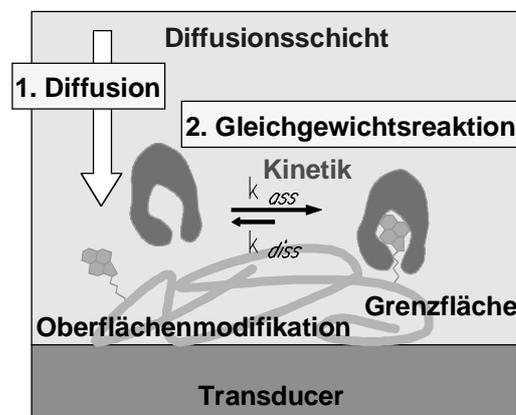


Abbildung 6: Vorgänge der Affinitätsreaktion an der Oberfläche [63]

Detektiert werden dabei beide Schritte, geschwindigkeitsbestimmend ist der jeweils langsamere. Im Grenzfall wird dann nur die Bindung an den immobilisierten Bindungspartner oder nur die Diffusion an die Oberfläche beobachtet. In beiden Fällen sind, abhängig vom Testformat, thermodynamische bzw. kinetische Konstanten bestimmbar.

Im ersten Grenzfall, bei dem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Kinetik der Reaktion des mobilen Bindungspartners mit dem an der Oberfläche immobilisierten ist, kann die Bindung zeitaufgelöst verfolgt werden, um die kinetische Konstante der Oberflächenreaktion zu bestimmen. Diese Art der Messung wird bei der BIA bevorzugt angewendet.

Im zweiten Grenzfall, bei dem die Diffusion an die Oberfläche, man spricht auch vom Massentransport, geschwindigkeitsbestimmend ist, kann die Oberfläche mit immobilisiertem Liganden als Sonde zur Konzentrationsbestimmung des mobilen Rezeptors eingesetzt werden. Dazu

muss eine hohe Dichte an Bindungsstellen an der Oberfläche vorhanden sein. Die eigentlich detektierte Bindungsreaktion findet, beispielsweise beim Bindungshemmtest, ausführlich beschrieben in [87], zuvor in homogener Phase statt. Die unterschiedlichen Bindungskurven für beide Fälle sind in Abbildung 7 verglichen.

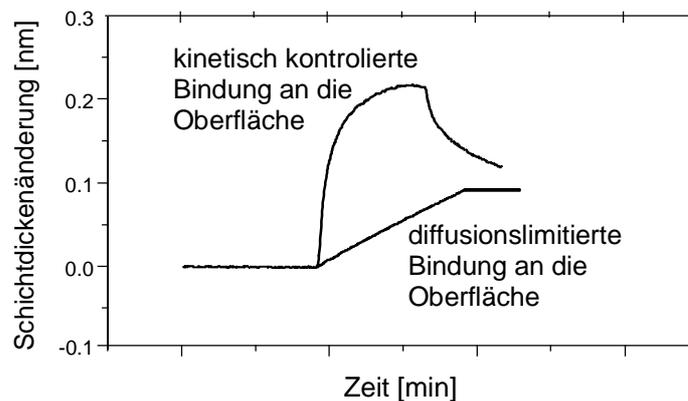


Abbildung 7: Bindungskurve diffusionslimitierter und kinetisch kontrollierter Bindung im Vergleich

Im Folgenden soll nun die Ermittlung der kinetischen Konstanten für den Grenzfall der kinetisch kontrollierten Bindung an die Oberfläche mit Hilfe verschiedener Modelle und die Vermeidung der nicht korrekten Auswertung diffusionslimitierter Bindungsanteile beschrieben werden.

2.2.3 Ermittlung der Bindungskonstanten

2.2.3.1 Nach Kinetik pseudo-erster Ordnung

Aus der Bindungskurve lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion pseudo-erster Ordnung und die Bindungskonstante bestimmen [88-90].

Dazu wird von einer Gleichgewichtsreaktion zwischen Rezeptor (R) und an der Oberfläche immobilisiertem Ligand (L_{immob}) ausgegangen.



Die Bildungsgeschwindigkeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes ergibt sich zu:

$$\frac{d[RL]_{immob}}{dt} = k_a \cdot [R] \cdot [L]_{immob} - k_d \cdot [RL]_{immob} \quad (12)$$

k_a ist hier die Assoziationsratenkonstante und k_d die Dissoziationsratenkonstante.

Mit $[L]_{immob} = [L_0]_{immob} - [RL]_{immob}$ ergibt sich:

$$\frac{d[RL]_{immob}}{dt} = k_a \cdot [R] \cdot ([L_0]_{immob} - [RL]_{immob}) - k_d \cdot [RL]_{immob} \quad (13)$$

wobei $[L_0]_{immob}$ die Ausgangskonzentration an immobilisiertem Ligand, d. h. die Konzentration maximal besetzbarer Bindungsstellen oder aktiver Liganden zum Zeitpunkt $t=0$ darstellt.

Das beobachtete Signal $\Gamma(t)$, die Oberflächenbeladung, ist proportional zur Bildung an Rezeptor-Ligand-Komplex $[RL]_{immob}$ an der Oberfläche und das maximale Signal $\Gamma(t)_{max}$ ist proportional zur Oberflächenkonzentration an aktivem Ligand $[L_0]_{immob}$ auf der Oberfläche. Die Gleichung lässt sich also umwandeln zu:

$$\text{bzw.} \quad \frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot C_0 \cdot (\Gamma_{max} - \Gamma(t)) - k_d \cdot \Gamma(t) \quad (14)$$

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot C_0 \cdot \Gamma_{max} - (k_a \cdot C_0 + k_d) \cdot \Gamma(t) \quad (15)$$

wobei $d\Gamma/dt$ die Bildungsrate des auf der Oberfläche gebundenen Rezeptor-Ligand-Komplexes sind und C_0 die eingesetzte Konzentration an Rezeptor in der Lösung; Γ_{max} sind die maximale Kapazität an immobilisiertem Ligand auf der Oberfläche und $(\Gamma_{max} - \Gamma(t))$ ist die Anzahl der noch unbesetzten Bindungsstellen an der Oberfläche zum Zeitpunkt t . Gleichung (14) zeigt, daß beim Auftragen von $d\Gamma/dt$ gegen $\Gamma(t)$ eine Steigung k_{obs} erhalten wird, wobei $k_{obs} = k_a C_0 + k_d$ definiert ist.

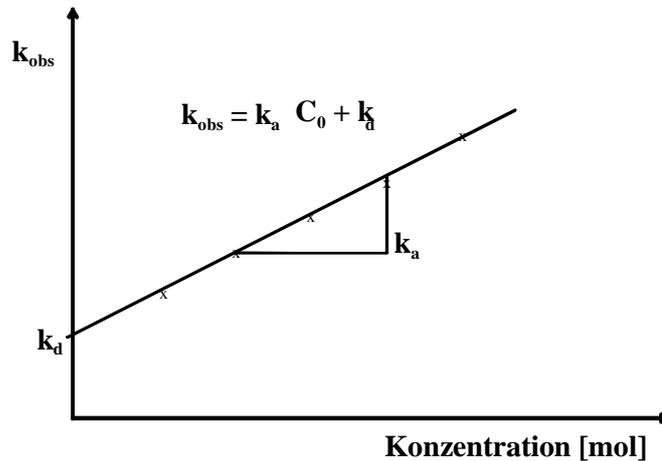


Abbildung 8: Auftragung von k_{obs} gegen die Konzentration

Wird Gleichung (15) unter dem Gesichtspunkt gelöst, dass im Durchfluss oder unter Rühren die Konzentration C_0 konstant bleibt (oben beschriebener Grenzfall), so ergibt sich eine Kinetik pseudo-erster Ordnung:

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

Dabei beträgt die konzentrationsabhängige Ratenkonstante $k_{obs} = k_a C_0 + k_d$. Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten lassen sich aus der Steigung der Ratenkonstanten k_{obs} , also der Krümmung der Bindungskurve, bestimmen, wie in Abbildung 8 gezeigt ist.

Statt Γ_{max} wird nun Γ_{GG} (Gleichgewichtsbeladung) geschrieben, d. h. die bei einer bestimmten Konzentration an Reaktand, hier Rezeptor, maximal erreichbare Beladung der Oberfläche. Die Gleichgewichtsbeladung ergibt sich analog einer Langmuirschen Adsorptionsisothermen:

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \cdot \frac{K \cdot C_0}{1 + K \cdot C_0} \quad (17)$$

Die Gleichgewichtsbeladung hängt also von der Bindungskapazität der Oberfläche Γ_{max} , der Bindungskonstanten K und der Konzentration C_0 an Reaktand ab [88], [91].

2.2.3.2 Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten aus der Oberflächenreaktion

Im Folgenden wird exemplarisch auf die Ermittlung von kinetischen und thermodynamischen Konstanten aus einer mit RIfS detektierten Bindungskurve eingegangen. Das Vorgehen ist jedoch für jedes andere Verfahren in der BIA gleich.

Zur Ermittlung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten k_a und k_d der Reaktion des Rezeptors mit der ligandmodifizierten Oberfläche müssen die Bindungskurven die entsprechenden Informationen enthalten, siehe auch Abbildung 9.

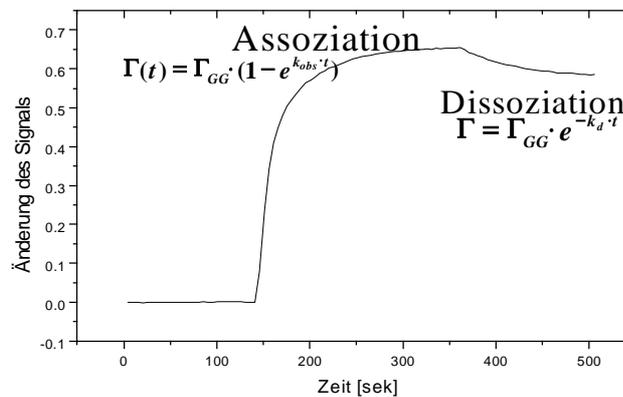


Abbildung 9: Typische Bindungskurve bei Messung von Oberflächenkinetik

Um die Ratenkonstanten zu bestimmen, muss der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die tatsächliche Bindung an die Oberfläche und darf nicht von der Diffusion beeinflusst sein. Da im Oberflächenbereich jedoch eine hohe Konzentration an Bindungsstellen vorliegt, ließen sich mit den sonst benutzten Transducern nur Konzentrationen im millimolaren Bereich untersuchen. Da aber das Interesse im nanomolaren Bereich liegt, ist es sinnvoll, die Anzahl Bindungsstellen an der Oberfläche zu reduzieren.

Mit RIfS detektierbar sind noch Effekte von 3-10 pm optischer Schichtdickenänderung, darunter wird der Fehler durch das Rauschen zu groß. Unspezifische Wechselwirkungen verursachen Effekte, die sich meist nicht linear mit der zu untersuchenden Konzentration ändern, sie stören also bei

niedrigeren Konzentrationen zunehmend. Deshalb wird eine Maximalbeladung Γ_{GG} (d. h. Beladung bei „unendlicher“ Konzentration) von 500-900 pm bevorzugt, da dann mit niedrigeren Probenkonzentrationen gearbeitet werden kann. Transducer mit einer begrenzten Anzahl an Bindungsstellen werden entweder durch Mischen bzw. „Verdünnen“ des Liganden mit einer konkurrierenden Komponente beim Immobilisieren auf die Oberfläche hergestellt oder durch vorzeitigen Abbruch der Immobilisierungsreaktion des Rezeptors mit der ligandmodifizierten Oberfläche.

Es werden unterschiedliche Bindungskurven durch das Einsetzen verschiedener Rezeptorkonzentrationen erhalten. Dazu sollten mindestens fünf Konzentrationen möglichst innerhalb einer Größenordnung ausgewählt werden. Zur Auswertung werden nun wie im vorigen Abschnitt beschrieben die Ratenkonstanten, oder auch Geschwindigkeitskonstanten, bestimmt. Zum Erhalt dieser Werte wird dem exponentiellen Verlauf der Bindungskurve der Assoziation eine Exponentialfunktion anpasst.

Die Assoziation hängt also sowohl von k_a , als auch von k_d ab. Über die Kurvenanpassung werden k_{obs} und Γ_{GG} erhalten. Durch Auftragung der für die einzelnen Konzentrationen durch die Anpassung erhaltenen Werte für k_{obs} gegen die Konzentration, kann über lineare Regression die Steigung der Geraden, also k_a , und der y-Achsenabschnitt k_d bestimmt werden.

Wichtig bei der Anpassung ist die richtige Auswahl des auswertbaren Bereiches. Nicht der gesamte Bereich der Assoziation eignet sich für die Auswertung, d. h. nicht überall lässt sich eine Exponentialfunktion anpassen.

Wie Abbildung 10 zeigt, ist im Anfangsbereich diffusionslimitierte Bindung vorherrschend, das heißt der Transport zur Oberfläche ist der langsamste Schritt. Im hinteren Kurvenbereich zeigt sich biexponentielles Verhalten, der Ligand bindet nun auch an schlechter zugängliche Bindungsstellen und eine andere Assoziationsratenkonstante überlagert die zu untersuchende. Nur im mittleren Bereich decken sich die Exponentialfunktion und die reale Bindungskurve. Eine sinnvolle Kurvenanpassung ist hier möglich.

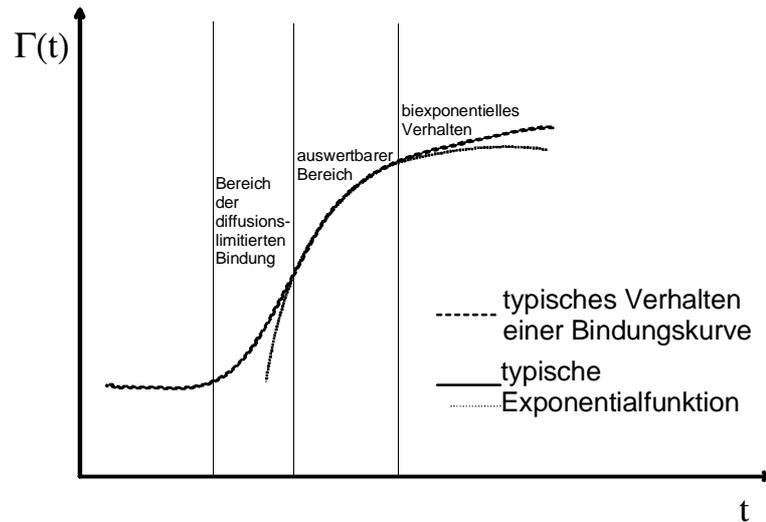


Abbildung 10: Auswertbarer Bereich der Assoziation bei einer Bindungskurve mit vorherrschender kinetischer Kontrolle

Bei exponentiellem Verhalten der Bindungskurve ergibt sich bei Auftragung von der Ableitung von $\Gamma(t)$ nach der Zeit gegen $\Gamma(t)$ eine Gerade, und zeigt somit den Bereich an, in dem die Bindungskurve mit dem Modell der Kinetik pseudo-erster Ordnung übereinstimmt [89]. Die Ableitung ist im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

Diese Linearisierung lässt sich auch für die Bestimmung der Assoziationskonstanten ausnutzen. Nach der Gleichung

$$d\Gamma(t)/dt = \text{const.} - (k_a C_0 + k_d) \Gamma(t)$$

sollte die Kurve ein lineares Verhalten zeigen, solange mono-exponentielles Verhalten der Assoziationskurve gegeben ist. Die Auftragung der Ableitung des Signals gegen das Signal kann entsprechend der gezeigten Gleichung in Abbildung 8 direkt aus der Steigung der Kurve die Assoziationskonstante liefern.

Die Dissoziationskonstante k_d ist, wie schon erwähnt, aus der Assoziationsphase der Bindungskurve extrapolierbar, jedoch besser aus der Dissoziation selbst zu ermitteln, siehe Gleichung 18.

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (18)$$

Im exponentiellen Abfall ist nur noch eine Zeitkonstante ausschlaggebend. Massiv stören kann hierbei jedoch die Rückbindung bereits dissoziierter

Teilchen an die Oberfläche. Um ein unverfälschtes k_d zu erhalten, muss die Rückbindung unterdrückt werden. Dies kann durch einen, der Spüllösung in hoher Konzentration beigegebenen, kompetitiven Binder geschehen, der die Liganden bindet und so eine erneute Bindung an die Oberfläche vollständig verhindert. In jedem Fall ist ein Messen an der Beladungsgrenze des Transducers sinnvoll, da hier sehr wenig Bindungsstellen an der Oberfläche für eine erneute Bindung (Rückbindung) zur Verfügung stehen.

2.3 Thrombin

Thrombin ($m = 39$ kDa) ist die zentrale Protease der Blutgerinnungskaskade. Es spaltet das Protein Fibrinogen unter Freisetzung von Fibrin, welches polymerisiert und so die Blutgerinnung einleitet. Hierfür ist das Thrombin mit einem aktiven Zentrum und einer weiteren Bindungstasche ausgestattet, welche positiv geladen ist. Sie bindet das Fibrinogen und präsentiert es so dem aktiven Zentrum, so dass dieses eine Spaltung an der gewünschten Stelle des Fibrinogens einleiten kann [92], [93]. Die zweite Bindungstasche, die sogenannte Exo-site, bindet an eine Vielzahl von Proteinsequenzen. Diese Bindung ist reversibel. Im Gegensatz dazu ist das aktive Zentrum auf die Spaltung einer speziellen Sequenz spezifiziert.

Um eine Blutgerinnung zu verhindern, wurden und werden Substanzen gesucht, die die Aktivität des Thrombins inhibieren, sogenannte Thrombininhibitoren [94]. Dies können Peptide sein, aber auch kleinere Haptene, die lediglich das aktive Zentrum des Thrombins besetzen und somit die Enzymwirkung blockieren. In Abbildung 11 ist ein Thrombinmolekül (hell) gezeigt, dessen aktives Zentrum mit einem Inhibitor blockiert ist (dunkel).

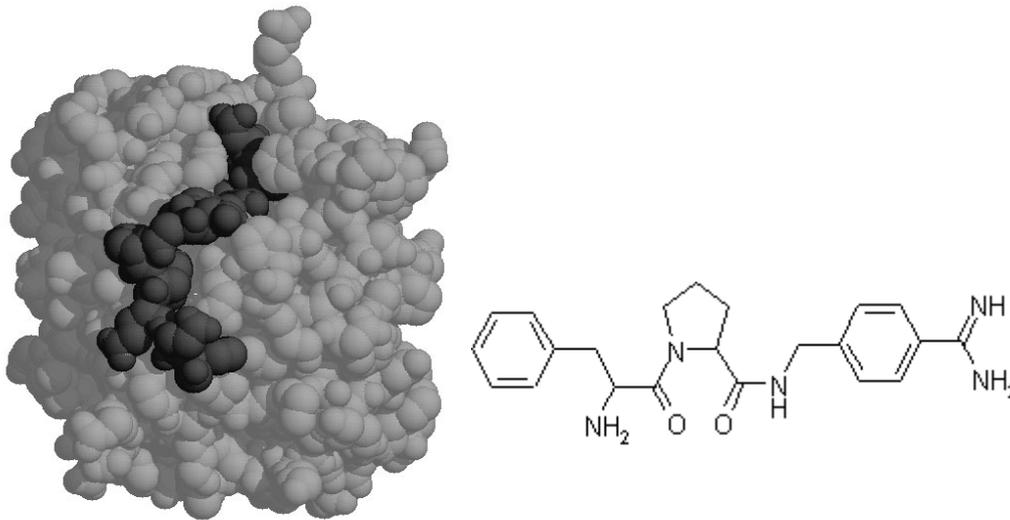


Abbildung 11: Thrombinmolekül mit einem Inhibitor in der Bindungstasche des aktiven Zentrums und Struktur des verwendeten Thrombininhibitor

In Abbildung 11 sind sehr deutlich die Größenverhältnisse zwischen Thrombin (hell) und einem typischen Inhibitormolekül (dunkel) gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der Bindung des Thrombins an den immobilisierten Inhibitor mit verschiedenen Detektionsmethoden verglichen.

Dabei ist eine der Aminogruppen nicht an der Affinitätsreaktion beteiligt, da die durch Immobilisierung bedingte Bindung des Moleküls zum Beispiel an Dextran keinen Aktivitätsverlust bewirkt [95]. Deshalb konnte diese Aminogruppe zur Modifizierung des Inhibitors bzw. zur Immobilisierung herangezogen werden.

Der potentielle therapeutische Nutzen und das Interesse der Medizin an neuen, synthetischen Inhibitoren machen dieses System als Modellsystem für Affinitätsmessungen interessant. Zudem war dieses System schon mit der Methode der RIfS charakterisiert [96] und eignete sich daher sehr gut bei einem Methodenvergleich.

2.4 G-protein-gekoppelte Rezeptoren

Zellkommunikation läuft ausschließlich über chemische Botenstoffe ab. Botenstoffe wie zum Beispiel Hormone treffen zumeist über den Blutweg ein, Neurotransmitter dienen als Signalüberträgersubstanzen im synaptischen Spalt zwischen den Enden der Nervenzellen. Dabei dringen diese Moleküle nicht in die Zelle ein, sondern dienen nur als Mittler. Diese Botenstoffe binden an Rezeptorproteine, die sich vor allem durch die Zellmembran hindurch bis zur Innenseite erstrecken und dort das Signal an zellinterne Vermittler weitergeben, wie in Abbildung 12 gezeigt. Den Prozess der Signaltransduktion vom Rezeptor bis zur Reaktion der Zelle auf das durch den Botenstoff übermittelte Signal übernehmen G-Proteine [97].

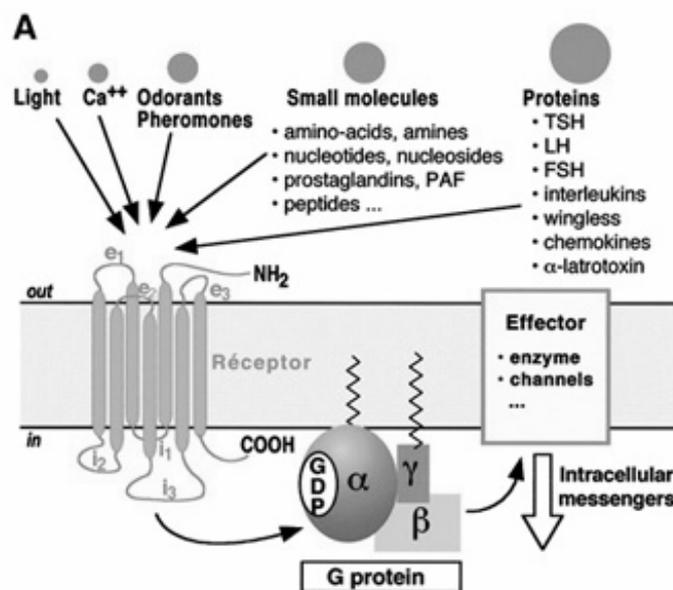


Abbildung 12: Botenstoffe binden extrazellulär an den in der Membran befindlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher mit dem innerhalb der Zelle befindlichen G-Protein interagiert, wobei dieses seinerseits verschiedene Effektoren aktiviert

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) repräsentieren die größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren, die eine Reihe von extrazellulären Stimuli, wie bioaktive Monoamine, Peptidhormone verschiedener Größe, Chemokine, Lipidanaloga, Aminosäuren und sensorische Stimuli in die Zelle übertragen.

Fehlfunktionen der G-Proteine und der entsprechenden Rezeptoren tragen zu Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer, Cholera, Keuchhusten, Parkinson oder Krebs bei [98]. GPCRs sind auch beteiligt beim Auftreten von Depressionen, Schizophrenie, Schlaflosigkeit, Bluthochdruck, Impotenz, Angstzuständen, Stresssymptomen, Nierenfunktionsstörungen, Zwergwuchs, Farbenblindheit, verschiedenen Herz-Kreislaufkrankungen und Entzündungsprozessen. Medikamente, die zur Regulation eines bestimmten, an ein G-Protein gekoppelten Rezeptors dienen, sind für die Drug-Discovery Programme der pharmazeutischen Industrie von großem Interesse. Diese Rezeptoren bilden etwa ein Prozent des humanen Genoms und sind Target für 50% aller existierenden Medikamente [99]. Viele davon sind bekannt, wie zum Beispiel Beta-Blocker und Anti-Histaminika. Auch Drogen wie Opium oder Cannabis wirken über GPCRs.

Dennoch ist nur sehr wenig über diese Rezeptoren bekannt. Zusammenhänge von Struktur und Funktionalität sind genauso von Interesse wie das Auffinden von Agonisten bzw. Antagonisten, die den Rezeptor regulieren können, und das Charakterisieren neuer Rezeptoren [100], [101].

Analysemethoden zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und seinem Agonisten bzw. Antagonisten beruhen zumeist auf einer Markierung einer der Komponenten und beschränken sich zudem auf Gleichgewichtsmessungen. Es wäre von Vorteil, die Kinetiken der Interaktionen zu erfassen und somit eine genauere Evaluation von eventuellen Targets realisieren zu können.

Die Schwierigkeit der Charakterisierung von Interaktionen membrangebundener Rezeptoren mit dem jeweiligen Rezipienten ist ihre geringe Stabilität in Lösung. Die Rezeptoren verlieren ihre strukturelle Integrität, sobald sie nicht mehr von stabilisierender Membran umgeben sind, und interagieren nicht mehr mit ihren Rezipienten. Im Fall der GPCRs hilft nicht einmal mehr der Zusatz von Tensiden, der oft zur Stabilisierung von Proteinen dient.

Da solche Proteine zudem oft nur 0,01% der Gesamtproteinmenge der Zelle ausmachen, ist ihre Reinigung äußerst schwierig.

Es wäre also für ihre Stabilität von Vorteil, die Rezeptoren eingebettet in der Membran, belassen und auf eine aufwendige Reinigung verzichten zu können. Eine optische Methode zur Messung von stark streuenden Proben aus der Membranpräparation muss sehr robust und wenig anfällig für Bulkeffekte sein, so dass RIfS eine geeignete Methode sein könnte.

Zudem wäre ein auf Sensoren gestütztes Verfahren auch im Hinblick auf ein späteres Screening von Targets interessant, da die Methode parallelisiert im Hochdurchsatz Einsatz finden kann.

2.4.1 Das NPY5 - NPY5-Rezeptor System

Als ein Modellsystem für die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen dem Neuropeptid Y5 (NPY5), welches zur Familie der Pankreaspeptide zählt, und dessen Rezeptor untersucht (Abbildung 13).

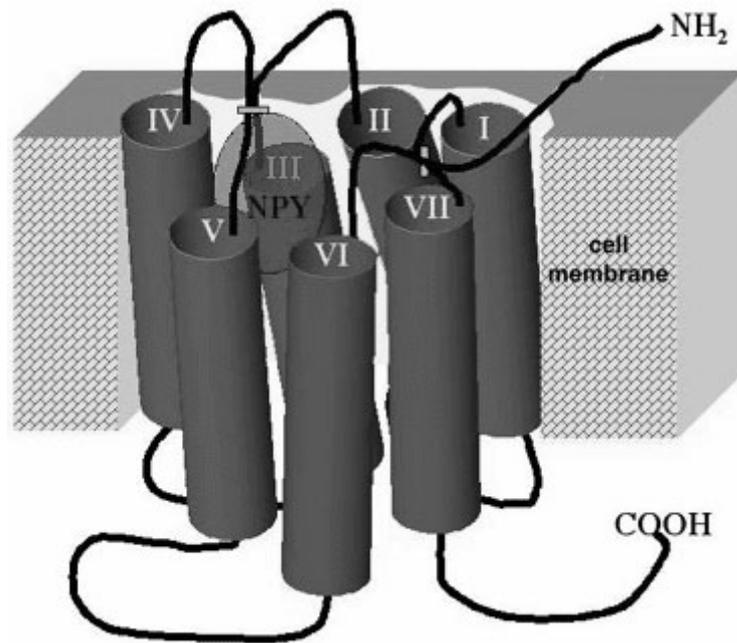


Abbildung 13: Das Neuropeptid Y bindet extrazellulär an die N-Terminale der Loops des die Zellmembran mehrfach durchspannenden Rezeptors.

Das Neuropeptid Y ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid und ist eines der am häufigsten vorkommenden Neuropeptide im zentralen und peripheren Nervensystem. Es wird zusammen mit dem Noradrenalin ausgeschüttet und hat grundlegende Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem, indem es eine Kontraktion der Blutgefäße und somit Blutdruckerhöhung bewirkt [102]. Es ist zudem das potenteste orexigene Signal, d. h. es ist das am stärksten Appetit erzeugende Stimulans und ist daher auch seit längerer Zeit sehr stark von Interesse [103-109].

Die Isolierung des Neuropeptides und dessen Synthese gelangen schon vor etwa zehn Jahren [110], ebenso wie die Identifizierung der Bindungsstelle [111]. Beziehungen zwischen Struktur und Aktivität bzw. auch Affinität konnten durch systematische Änderung (Mutation) des NPY, basierend auf der Analyse des Neuropeptides verschiedener Spezies, hergestellt werden [112], [113] und darauf basierend konnte zu neuen Rezeptor-Antagonisten [114] gelangt werden. Studien mit Rezeptormutanten gaben ebenfalls Aufschluss über Struktur-Affinitäts-Beziehungen [115].

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standardchemikalien und Biochemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS), Diisopropylcarboxydiimid (DIC) wurden von der Fa. Fluka, Neu-Ulm bezogen.
- Aminodextran (AMD) 260/10, hergestellt nach [116], wurde von Herrn Jochen Mehne bereitgestellt.
- Diamino- und Dicarboxy-Polyethylenglykol (DA- und DC-PEG) wurden von Rapp-Polymere, Tübingen erworben.
- 2-Chlor-6-Isopropylamio-1,3,5-Triazin-2-(6'-amino)hexansäure (Atrazincapronsäure, ACA), hergestellt nach [117], wurde von Herrn Dr. Ivo Stemmler überlassen.
- Der monoklonale Antikörper K4E7 wurde vom Arbeitskreis Hock, Fachbereich Botanik an der TU München, zur Verfügung gestellt.
- Thrombininhibitor (MW 393 g/mol) wurde freundlicherweise von Dr. Friedrich, BASF, zur Verfügung gestellt.
- [¹²⁵I]Streptavidin (20-50µCi/µg) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech UK Limited bezogen.
- NPY5 und das cysteinmodifizierte Derivat zur Immobilisierung an die Oberfläche wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rolf Tünnemann (Arbeitsgruppe Jung) zur Verfügung gestellt.
- Humaner NPY5-Rezeptor in Membranpräparation, exprimiert in rekombinanten CHO-K1 Zelllinien, wurde von der Firma Euroscreen, Belgien bezogen.

3.1.2 Lösungen

- PBS = phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): 8.76 g (150 mM) NaCl und 1.36 g (10 mM) KH_2PO_4 in bidestilliertem Wasser (18.2 M Ω ·cm, SG, Barsbüttel) bei pH = 7.4.
- Regenerationslösung für RfS: 500 mg Pepsin in 25 ml bidestilliertem Wasser (10% Lösungsmittel) und 225 ml PBS (90% Lösungsmittel) gelöst und mit 2 M HCl auf pH = 2 titriert. Die Lösungen wurden in 40 ml Portionen bei -18°C aufbewahrt.
- Regenerationspuffer für BIAcore: TMM (2% Triton sowie MgCl_2 /Maleat/Tris im Verhältnis 1:1:1, 1 M NaCl) pH=6.8.
- Natriumacetat-Puffer: 10 mM NaAc in bidestilliertem Wasser, pH = 4.6.
- Aktivierung: Lösung aus 100 mM NHS in bidestilliertem Wasser und 400 mM EDC in bidestilliertem Wasser. Zur Aktivierung wurden beide Lösungen frisch 1 : 1 zusammengemischt.
- Als Blockierung wurde 1 M Ethanolamin in Wasser bei pH = 8 verwendet.
- Puffer für die NPY5-Bindungsexperimente: 25 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 0,2% BSA, 5 mM MgCl_2 und 0,1% Bacitracin, pH 7,4.

3.1.3 Verwendete Geräte, Aufbauten und Transducer

- SPR-Gerät: BIAcore 2000 mit Autosampler von Biacore, Uppsala.
- Sensorchips CM5 (Carboxymethyl-dextran-modifiziert) ebenfalls von Biacore.
- Resonant Mirror-Gerät: IAsys plus ohne Autosampler der Firma Labsystems (Abteilung Affinity Sensors).
- Sensorküvetten CMD (Carboxymethyl-dextran-modifiziert) ebenfalls von Labsystems.
- Young-Interferometer der Firma Biodynamics AG, Allschwil bereitgestellt durch das Fraunhofer Institut für Physikalische Messtechnik, Freiburg.

- Gamma-Counter „LKB-Compugamma“ (NaI-Zählrohr, Bohrloch-Geometrie)
- Laserinduzierter Fluoreszenzimager BioScan der Firma Applied Biosystems mit einem Helium-Neon-Laser (Leistung 20 mW) und einem 2D-Scanner der Auflösung 20 μm , mit BioScan Ansteuerungs-Software und einem Image Tool.

Für den RIfS-Aufbau wurden Komponenten verschiedener Firmen benutzt:

- Fließ-Injektions-Analyse-System: ASIA mit Autosampler der Firma Ismatec, Wertheim.
- Diodenarray-Spektralphotometer SPEKOL, Analytik Jena, modifiziert nach [118] mit einer Halogen-Reflektorlampe (5 V / 20 W) von Oshino Lamps, Nürnberg und Polymerlichtleiter (PMMA, \varnothing 1 mm, mit 1 auf 2 Faserkoppler) von Ratioplast, Optoelectronics, Löhne.
- RIfS-Transducer: Interferenzschichtsystem (10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2) auf D 263 Glassubstrat von Schott, Mainz.
- Messzellen (Flusszellen) aus Plexiglas, Fertigung nach eigener Zeichnung, Dimensionen $4 \times 1 \times 0.05 \text{ mm}^3$, = 200 nL.
- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- pH-Meter GC 843 von Schott, Mainz.
- Microcal Origin, Version 5.0, Northampton, wurde zur Auswertung der kinetischen Daten verwendet.

3.1.3.1 RIfS-Setup

Zur Messung biologischer Interaktionen über die Bestimmung der Schichtdickenänderung mittels RIfS wurden unterschiedliche Aufbauten verwendet. Ein Einkanalssystem wurde sowohl in Kombination mit einem FIA-System als auch mit einer Küvettenmesszelle für ruhende Proben mit einem Volumen von max. 80 μL betrieben. Die Probe wurde manuell dazu pipettiert (Abbildung 14). Der optische Aufbau bestand aus einem Simultan-Spektralphotometer SPEKOL 1100, Zeiss, Jena, modifiziert nach [118].

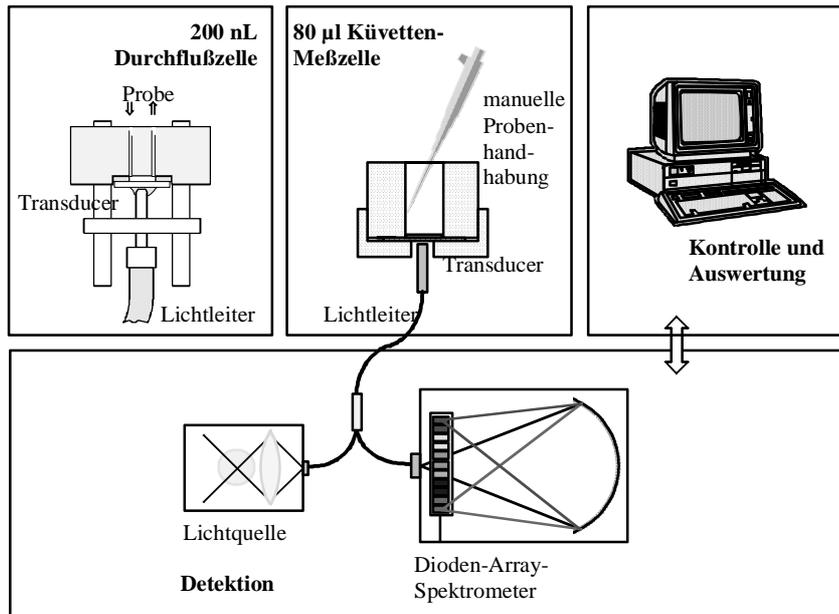


Abbildung 14: Schema des Einkanal-RIFS-Aufbaus mit Durchflußzelle und Küvettenmesszelle

Die FIA-Anlage war eine ASIA-FIA, Ismatec, Wertheim, mit einer Fixpumpe mit 20 Umdrehungen pro Minute (upm), entsprechend einer Förderrate von $0,82 \text{ mL min}^{-1}$, und einer Variopumpe mit maximal 50 upm, mit variabler Drehzahl von 0-99 Schritten einstellbar; je nach eingestellter Drehzahl n entspricht dies einer Förderate $F = n \cdot 3,5 \text{ µL min}^{-1}$. Ein Schema der Fluidik ist in Abbildung 15 gegeben. Zur Vermeidung von Luftblasen stand der zur Durchflussmesszelle gehende Pufferstrom unter Argondruck. Die Probe wurde in einer Probenschleife mit einem Fassungsvermögen von 500 µL aufgenommen, wobei das Probenvolumen 1 mL betrug, und anschließend retrograd über den Transducer gegeben. Bei unvollständiger Befüllung der Probeschleife wurde ein Luftpolster von ca. 5 mm Länge vorausgeschickt, um die Dispersion zu minimieren.

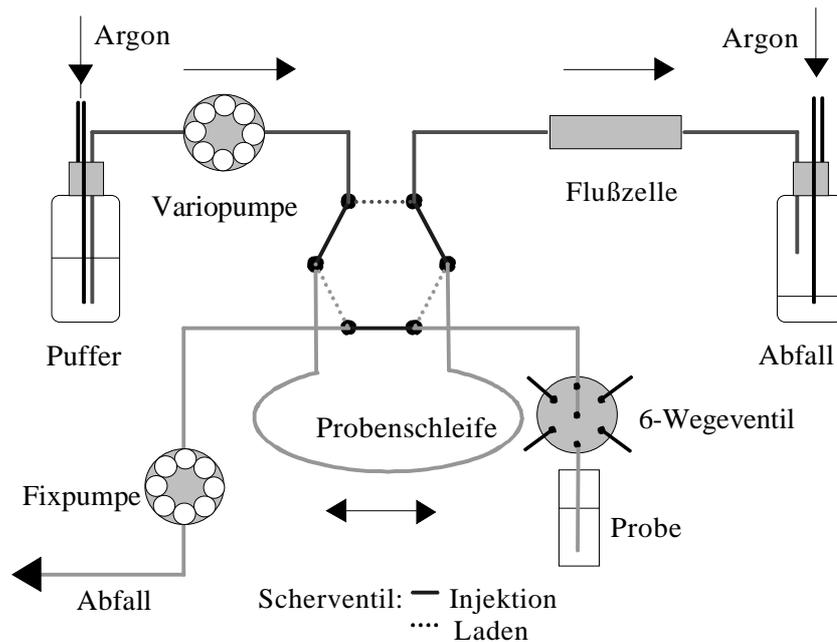


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Probenhandhabung mit FIA und Autosampler. Die Probe wurde in einer Probenschleife aufgenommen und retrograd über den Transducer gegeben.

3.1.3.2 Das SPR-Gerät (BIAcore 2000)

Zu Bindungsstudien mittels SPR wurde das BIAcore 2000 der Firma Biacore verwendet. Die Detektionseinheit verfügt über einen SPR-Aufbau nach Kretschmann [73].

Das Gerät beinhaltet eine komplizierte und hochpräzise Mikrofluidik. Der durch zwei präzise Spritzenpumpen angetriebene Fluss, ist hochreproduzierbar und kann zwischen 1-100 $\mu\text{l/s}$ in Schritten von 1 $\mu\text{l/s}$ gewählt werden. Da sich sowohl Messzelle als auch Probenschleife auf einer Flusskartusche befinden, können die die Probe vom Laufpuffer separierenden Luftblasen direkt vor der Messzelle mit Hilfe von Druckluftventilen abgetrennt werden. Damit ist das Totvolumen so gering, dass effektiv keine Dispersion der Probe auftritt. Eine derart reproduzierbare Durchflusscharakteristik ist in höchstem Maße für die Ansprüche an Bestimmung von Kinetiken geeignet.

Das Volumen einer Messkammer beträgt 0,02 μl . Der Probenverbrauch ist mit 20-80 μl pro Zyklus sehr gering.

Die Messzelle besitzt vier unabhängig voneinander ansprechbare Flusszellen, wodurch z. B. vier verschiedene Immobilisierungen ausgeführt oder auch vier Sensogramme gleichzeitig aufgezeichnet werden können. Eine Recovery-Funktion ermöglicht die Wiedergewinnung von nur in geringen Mengen zur Verfügung stehenden Proben bei der Immobilisierung.

Die Kontrollsoftware ermöglicht eine inline-Referenzierung in Realzeit, das heißt, dass die Signale einer zur Referenzierung benutzten Messzelle sofort von den gemessenen spezifischen Signale subtrahiert werden können. Die Auswertesoftware ermöglicht eine einfache Behandlung der Daten nach verschiedenen Modellen zur Konzentrations- und Affinitätsbestimmung sowie zur Bestimmung kinetischer Konstanten. Die Simulationssoftware erlaubt auch die Simulation von Kinetiken.

Der kühlbare Autosampler hat eine Kapazität von 2 Mikrotiterplatten, d. h. also 192 Proben- bzw. Regenerationslösungen sind handhabbar.

Da es sich bei SPR um ein brechungsindexsensitives Verfahren handelt, ist die Temperaturkontrolle der Detektionseinheit auf 0,1 °C genau geregelt und ermöglicht auch thermodynamische und kinetische Studien in einem Temperaturbereich von 4-40°C [119].

Die verschiedenen sensitiven Oberflächen sind ebenfalls erhältlich (wie im Kapitel 2.2.1.2 beschrieben) und eine Immobilisierung eines der Bindungspartner erfolgt online im Durchfluss.

3.1.3.3 Das Resonant Mirror Gerät (IASys plus)

Für Bindungsstudien mit dem Resonant Mirror Verfahren wurde das von Affinity Systems vertriebene IASys plus Gerät verwendet.

Dieses Gerät operiert statt mit einer Fluidik mit einem gerührten Küvettensystem, um den konstanten Transport der Bindungspartner an die sensitive Oberfläche zu gewährleisten. Die sensitive Schicht befindet sich am Boden der Glasküvetten, welche von Hand mit der Probe befüllt werden. Da zwei Probenkammern vorhanden sind, kann eine als Referenzzelle verwendet werden. Der Vorteil ist hierbei, dass ein Verstopfen der Zelle bzw.

Mikroventile kaum möglich ist, theoretisch also auch mit „verunreinigten“ Proben gemessen werden kann.

Das Volumen der Messkammer ist mit dem eines Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte vergleichbar. Eine Messung ist mit einem Probenvolumen von 50 μl durchführbar, jedoch sollte die Küvette mit der Flüssigkeit gespült werden, so dass der Probenverbrauch pro Zyklus ca. 150 μl beträgt. Sowohl die Probe als auch Puffer und Regenerationslösung werden von Hand in die Messkammern pipettiert und können automatisch abgesaugt werden. Auch hier ist es möglich, die Probe wieder zurückzugewinnen. Nachteilig könnte sich das Probenhandhabungssystem aufgrund der starken Benutzerabhängigkeit auswirken.

Eine Referenzierung ist aufgrund der beiden parallel benutzbaren Flusszellen auch hier möglich, allerdings ist bei manueller Probenhandhabung ein geringer zeitlicher Versatz wahrscheinlich.

Auch hier kann mit Hilfe einer Auswertesoftware eine Kurvenanpassung nach verschiedenen Modellen vorgenommen werden.

Der Probendurchsatz ist durch das manuelle Verfahren limitiert; es kann aber ein Autosampler nachgerüstet werden.

Genau wie bei der SPR ist aufgrund des brechungsindexsensitiven Verfahrens eine genaue und stabile Temperaturkontrolle notwendig, welche auch hier über Peltierelemente gewährleistet wird. [120]

3.1.3.4 Das Young-Interferometer (IBS 101)

Für die Messungen am Young-Interferometer wurde das einzig vorhandene Setup vom Fraunhofer Institut für Physikalische Messtechnik (IPM), repräsentiert durch die seinerzeit neu gegründete Biodynamics AG (Allschwil, Schweiz), zur Verfügung gestellt.

Das Setup umfasst die Detektionseinheit, ein Flusssystem und eine Kontrollsoftware.

Eine zentrale Einheit des Detektionssystems ist eine Positionier-Halterung für den Wellenleiter-Chip, die es ermöglicht, ihn auf einer Aluminiumschiene

ohne komplizierte optische Justierung in den Strahlengang einzusetzen. Kleine Federn drücken ihn in eine feste Position, so dass er beim Einsetzen immer exakt gleich zu liegen kommt. Mechanische Toleranzen bei der Chippositionierung können so minimiert werden.

Die Lichtquelle, ein 4 mW He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von 632,8 nm, ist am Ausgang mit dem integriert-optischen Chip gekoppelt. Dieser wird durch eine schrittmotorgetriebene dreiaxige Mikropositioniereinheit ausgerichtet, die eine genaue Laserfokussierung im Submikrometerbereich über die gesamte Front des Sensorchips erlaubt (siehe Abbildung 16).

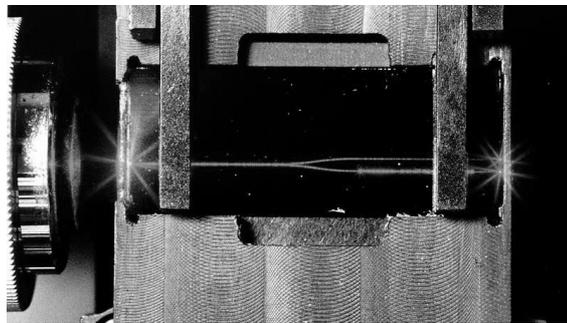


Abbildung 16: Integriert optischer Y-Wellenleiter, visualisiert durch Lichtstreuung des geführten Lichtes eines He-Ne-Lasers (IPM, Freiburg)

Die Kopplungseffizienz in Wellenleitern mit geringem Querschnitt hängt stark von der präzisen Fokuspositionierung ab. Für die Ausrichtung wurde eine Prozedur durchgeführt, die es ermöglichte, alle drei Raumrichtungen unabhängig voneinander zu optimieren. Eine Automatisierung durch Implementierung in einen Software-Algorithmus sollte die Prozedur auch für einen ungeübten Benutzer ermöglichen.

Der Y-Wellenleiter teilt den Strahl 1:1 in zwei Strahlen gleicher Intensität, in einen Signal- und einen Referenzarm. Am Chipende werden die beiden Strahlen ausgekoppelt und interferieren direkt miteinander. Das daraus entstehende Interferenzmuster wird mit einer linearen CCD-Kamera mit 2048 Pixel detektiert. Um die Intensität des Interferenzmusters zu verstärken, werden die beiden Strahlen mit einer zylindrischen Linse senkrecht zur Chipoberfläche fokussiert. Die räumliche Periode des Interferenzmusters bleibt hierbei erhalten. In Abbildung 17 ist das aufgenommene

Interferenzmuster eines Chips mit einem Abstand von $50\ \mu\text{m}$ zwischen den beiden Armen gezeigt.

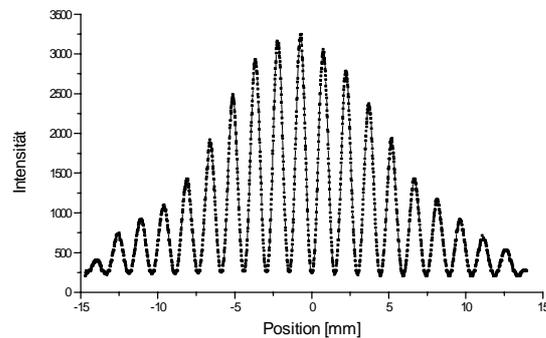


Abbildung 17: Intensitätsverteilung eines $50\ \mu\text{m}$ Y-Wellenleiters, mit einem CCD-Array detektiert (IPM, Freiburg)

Das Flusssystem besteht aus einer Peristaltikpumpe mit Zuleitungen und einer Flusszelle, die mit zwei unabhängigen Flusskanälen ausgestattet ist. Sie wird auf die Oberfläche des Sensorchips aufgespresst und ermöglicht es, auch zwei verschiedene Proben über Referenz- und Signalarm zu führen. Jede Flusszelle ist 12 mm lang und fasst ein Volumen von $10\ \mu\text{l}$. Die Probenzuführung erfolgt manuell oder über ein 8-Wegeventil (Abbildung 18).

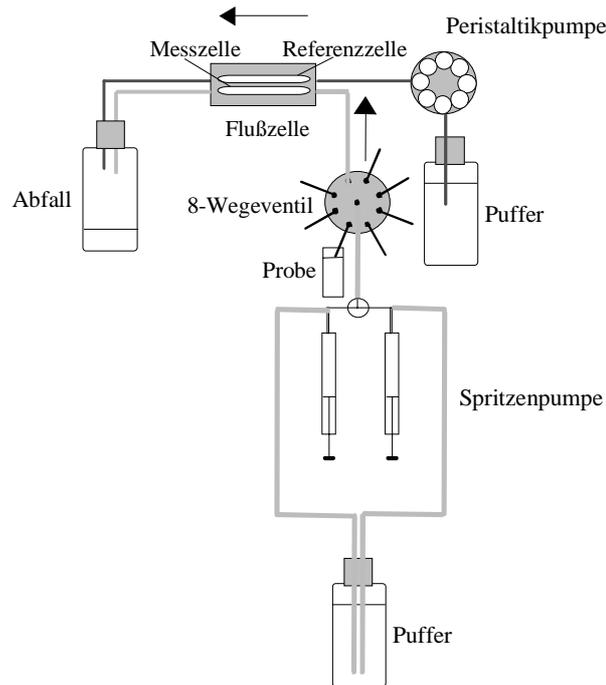
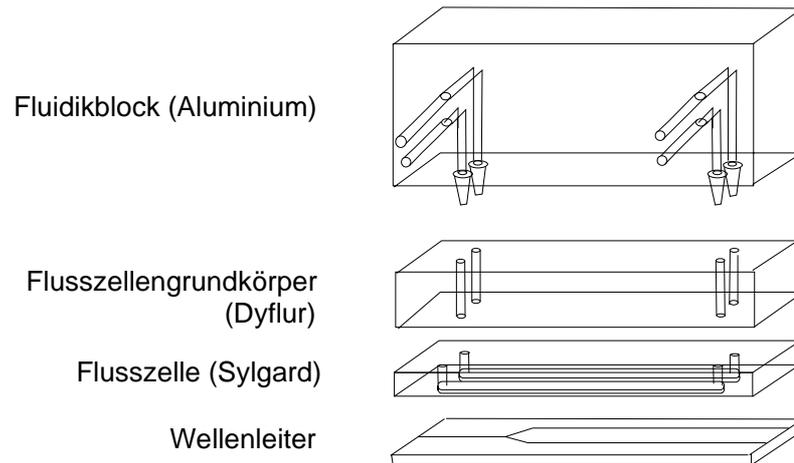


Abbildung 18: Fluidikaufbau beim IBS 101

Um ein Auskoppeln des Lichtes durch das Aufpressen der Flusszelle zu vermeiden, wurde hierfür ein Material mit sehr niedrigem Brechungsindex verwendet, am besten ist für diese Anforderung Teflon ($n = 1,33$) geeignet.

Die Fluidik wird mittels einer Rändelschraube auf den Wellenleiter aufgedrückt, wobei der Wellenleiter zuunterst auf eine bewegliche Schiene eingelegt und die gut gespülte und entfettete Flusszelle, bestehend aus zuerst Teflon, später Sylgard 170, verbunden mit einem Flusszellengrundkörper aus Duflor, mit einer Pinzette locker in die dafür vorgesehene Aussparung aufgelegt wird. Mit der Rändelschraube wird ein Fluidikblock aus Aluminium, an dem sich die Anschlüsse für die Fluidik befinden, auf die Flusszelle aufgedrückt und abdichtet, wie in Abbildung 19 gezeigt.



*Abbildung 19: Aufbau der Messzelle beim IBS 101:
Flusszellengrundkörper und Flusszelle waren herstellungsbedingt so verbunden, dass hierbei beide Komponenten direkt verbunden wurden.*

Die Y-Wellenleiter wurden am IPM gefertigt. Hierbei wurden Siliziumnitride, -oxinitride und -oxide mit einem Plasmaverfahren (plasma-enhanced chemical vapour deposition = PECVD) auf thermisch oxidierten Siliziumwafern abgeschieden. Stabilitätstests gegenüber aggressiven Substanzen zeigten hierbei zum Beispiel keinen Effekt gegenüber einer Mischung aus 20% H_2O_2 und 80% H_2SO_4 bei 60 °C über 5 min. Der Abstand der Wellenleiter betrug bei den Messungen hier 1 mm, da die Flusszelle mit zwei getrennten Flusskanälen benutzt wurden [76].

Zur Einkopplung und zur Signalaufzeichnung wurde eine vom IPM programmierte Routine verwendet, die auf diskreter Fouriertransformation beruht. Eine Beschreibung des Prinzips ist in [121] zu finden.

An dieser Stelle möchte ich ausdrücklich dem IPM Freiburg, insbesondere Herrn David Hradetsky, Herrn Andreas Wikerstål und Herrn Prof. Brandenburg, für die freundliche Unterstützung und die Überlassung der Abbildungen danken.

3.2 Methoden

3.2.1 Modifikation der Glastypoberflächen für die RfS-Detektion

3.2.1.1 Reinigung

Die Transducer wurden zunächst 2 min in 3 M NaOH eingelegt und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Oberfläche wurde danach mit Kim Wipes mechanisch gereinigt und getrocknet. Frisch zubereitete Piranha-Lösung (konzentrierte H_2SO_4 und H_2O_2 (30%) im Verhältnis 70 : 30, *Achtung: Sicherheitshinweis! Sowohl die Edukte als auch das Produkt sind stark ätzend, nach dem Mischen tritt eine starke Hitzeentwicklung auf, es ist daher unbedingt für geeignete Schutzmassnahmen zu sorgen!*) wurde für den letzten Reinigungsschritt im Ultraschallbad für 15 min verwendet. Damit wurde eine Anreicherung der Oberfläche mit Silanolgruppen erzielt. Zuletzt wurden die Transducer gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.2.1.2 Silanisierung

Die gereinigten SiO_2 Plättchen wurden mit 10 μl GOPTS ($10 \mu\text{l} / \text{cm}^2 = 45 \mu\text{mol} / \text{cm}^2$) bedeckt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h in einer geschlossenen Glaskammer wurden die Transducer mit trockenem Aceton (Wassergehalt max. 0.2 %) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet und zügig weiterverarbeitet.

3.2.1.3 Umsetzung mit einem Spacermolekül

A) AMD 260/10 auf silanisierten SiO_2 -Oberflächen:

Etwa 10 μl einer Lösung von 0.8 mM AMD 260/10 in bidestilliertem Wasser wurde auf einen frisch vorsilanisierten Transducer gegeben ($10 \mu\text{l} / \text{cm}^2 = 13 \text{nmol} / \text{cm}^2$) und, um Austrocknung zu verhindern, ein zweiter darübergedeckt (Sandwichmethode). Nach einer mindestens 8-stündigen Reaktionszeit in einer mit Wasserdampf gefüllten Glaskammer wurden die Plättchen mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

B) DA-bzw.DC-PEG auf silanisierten SiO₂-Oberflächen:

30 µl einer 1 mM Lösung von DA-bzw.DC-PEG in Dichlormethan (DCM) wurden auf die frisch silanisierten Transducer getropft ($30 \mu\text{l} / \text{cm}^2 = 10 \text{ nmol} / \text{cm}^2$). Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das PEG über Nacht bei 70 °C im Ofen geschmolzen. Anschließend wurden die Transducer gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.2.1.4 Umpolen der Amino- in Carboxylgruppen

Hierzu wurden 10 µl einer Glutarsäureanhydrid (GA) / DMF-Lösung (2 mg / 1 µl) auf jeden aminofunktionalisierten Transducer gegeben und ein Zweiter darübergedeckt (Sandwich). Die Reaktion dauerte 6 h in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer. Danach wurde der Transducer erst mit DMF und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

3.2.1.5 Modifikation der Oberfläche mit einem Liganden

Die Wahl der Methode zur kovalenten Bindung eines Liganden ist von seiner für die Modifikation zu Verfügung stehenden, funktionellen Gruppe abhängig. Im Falle einer *freien Aminogruppe* am Liganden wurden nach eventuellem Umpolen der funktionellen Aminogruppen an der Oberfläche durch Inkubation einer Lösung aus 1 mg Ligand und 1 µL N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in 5 µL DMF über Nacht in einer DMF-gesättigten Kammer immobilisiert.

Bei *freien Carboxylgruppen* am Liganden wie zum Beispiel bei Atrzacaprinsäure (ACA) wurden auf ein Plättchen eine Lösung aus 1 mg ACA, 10 µL DMF und 1 µL DIC (Diisopropylcarbodiimid) gegeben und mit einem weiteren Transducer im Sandwichverfahren immobilisiert. Nach einer sechsstündigen Reaktionszeit in einer mit DMF-dampfgesättigten Kammer werden die Transducer zunächst gründlich mit DMF und dann mit bidestilliertem Wasser gespült und trockengeblasen.

Liganden mit einer *Sulphydryl-Gruppe* können über 6-Maleimidocaprinsäure-N-Succinimidylester (EMCS) immobilisiert werden.

Dieses bifunktionelle Kupplungsreagenz ist ein Carbonsäurederivat, welches einen N-Succinimidylester trägt, mit dem es an eine Aminogruppe auf der Oberfläche gebunden wird [132].

Dazu wurde eine Lösung aus 1 mg EMCS in 10 μ L DMF auf einen mit Polymer belegten Transducer getropft und über Nacht in einer DMF-gesättigten Kammer reagieren gelassen. Anschließend wurde gründlich mit bidest. Wasser gespült. Die Anbindung des Liganden erfolgte in einer Lösung von 1 mg Ligand in 10 μ L DMF bzw. bidestillierten Wasser, über Nacht in einer dampfgesättigten Kammer.

Die Modifikation mit *Biotin* erfolgte mittels TBTU. Eine Lösung von 1 mg (4 μ Mol) Biotin und 1,4 mg (4,4 μ Mol) TBTU in 50 μ L DMF wurde hergestellt. Dabei löste sich das Biotin allerdings kaum. Zu dieser Suspension gab man 4 μ L (23,3 μ Mol) DIPEA und schüttelte kräftig durch, bis kein Niederschlag mehr zu erkennen war. Dabei verfärbte sich die Lösung leicht gelb. Von diesem Reagenz gab man dann sofort 5 μ L auf einen entsprechend vorbehandelten Transducer (Sandwichverfahren, DMF-Atmosphäre). Nach 30 min war die Reaktion abgeschlossen und die Transducer wurden mit bidestilliertem Wasser abgespült.

3.2.1.6 Oberflächenmodifikationen zur Bestimmung kinetischer Konstanten

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten sollte, wie im Theorieteil beschrieben, die Konzentration an Bindungsstellen an der Oberfläche eher niedrig sein. Dies kann auf drei verschiedenen Wegen erreicht werden. Zum einen kann der zu immobilisierende Ligand mit einer chemisch ähnlichen Komponente gemischt und so die Bindungsstellen an der Oberfläche verdünnt werden [122]. Ein anderer Weg zur Verdünnung der Bindungsstellen an der Oberfläche ist der Einsatz von stark verdünnten Lösungen [123]. Die dritte Möglichkeit besteht darin, die Reaktionszeit je nach Anforderung an die Oberflächenbeladung zu variieren, welche in diesem Fall für die Modifikation der RIfS-Transducer benutzt wurde [124]. Bei einer Reaktionszeit von genau 1 min mit dem Liganden (Thrombininhibitor) wurden bei der

Charakterisierung der Transducer, also bei der Bestimmung des Maximalsignals bei der Bindung des Thrombins, eine Beladung zwischen 300 und 500 pm gemessen.

3.2.2 Modifikation der CM5 Chips für das Biacore

Die Immobilisierung des Thrombininhibitors wurde online ausgeführt. Der CM5-Chip besitzt, wie schon in 2.2.1.2 beschrieben, eine mit Carboxyl-Gruppen modifizierte Dextranoberfläche. Thrombininhibitor (2,1 mg) wurde in 100 µl Natriumacetat-Puffer gelöst. Nach Aktivierung der Oberfläche mit einem 200 µl Puls frisch präparierter NHS/EDC-Lösung (im äquimolaren Verhältnis), wurde die Messzelle mit Fließpuffer gespült und 80 µl der Thrombininhibitorlösung bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert. Anschließend wurde die Oberfläche mit 70 µl einer Ethanolaminlösung geblockt, um die restlichen aktivierten Gruppen zu deaktivieren. Zuletzt wurde der Chip noch mit 20 µl Regenerationslösung, einer 1 M NaCl-Lösung, gespült. Die Referenzzelle wurde nicht beschichtet.

3.2.3 Immobilisierung auf CMD-Küvetten für IAsys plus

Auch hier wurde die Immobilisierung des Thrombininhibitors online verfolgt. Die Geschwindigkeit des Mikrorührers betrug 100 Rührbewegungen/min. Jede Flüssigkeit wurde jeweils dreimal getauscht, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Vor jeder Zuführung von Flüssigkeit wurde die Zelle trockengesaugt. Es wurden die in 2.2.1.2 beschriebenen CMD-Küvetten benutzt, welche bereits mit Carboxyl-Gruppen tragendem Dextran modifiziert sind.

Die Messzelle wurde 7 min lang mit 70 µl einer frisch präparierten EDC/NHS-Lösung aktiviert, anschließend mit PBS-Puffer gewaschen und dieser dann durch Acetat-Puffer ausgetauscht. Dann wurden 10 µl einer Thrombininhibitorlösung (1 mg/ml in Acetat-Puffer) für 5 min in die Zelle appliziert und danach mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Oberfläche mit Ethanolamin etwa 3 min lang deaktiviert. Zuletzt wurde die Zelle noch zweimal mit 1 M NaCl gespült.

3.2.4 Modifikation der SiO_xN_y -Wellenleiter-Oberflächen für das IBS 101

Die folgenden Schritte zur Reinigung und Modifikation der Wellenleiter wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt. Die Chips sollten grundsätzlich nur mit einer Teflonpinzette an den langen Kanten angefasst werden.

3.2.4.1 Reinigung und Silanisierung

Die Chips wurden zunächst wenige Sekunden bis eine halbe Minute in 3 M NaOH eingelegt und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Frisch zubereitete Carosche Säure (konzentrierte H_2SO_4 und H_2O_2 (im Verhältnis 20 zu 80%)), (*Achtung: Sicherheitshinweis! Sowohl die Edukte als auch das Produkt sind stark ätzend, nach dem Mischen tritt eine starke Hitzeentwicklung auf, es ist daher unbedingt für geeignete Schutzmassnahmen zu sorgen!*) wurde für den letzten Reinigungsschritt im Ultraschallbad 10 min lang verwendet. Dadurch wurde eine Anreicherung der Oberfläche mit Silanolgruppen erzielt. Zuletzt wurden die Wellenleiterchips gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Bei „recycelten“ Wellenleiterchips, d. h. bereits einmal mit PEG modifizierten Chips, genügt oft die Reinigungszeit von 10 min in Caroscher Säure nicht. Hier waren diese Behandlungen mehrmals bei einer erhöhten Temperatur im Ultraschallbad notwendig. Mikroskopaufnahmen bestätigen hier, dass dies keine erkennbare Zerstörung der Wellenleiter zur Folge hat.

Die gereinigten Chips wurden mit 15 μL GOPTS (ca. $10 \mu\text{l} / \text{cm}^2 = 45 \mu\text{mol} / \text{cm}^2$) bedeckt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h in einer geschlossenen Glaskammer wurden die Wellenleiterchips mit trockenem Aceton (Wassergehalt max. 0.2 %) gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und zügig weiterverarbeitet.

3.2.4.2 Umsetzung mit DA-PEG

40 μl einer 1 mM Lösung von DA-PEG in DCM wurden auf einen frisch silanisierten Chip getropft (ca. $30 \mu\text{L} / \text{cm}^2 = 30 \text{ nmol} / \text{cm}^2$). Nach

Verdampfen des Lösungsmittels wurde das DA-PEG über Nacht bei 70 °C im Ofen geschmolzen. Anschließend wurden die Chips gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Hiernach wurden die Chips im Mikroskop kontrolliert. Bei Flecken oder gar Kristallen auf den Wellenleitern wurden die Chips noch je zweimal mit einer Ethanol/Isopropanol-Mischung (30:70), Ethanol und bidestilliertem Wasser jeweils 10 min im Ultraschallbad behandelt.

3.2.4.3 Immobilisierung von Liganden

Die Immobilisierung von Liganden (hier: Atrazincapronsäure und Biotin) erfolgt wie oben für die Methode RIfS beschrieben, nur kann aufgrund der Empfindlichkeit der Wellenleiter keine Sandwichtechnik angewandt werden, daher muss sorgfältig auf eine ausreichende Dampfsättigung der Reaktionskammer geachtet werden.

Nach jedem Schritt der Reinigung und Modifikation sind die Chips im Mikroskop zu überprüfen, um gegebenenfalls zusätzliche Reinigungsschritte vorzunehmen.

Auch durch die Benutzung der Chips im Gerät wurden manchmal Verunreinigungen verursacht, die sich durch den Verlust der Intensität im Primärsignal bemerkbar machten. Hier wurde mit einer ausführlichen Reinigungsprozedur je zweimal mit einer Ethanol/Isopropanol-Mischung (30/70) je 10 min, Ethanol je 10 min, bidestilliertem Wasser jeweils 20 min, 0,1%ige SDS-Lösung je 10 min und zuletzt mit bidestilliertem Wasser jeweils 20 min im Ultraschallbad bei 40°C behandelt.

3.2.4.4 Reinigung der Flusszellen

Die vom IPM zur Verfügung gestellten Flusszellen (Grundkörper aus PEEK und Flusszelle aus verschiedenen Materialien Dyflor, Teflon, Sylgard 170) mussten vor jeder Benutzung zunächst mit einer Reinigungslösung (ein von Dow Corning bezogenes Tensid in 1:10 Verdünnung) 10 min im Ultraschallbad, anschließend mit Ethanol 10 min, mit Isopropanol 10 min und zuletzt mit bidestilliertem Wasser 10 min immer jeweils im Ultraschallbad

gereinigt werden. Hiernach durften die Flussküvetten nur noch mittels einer Pinzette angefasst werden, da nur ein absolut schmutz- und fettfreier Kontakt mit dem Chip die Führung des Laserstrahls in den Wellenleitern gewährleistet.

3.2.5 Kalibrierung der Methode RfS mittels spezifischer Bindung eines radioaktiv markierten Proteins

Sowohl die RfS- als auch die Szintillationsmessungen mit radioaktivem Protein wurden im Isotopenlabor der Universität Tübingen durchgeführt. Die entsprechende Arbeitsgenehmigung wurde beim Strahlenschutzbeauftragten erworben.

Für die Messungen mit radioaktiv markiertem Material wurden stopped-flow-Messzellen und ein üblicher RfS-Laboraufbau benutzt.

3.2.5.1 Konstruktion der Stopped-flow-Messzellen

Aus entsprechenden Vorversuchen mit einer offenen stopped-flow-Messzelle ging hervor, dass geringe Differenzen in der Füllstandshöhe der Zelle Auswirkungen auf das Signal haben wurden. Daher war es notwendig, eine geschlossene Zelle ohne eine für das Licht erkennbare Phasengrenze Probe-Luft zu konstruieren. Es wurde daher aus Plexiglas eine zylindrische Messzelle mit einem Einlass nahe der Transduceroberfläche und einem konisch zulaufenden Ende mit Auslaß konstruiert [125], wie in der folgenden Abbildung 20 gezeigt.

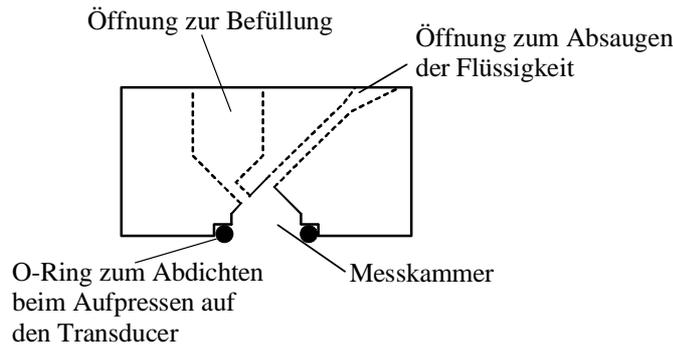


Abbildung 20: *Meniskuslose Messzelle für die stopped-flow Messungen mit radioaktivem Material*

3.2.5.2 RIFs-Messungen mit radioaktiv markiertem Protein

Es wurden Transducer mit Polyethylenglykol nach dem beschriebenen Protokoll modifiziert, und darauf nach [126] Biotin kovalent immobilisiert. Die Bindungsexperimente erfolgten mit einer definierten Konzentration an ^{125}I -Streptavidin. Das markierte wurde mit unmarkiertem Streptavidin verdünnt, da für die Zählrohrmessungen geringere Konzentrationen genügten, für die RIFs-Bindungsmessungen jedoch ein möglichst hohes Signal erhalten werden sollte.

Nach Aufnahme einer Basislinie über ca. 200 Sekunden hinweg, um eine größere Drift auszuschließen, wurde die entsprechende Konzentration an Streptavidin in die Messzelle injiziert und eine Bindungskurve während der Assoziation von ca. 600 s aufgenommen, bevor die Messkammer anschließend dreimal mit Puffer gespült und eine eventuelle Dissoziation 400 s verfolgt wurde. Die Transducer wurden anschließend ausgebaut, kurz mit Puffer abgespült und in ein Probenröhrchen gebracht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die sensitive Fläche nicht mit der Pinzette berührt und beschädigt wurde.

9 verschiedene Konzentrationen wurden jeweils dreimal vermessen und anschließend die Zunahme der Schichtdicke ausgewertet.

3.2.5.3 Messungen der absoluten Proteinmenge mittels Szintillationszähler

Die Transducer einer Messreihe wurden zeitgleich in einem Gamma-Counter vermessen. Da γ -Strahlung nicht gerichtet ist, spielte die Lage der Plättchen in den Röhrcen keine Rolle.

Vor jeder Messreihe wurde ein Standard mit ^{129}I (Halbwertszeit $1,7 \cdot 10^7$ Jahre) gemessen, um die Effizienz des Counters zu kalibrieren.

Die Ausgabegröße des Counters ist cpm (counts per minute). Nach Korrektur durch die mit Hilfe des Standards erhaltene Effizienz können hieraus die Zerfälle pro Sekunde, d. h. Becquerel (Bq) ermittelt werden. Die Effizienz des benutzten Counters lag bei ca. 80%.

Für eine Standardabweichung von 2% sollten mindestens 10000 Zerfälle pro Minute gemessen werden (Angaben des Herstellers). Bei den hier durchgeführten Messungen wurde eine Zeit gewählt, die eine Standardabweichung von $<0,5\%$ gewährleisten soll.

3.2.5.4 Bestimmen der benetzten Fläche der Transducer mittels Fluoreszenz

Zur Korrelation der Fläche des Transducers, auf dem tatsächlich Bindung stattfindet, mit der Aktivität, musste die genaue Fläche ermittelt werden. Dazu wurden Bindungsexperimente mit Cy5-markierten Anti-Atrazin-Antikörpern an einer mit einem Atrazin-Derivat modifizierten Fläche durchgeführt und die Fläche in einem Fluoreszenz-Imager ausgewertet. Die Auflösung des Imagers betrug $20 \mu\text{m}$.

Es wurden zur Feststellung der Fläche zwölf Bindungsexperimente in der dafür konstruierten Messzelle durchgeführt, der Transducer jeweils ausgebaut und im Imager vermessen. Mit Hilfe des Image Tools wurde fünfmal eine Gerade durch jede Fläche gelegt und so der Durchmesser ermittelt. Die daraus berechnete Fläche konnte so mit der gemessenen Radioaktivität korreliert werden.

Der durch das Ausmessen verursachte Fehler und die eventuelle Differenz durch den Messvorgang betrug 1,47%.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung und Weiterentwicklung des IBS 101

Der Prototyp des IBS 101 wurde am Fraunhofer Institut für physikalische Messtechnik in Freiburg entwickelt und sollte durch die Firma Biodynamix kommerzialisiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Prototyp evaluiert und verbessert.

Im Mittelpunkt stand die Etablierung einer Methode für den Aufbau der organischen Schichten für die Assay-Entwicklung am IBS 101. Insbesondere sollte die spezifische Bindung zwischen Biomolekülen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auch die bestehende Fluidik, die Detektionseinheit und die Software evaluiert und verbessert.

Erste Tests mit dem IBS 101 für dessen Eignung als Biosensor wurden am IPM Freiburg gemacht. Untersucht wurde dabei die Wechselwirkung von Protein G mit einem Immunglobulin. Dabei wurde das Protein G an der zuvor silanisierten Wellenleiteroberfläche adsorptiv gebunden und die spezifische Wechselwirkung mit einem Immunglobulin detektiert [76].

Die sehr starken Signalschwankungen bei diesen Messungen wurden auf die mangelnde Reproduzierbarkeit der Protein-G-Immobilisierung zurückgeführt. Die Oberflächenkonzentration des Proteins G schwankte beträchtlich, abhängig von der Effektivität der Silanisierung, der Art des verwendeten Protein G, der Lagerungsdauer des Proteins im Kühlschrank, der Häufigkeit des Auftauens und so weiter. Somit wurde das Hauptproblem für die Eignung des IBS 101 als Biosensor in der wenig reproduzierbaren adsorptiven Immobilisierung gesehen und eine Methode zur kovalenten Immobilisierung angestrebt.

4.1.1 Allgemeine Parameter

Zu Beginn der Arbeiten mit dem IBS 101 war es schwierig, allgemeine Parameter wie das Signalrauschen und somit die Sensitivität der Methode sowie Driften experimentell zu bestimmen und mit anderen Geräten zu

vergleichen, da Sprünge, unregelmäßige Driften sowie ein häufiger Verlust der Einkopplung selbst die Aufzeichnung von Basislinien unmöglich machten. Nach einem Umbau und der Verwendung anderer Materialien, wie in den beiden folgenden Abschnitten beschrieben, konnten unter optimalen Bedingungen diese Parameter bestimmt werden. In Tabelle 3 sind sie der Methode RIfS gegenübergestellt. Um eine Vergleichbarkeit der Daten untereinander zu gewährleisten, wurden die jeweiligen Einheiten in der Detektion in entsprechende Einheiten der Konzentration umgerechnet.

Hierzu wurde für die Methode RIfS auf die Kalibrierung des Systems mittels radioaktiv markierter Substanzen zurückgegriffen. Es ergab sich dafür eine Signaländerung von 1750 pm bei einer Änderung der Oberflächenbeladung von einem ng Substanz pro mm^2 (siehe auch Kapitel 4.2.3.1).

Für die Detektion mit dem Young Interferometer IBS 101 konnte hierfür nur ein theoretisch berechneter Wert herangezogen werden, da eine derartige Kalibrierung in diesem Fall noch nicht durchgeführt wurde. Dabei errechnet sich die Änderung der Oberflächenbeladung $\Delta\Gamma$ aus der Änderung des Signals Δn_{eff} mit $\Delta\Gamma = \Delta n_{\text{eff}} \cdot 8,29 \cdot 10^{-6} \text{ g/mm}^2$ [nach 76].

Für beide Methoden wurden RMS-Rauschen und Drift bei einer Baseline-Messung unter Verwendung thrombininhibitormodifizierter Transducer bestimmt.

	IBS 101	RiFS
RMS-Rauschen	64 pN _{eff}	0,8 pm
RMS-Rauschen (ausgedrückt in Einheiten der Oberflächenkonzentration)	530 fg/mm ²	460 fg/mm ²
Nachweisgrenze (3 x RMS)	190 pN _{eff}	2,4 pm
Nachweisgrenze (ausgedrückt in Einheiten der Oberflächenkonzentration)	1,6 pg/mm ²	1,4 pg/mm ²
Basislinie-Drift	130 nN _{eff} /h	10 pm/h
Basislinie-Drift (ausgedrückt in Einheiten der Oberflächenkonzentration)	182 pg/h·mm ²	5,7 pg/h·mm ²

Tabelle 3: Vergleich allgemeiner Parameter und der Nachweisgrenzen für das IBS 101 und die RiFS

Der Vergleich der Nachweisgrenzen zeigt, dass diese für beide Methoden im selben Bereich liegen. Für das IBS 101 wurde eine Nachweisgrenze von 1,6 pg/mm² und für die RiFS eine Nachweisgrenze von 1,4 pg/mm² ermittelt. Bei der Basislinien-Drift zeigt sich jedoch, dass für das IBS 101 ein über 30-fach höherer Wert als für das RiFS-System ermittelt wurde. Es ist zu vermuten, dass diese Drift von Ungleichmäßigkeiten in der Fluidik herrührt. Es muss auch beachtet werden, dass die interferometrische Detektion ein brechungsindexsensitives Verfahren ist und sich Temperatureinflüsse aus der Umgebung gravierend im Signal niederschlagen können. Da hier Referenz- und Messkanal relativ dicht beieinander liegen, können zwar Temperaturänderungen in der Umgebung herausgemittelt werden, jedoch können sich durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Pumpen für beide Kanäle die Bedingungen wie Temperatur und Druck doch etwas unterscheiden und Drift hervorrufen.

Insgesamt zeigt die Methode jedoch ein gutes Potential und ist durchaus vergleichbar mit anderen Methoden zur BIA.

Zur besseren Vergleichbarkeit des interferometrischen Systems mit anderen BIA-Instrumenten sollte jedoch eine Kalibrierung des Systems mit Hilfe radioaktiver Substanzen durchgeführt werden.

4.1.2 Limitierungen durch die Fluidik

Eine der Hauptlimitierungen des bestehenden Aufbaus verursachte die Probenhandhabung bzw. die Fluidik.

Zunächst wurde der Fluss durch beide Messkanäle mit einer Peristaltikpumpe im Druckmodus betrieben, d. h. die Pumpe befand sich vor der Messzelle und die Flüssigkeit wurde durch die Zelle gedrückt. Der dadurch verursachte Überdruck in der Zelle führte zu Undichtigkeiten und Luftblasen während der Messungen. Ebenso waren plötzliche Querschnittsänderungen im System und eine nicht geradlinige Fluidikführung von Nachteil, da sich hier Verschmutzungen, auskristallisiertes Salz des Puffers und Luftblasen festsetzten.

Die damit einhergehende unregelmäßige Fliessgeschwindigkeit führte zu sehr starken und sehr unregelmäßigen Driften ohne einheitliche Tendenz und teilweise periodischen Signaländerungen. Eine Korrektur des Signals durch Abzug einer einheitlichen Drift war hier unmöglich.

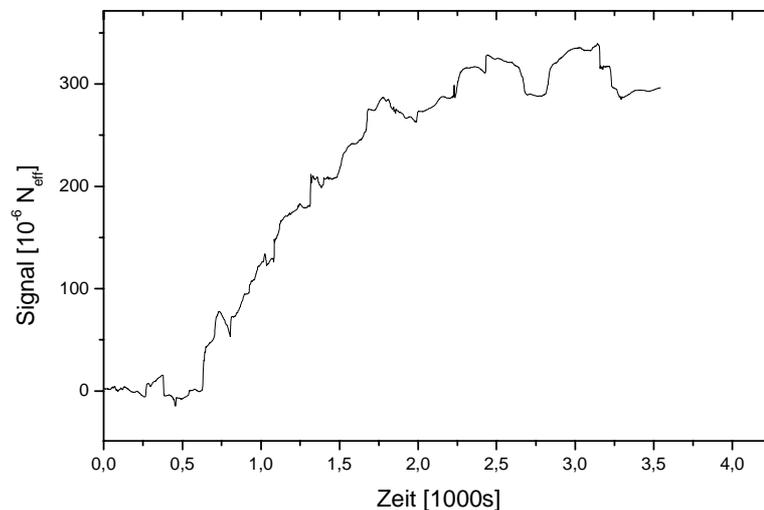


Abbildung 21: Starke Driften ohne einheitliche Tendenz, hervorgerufen durch ungleichmäßigen Druck in der Messzelle

Beim Befüllen des Systems zu Beginn mit Puffer blieben ebenfalls Luftblasen an den Querschnittsänderungen oder an der stark abknickenden Fluidik hängen. Verschmutzungen an diesen Stellen führten dazu, dass die im Puffer

gelöste Luft an diesen Stellen ausgas. Die Luftbläschen können sich dann während der Messung lösen und in die Messzelle gelangen und dort plötzliche Brechungsindexänderungen hervorrufen. Dies ließ sich durch häufiges Spülen des Systems oder durch Verwenden von entgastem Puffer nur teilweise beheben.

Um einen reproduzierbareren Fluss zu erreichen, wurde die Peristaltikpumpe für die Messzelle durch eine Hamilton-Spritzenpumpe ersetzt. Bei der in Abbildung 18 im Methodenteil gezeigten Anordnung wird die Referenzzelle permanent mit Puffer über die Peristaltikpumpe gespült. Der Messkanal hingegen kann über eine Spritzenpumpe präziser angesteuert werden. Dies führte zu einem stabileren Fluss. Jedoch sollten idealerweise sowohl im Referenz- als auch Messkanal gleiche Bedingungen herrschen, um eine optimale Referenzierung gewährleisten zu können. Das System wurde also nur zum Teil optimiert und bietet weiterhin auch noch Potential zur Verbesserung durch die Bewegung des Trägerpuffers durch die Messzelle mit Unterdruck, also ein Einsatz der Pumpe hinter der Flusszelle. Hierbei müsste der verwendete Trägerpuffer jedoch sorgfältig entgast werden, da es sonst zum Ausgasen des Puffers aufgrund des Unterdruckes kommen kann.

Das Totvolumen zwischen Ventil und Messkammer betrug ca. 100 μl , was eine erhöhte Dispersion, also eine Verdünnung der Probe mit dem nachfließenden Puffer, zur Folge hatte.

Ein häufiges Verstopfen der Fluidik mit auskristallisierendem Puffer beruhte auf der Konstruktion des Fluidikblocks, der durch ein rechtwinkliges Abknicken der Flusskanäle, wie im Methodenteil in Abbildung 19 gezeigt, ebenfalls zu einem unreproduzierbaren Fluss führte. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, hatte dies starke Driften zur Folge. Ebenso konnte die stark benutzerabhängige Aufpressung der Fluidik auf den Wellenleiter unterschiedliche Flusseigenschaften hervorrufen.

Zunächst wurde als Material für die Flusszellen Teflon eingesetzt. Die günstigen Eigenschaften wie Brechungsindex, Stabilität gegen Regenerationslösungen, wie zum Beispiel Säuren, und keine Beeinflussung

der Eigenschaften der biologische Moleküle zeichneten es als ein ideales Material aus. Die starke Hydrophobizität jedoch erschwerte die Befüllung der Zellen mit Wasser bzw. Puffer. Besonders bei den hydrophoben PEG-beschichteten Wellenleitern war eine Befüllung bzw. ein luftblasenfreies Messen unmöglich.

Als ein hydrophileres Material wurde deshalb Sylgard eingesetzt, ein Poly-Dimethyl-Siloxan (PDMS), das brechungsindexkonfektioniert bei Dow Corning bestellt werden konnte. Die PDMS-Flusszellen wurden direkt mit den Dyflor-Grundkörpern vergossen, so dass zwischen diesen Komponenten eine optimale Dichtigkeit erreicht wurde. (Diese Arbeiten wurden in Freiburg am IPM von Herrn Hradetsky durchgeführt.)

Sylgard 170 hatte die geforderten Eigenschaften sowohl bezüglich des Brechungsindexes als auch der Hydrophilität und Dichtigkeit. Mit Flusszellen dieses Materials ließen sich auch PEG-beschichtete Wellenleiter ohne erhebliche Befüllungs- und Luftblasenprobleme nutzen. Ebenso führte die verbesserte Halterung zu einem stabileren Fluss, wie die Basislinienmessung in Abbildung 22 zeigt.

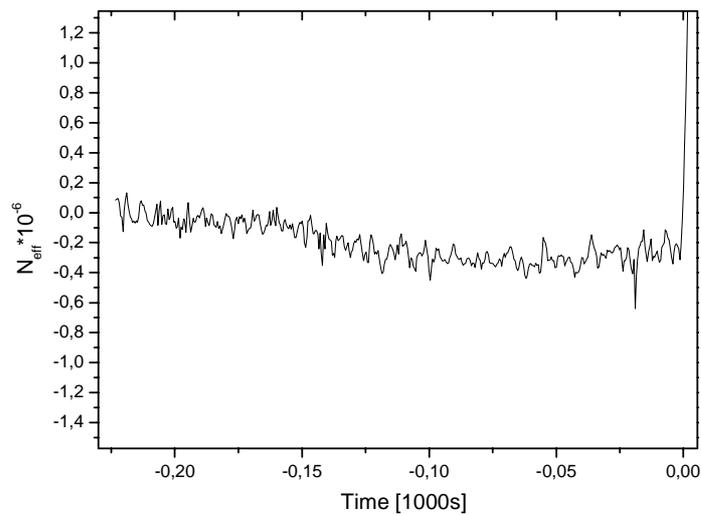


Abbildung 22 Stabile Baseline bei Einsatz von Sylgard-Flusszellen und nach Verbesserung der Halterung

Zur genaueren Charakterisierung der Fluidik wurde ein Konzentrationsprofil aufgenommen (vorgenommen mit dem bereits umgebauten IBS von Herrn Wikerstål, IPM Freiburg). Durch die Referenzzelle wurde mit Hilfe der Peristaltikpumpe ein konstanter Strom Wasser mit einer Flussgeschwindigkeit von $24 \mu\text{l}/\text{min}$ gepumpt. Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurde in der Messzelle ein ebenfalls konstanter Strom Wasser mit einer Geschwindigkeit von $69 \mu\text{l}/\text{min}$ erzeugt. In die Messzelle wurden nun verschiedene Volumina PBS injiziert und das Signal über die Brechungsindexänderung verfolgt, wie in Abbildung 23 gezeigt.

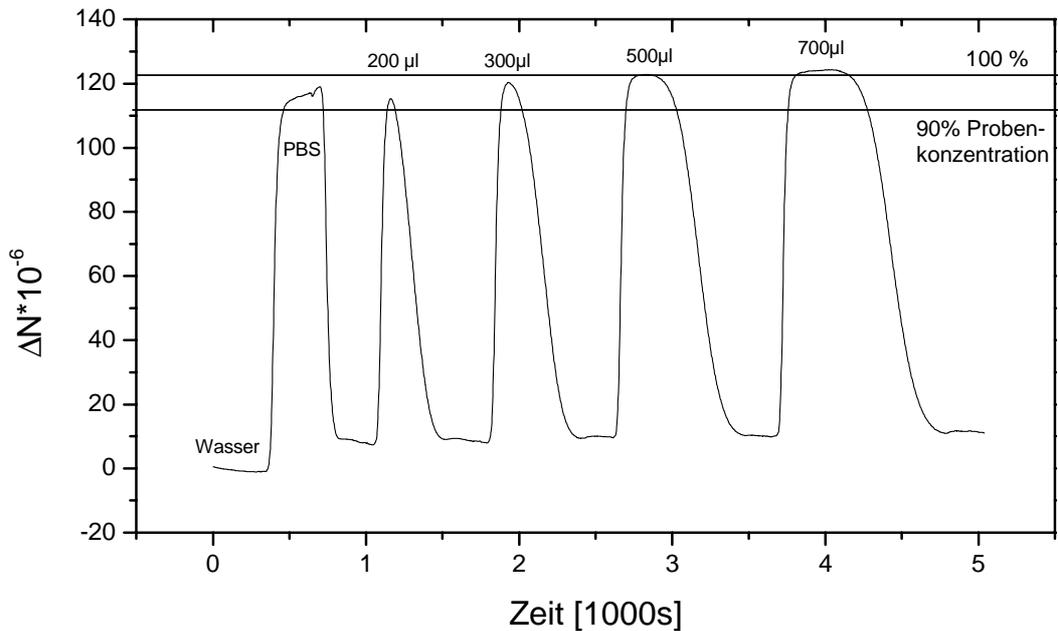


Abbildung 23: Konzentrationsprofile durch Injektion von verschiedenen Volumina PBS-Puffer in einen konstanten Strom Wasser

Es ist hierbei eine sehr starke Dispersion, also die Verdünnung der Probe durch den nachfließenden Laufpuffer zu erkennen. Für eine Injektion von 200 μl bzw. 300 μl Probe erreicht das Signal nicht einmal das Plateau, das bei einem vollständigen Austausch des Wassers in der Messzelle durch PBS erreicht werden kann.

Für erste Untersuchungen von z. B. der Bindung eines Antikörpers an sein immobilisiertes Antigen, wie später gezeigt, genügt oft eine Konzentration von 90 % Probe in der Zelle, es wurden daher die Zeiten erfasst, in denen das Signal mindestens diese Höhe erreicht. Sie sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst.

Injiziertes Probenvolumen [µl]	90%-Zeit [min]	Injektionsdauer [min]	Auswertbare Zeit der Injektion [%]
200	0.95	3.3	29
300	2.3	5	46
500	5.5	8.3	66
700	8.6	11.7	74

Tabelle 4: Auswertbare Zeiten, d. h. Zeiten mit „konstanter“ Konzentration an Probe in der Messzelle, während der Injektion verschiedener Probenvolumina

Die bei einer Injektion einer Probe verwertbaren, also durch zum Beispiel Kurvenanpassung auswertbaren Teile der so erzeugten Bindungskurven bewegen sich mit dem vorliegenden Aufbau je nach Probenvolumen zwischen 30 bis 75 Prozent der gesamten Injektionsdauer. Verglichen mit dem Laboraufbau der RIfS, bei dem ähnliche Experimente mit Farbstofflösungen um die 92 Prozent verwertbares Signal bei einer Injektion von 500 µl Farbstoff ergeben [124], zeigt sich hier, dass die Fluidik noch erheblich verbessert werden muss, hauptsächlich über die Verringerung des Totvolumens.

Auch bei einem Vergleich der Anstiegszeiten, das heißt der benötigten Zeit von Beginn der Injektion bis zum vollständigen Austausch des Trägerpuffers durch Probe, gab es ein ähnliches Ergebnis. Die Anstiegszeit beim IBS 101 betrug unter den gegebenen Bedingungen im Mittel 2,3 min, beim Laboraufbau der RIfS 0,16 min.

Weitere Untersuchungen der Fluidik wurden im Rahmen der Zusammenarbeit nicht gemacht, da das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung der organischen Schichten, nicht aber auf einer Evaluation und Weiterentwicklung der Fluidik lag.

Es wurde jedoch die Fluidik durch den Einsatz von präziseren Spritzenpumpen und verbesserten Materialien maßgeblich verbessert, dennoch besteht noch ein

gewisses Verbesserungspotential. Durch ein Betreiben des Flusses im Unterdruck können die nun noch zeitweise auftretenden Undichtigkeiten verhindert und durch Verkürzen der Wege die Totvolumina verringert werden. Gleiche Flussbedingungen sowohl in Mess- als auch im Referenzkanal wären ebenfalls von Vorteil.

Die Verbesserung und Weiterentwicklung der Fluidik des IBS 101 ist ein Beispiel dafür, dass der Fluidik eine entscheidende Rolle bei einem Gerät zur BIA zukommt. Sie kann eine große Limitierung darstellen.

4.1.3 Schichtpräparation und Limitierungen in der Detektion

Die bestehende Detektionseinheit war so konstruiert, dass ein automatisches Einkoppeln des Lasers möglich sein sollte. Der Chip wurde in eine Halterung eingelegt und in den Strahlengang geschoben. Durch kleine Federn wurde er in eine feste Position gedrückt und durch das Aufpressen der Fluidik mittels einer Rändelschraube vollständig fixiert. Das Einkoppeln des Laserstrahls in den Wellenleiter sollte durch die feste Position des Chips in der Halterung mit Hilfe der Software zur Ansteuerung der Mikropositioniereinheit (programmiert durch Herrn Andreas Wikerstål, IPM Freiburg) ohne erheblichen Aufwand und sehr rasch durchgeführt werden können.

Das Aufpressen der Fluidikeinheit in der Mitte des Wellenleiters verursachte, hervorgerufen durch ein Verbiegen des seitlich aufliegenden Chips, in vielen Fällen einen Verlust der Einkopplung. Die Modifizierung der Halterung von zwei seitlichen Auflagepunkten zu einer breiteren Auflagefläche (vorgenommen vom IPM Freiburg) ermöglichte eine stabilere und reproduzierbarere Einkopplung des Lasers.

Der Laserstrahl, dessen Stabilität und reproduzierbare Strahlungsleistung eine wesentliche Voraussetzung zur Qualität der Detektion beim Young Interferometer ist, wurde im ersten in Tübingen evaluierten Aufbau durch einen Halbleiterlaser verwirklicht.

Dieser lieferte jedoch, auch nach Stabilisierung der Temperatur mittels eines Regelkreises, aufgrund von rückgestreutem Licht kein stabiles Ausgangssignal, was bei Messungen zu starken Driften, Sprüngen in der

Detektion und zu Verlust einer effizienten Einkopplung führte. In der folgenden Abbildung 24 ist eine solche typische Baseline gezeigt.

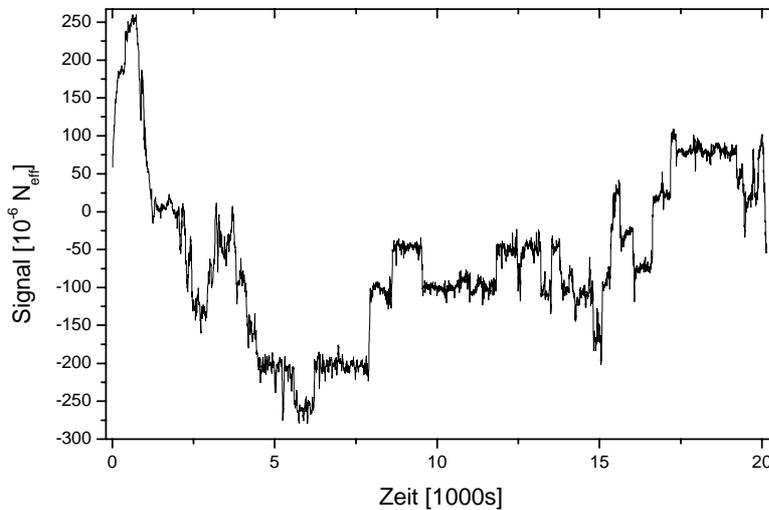


Abbildung 24: *Baselinedrift und Signalsprünge beim IBS 101 bei Verwenden eines Halbleiterlasers*

Durch den Ersatz des Halbleiterlasers durch einen 4mW He-Ne-Laser wurde die Stabilität erheblich verbessert. Es konnte dann auch ohne aufwendige Temperaturstabilisierung gearbeitet werden. Im Hinblick auf eine spätere Kommerzialisierung war jedoch der Einsatz des wesentlich kleineren und billigeren Halbleiterlasers gewünscht, wobei dabei ein zusätzlicher Aufwand einer Temperaturstabilisierung notwendig war.

Weitere Limitierungen in der Detektion bis hin zu einer kompletten Auskopplung des Lichtes an verschmutzten Stellen des Wellenleiters konnten nicht zuletzt auch durch Unsauberkeiten bei der Modifikation der Chips hervorgerufen werden. Schon bei den früher an adsorptiv immobilisierten Schichten durchgeführten Messungen in Freiburg wurde festgestellt, dass die Oberfläche der Wellenleiter allein schon durch die Silanisierung eine höhere Streuung des geführten Lichtes aus dem Wellenleiter heraus zur Folge hatte. Der Aufbau komplexerer organischer Schichten wurde daher unter besonderer Sorgfalt im Reinraum durchgeführt.

Die Modifikation der Wellenleiter wurde entsprechend der für die RfS entwickelten Oberflächenchemie durchgeführt. Das heißt, die auf den Siliziumwafer aufgetragenen Siliziumoxynitridwellenleiter wurden zunächst mittels Caroscher Säure hydroxyliert, die freien OH-Gruppen mit GOPTS silanisiert. Nach anschließender Reaktion mit einem funktionalisierten Polyethylenglykol oder mit Aminodextran wurde der funktionalisierte Ligand, zum Beispiel derivatisiertes Atrazin, mittels Peptidbindung an die Polymerschicht gebunden. Für den Nachweis einer reproduzierbaren spezifischen Bindung wurde hier die Wechselwirkung zwischen Atrazin und zwei verschiedenen spezifischen Anti-Atrazin-Antikörpern benutzt. Eine ausführliche Beschreibung der Schichtpräparation ist im Methodenteil dieser Arbeit zu finden.

Nach jedem Schritt der Modifizierung wurden die Wellenleiter mit dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls noch zusätzliche Reinigungsschritte durchgeführt. Selbst kleinste Kristalle auf der Wellenleiteroberfläche konnten zu starken Streuungen bis hin zum Auskoppeln des geführten Lichtes an dieser Stelle führen, was die Detektionstechnik wesentlich anspruchsvoller im Bezug auf die Sauberkeit bei der Präparation der organischen Schichten als zum Beispiel RfS machte.

Bei Auftreten von Verschmutzungen nach einem Modifikationsschritt, wurden zur Reinigung zunächst die Lösungsmittel benutzt, in denen auch die immobilisierte Komponente gelöst wurde, und die Wellenleiter 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach schloss sich noch ein Reinigungsschritt mit Isopropanol : Ethanol (3:1), Ethanol und schließlich bidestilliertem Wasser an, um eventuelle Lösungsmittelreste komplett zu entfernen.

Benutzte Wellenleiter konnten mit Hilfe von Caroscher Säure wieder recycelt werden, wie im Methodenteil beschrieben wurde. Die Behandlung beschädigte die Wellenleiter nicht sichtbar (Kontrolle erfolgte mit dem Mikroskop), jedoch traten Verschmutzungen bei der Schichtenpräparation vorzugsweise bei recycelten Chips auf. Eine grundsätzliche Untersuchung der Rauigkeit bzw. der Abtragung der SiO_xN_y -Schichten bei dieser Behandlung mit Hilfe von

Kontaktwinkeluntersuchungen bzw. Ellipsometrie erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, wäre aber im Hinblick auf eine Kommerzialisierung der Technik und eine dann notwendige Automatisierung der Chipproduktion anzuraten.

Die Veränderungen in der Geometrie der Wellenleiter durch verschiedene Abstände der beiden Wellenleiterausgänge (vorgenommen durch das IPM Freiburg), sichtbar durch das veränderte detektierte Interferenzmuster im CCD-Array, führten zu keinen sichtbaren Verbesserungen in den Messungen hinsichtlich Rauschen oder Drift.

Es konnte entsprechend der bei der RIfS angewendeten Modifikationen auch für die Wellenleiter des IBS 101 ein Aufbau organischer Schichten etabliert werden, der dafür geeignet war, derivatisierte Liganden kovalent auf der Oberfläche der Wellenleiter zu immobilisieren.

Durch Einsatz eines He-Ne-Lasers, der Veränderung der Halterung und durch eine Optimierung der Behandlung der Siliziumoxynitridoberflächen konnte ein stabiles System geschaffen werden, bei dem eine optimale Einkopplung, eine minimierte Streuung des geführten Lichtes und somit eine möglichst hohe und gleichmäßig auf beide Arme der Y-Wellenleiters verteilte Lichtausbeute Voraussetzung ist.

4.1.4 Reproduzierbarkeit spezifischer Bindung

Im Rahmen der Etablierung der Oberflächenchemie für die Detektion biomolekularer Wechselwirkungen mit dem IBS 101 wurden erstmals spezifische Wechselwirkungen zwischen einem an der Oberfläche der Wellenleiter kovalent immobilisierten Liganden und dem entsprechenden freien Analyten gemessen. Davor wurden Biomoleküle mit dem Young Interferometer Aufbau nur durch Adsorption an eine silanisierte Oberfläche detektiert.

Zunächst sollte die Reproduzierbarkeit der Chipmodifikationen festgestellt werden. Hierzu wurden immer je 20 verschiedene Chips der gleichen Modifikationsprozedur unterzogen. Die Oberfläche der Wellenleiter wurde dafür analog des im Methodenteil beschriebenen Protokolls mit funktionalisiertem Polyethylenglykol modifiziert und das Hapten

Atrazincapronsäure (ACA) kovalent über eine Peptidbindung gebunden. Durch eine hohe Belegung der Oberfläche mit Hapten und eine geringe eingesetzte Konzentration an Antikörper wurde eine im massentransportlimitierten Bereich befindliche Bindung sichergestellt. In Abbildung 25 sind jeweils Dreifachmessungen der spezifischen Bindung einer 5 µg/ml Lösung des Antikörpers K4E7 an kovalent immobilisiertes ACA auf drei verschiedenen Wellenleitern im Vergleich dargestellt.

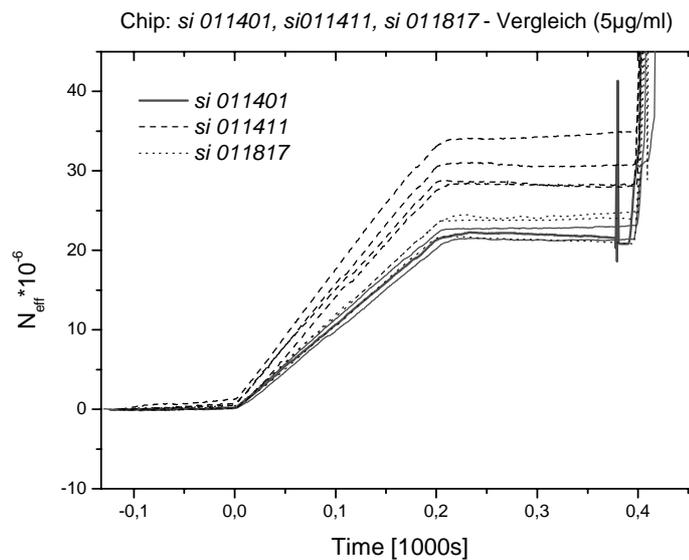


Abbildung 25: Reproduzierbarkeit in der Chipherstellung –mit drei verschiedenen Wellenleitern wurden mit denselben Konzentrationen beprobt (jeweils Dreifachmessung)

Zum Vergleich der Reproduzierbarkeit innerhalb der Messungen mit einem Chip und der Messungen mit verschiedenen Wellenleitern wurden jeweils die Steigungen der Bindungskurven bestimmt (siehe Tabelle 5).

Wellenleiterchip Nr.	Steigung [$10^{-6} N_{\text{eff}}/1000 \text{ s}$]
si 011 401	$106,8 \pm 3,8$
si 011 411	$149,4 \pm 11,6$
si 011 817	$114,5 \pm 4,3$

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der Steigungen während der Bindung innerhalb der einzelnen Chips

Die Standardabweichungen des Mittelwertes liegen hierbei zwischen 3,5 % und 8 %.

Beim Vergleich zwischen den verschiedenen Wellenleitern ergibt sich für die Bindung ein Wert für die Steigung von $(126,2 \pm 21,5) \cdot 10^{-6} N_{\text{eff}}/1000\text{s}$. Die Standardabweichung der Steigungen liegt bei 17 %, was auch eine gute Reproduzierbarkeit bei der Chipherstellung schließen lässt.

Zur weiteren Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörpers K4E7 unter Verwendung eines Chips injiziert, die entsprechenden Steigungen der Bindungskurve bestimmt und die Bindung anschließend wieder regeneriert.. In Abbildung 26 sind Bindungskurven für die Bindung von 5, 10 20 und 30 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper gezeigt.

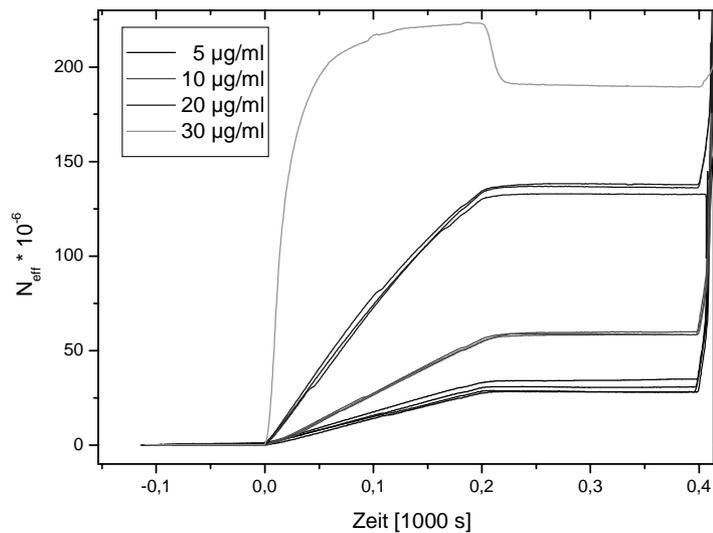


Abbildung 26: Spezifische Bindung von verschiedenen Konzentrationen des Anti-Atrazin-Antikörpers K4E7

Eine lineare Kurvenanpassung wurde für die Konzentrationen 5, 10 und 20 µg/ml durchgeführt, wie in Tabelle 6 gezeigt ist.

Konzentration K4E7 [µg/ml]	Steigung [$10^{-6} N_{\text{eff}}/s$]	Standardabweichung [%]
5	$0,150 \pm 0,013$	8,4%
10	$0,300 \pm 0,012$	4%
20	$0,700 \pm 0,008$	1%

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Steigungen während der Assoziation verschiedener Konzentrationen

Zum Vergleich mit der Methode RIFs wurde eine Titration von K4E7 mit Atrazin herangezogen. Detektiert wurde in diesem Bindungshemmtest [87] die restliche freie Menge an K4E7 in Dreifachmessungen für jede Konzentration. Auch hier wurden die Steigungen sowie deren Standardabweichungen betrachtet. Da bei den RIFs-Messungen reproduzierbare Korrelationen zwischen eingesetzter Antikörpermenge und Signal in der Steigung bekannt

sind und eine lineare Extrapolation bei Annahme des 1. Fickschen Gesetzes vorgenommen werden kann (eine Steigung von 1 pm/s entspricht einer Konzentration von 250-500 ng/ml), wurde hier von einer Korrelation 1 pm = 500 ng/ml ausgegangen und die detektierte Antikörperkonzentration abgeschätzt. (Tabelle 7)

Atrazinkonzentration [µg/l]	Ca. Konzentration K4E7 [ng/ml]	Steigung [pm/s]	Standardabweichung [%]
1 · 10 ⁻¹⁰	500	1,000 ± 0,017	1,7
0,1	503	1,010 ± 0,026	2,5
0,2	473	0,950 ± 0,034	3,6
0,5	450	0,900 ± 0,008	0,9
1	287	0,570 ± 0,058	10,2
2	66	0,130 ± 0,002	1,5
5	34	0,070 ± 0,007	9,4
10	24	0,050 ± 0,009	19,4
20	20	0,040 ± 0,009	23,2
50	21	0,040 ± 0,004	10,1
100	29	0,060 ± 0,039	68,1

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit der Steigungen bei einer K4E7-Titration mit RI/S

Die Standardabweichungen der erhaltenden Steigungen der massentransportlimitierten Bindungen lagen beim IBS 101 zwischen einem und acht Prozent und nahmen mit höherem Signal, also höherer Konzentration ab. Die niedrigste gemessene Antikörperkonzentration beim Vergleich der Reproduzierbarkeiten war 5 µg/ml.

Bei den entsprechenden Messungen der Bindung des Antikörpers zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit mit der Methode RIfS wurde zum Beispiel für die Detektion der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 ng Antikörper eine Standardabweichung von rund zwei Prozent ermittelt. Trotz der mit der RIfS detektierten zehnfach niedrigeren Konzentration liegen die Standardabweichungen etwa im selben Bereich.

Die Reproduzierbarkeit ist für Messungen am IBS 101 also etwa um den Faktor 10 schlechter, aber dennoch in einem angemessenen Bereich. Eine Wiederholung der Messungen im gleichen Konzentrationsbereich, wie im Beispiel RIfS gezeigt, war aufgrund auftretender Driften mit dem gegebenen Setup nicht möglich.

4.1.5 Spezifische Bindung von Antikörpern

Zum Nachweis der Bindung wurde zunächst ein normaler Bindungsassay implementiert, der Assoziation und Dissoziation des Antikörpers sowie die Regeneration der Oberfläche umfasst.

Die Bindung des Antikörpers wurde mit einer sauren Pepsinlösung regeneriert und die Oberfläche stand danach für eine erneute Bindung zur Verfügung, siehe Abbildung 27.

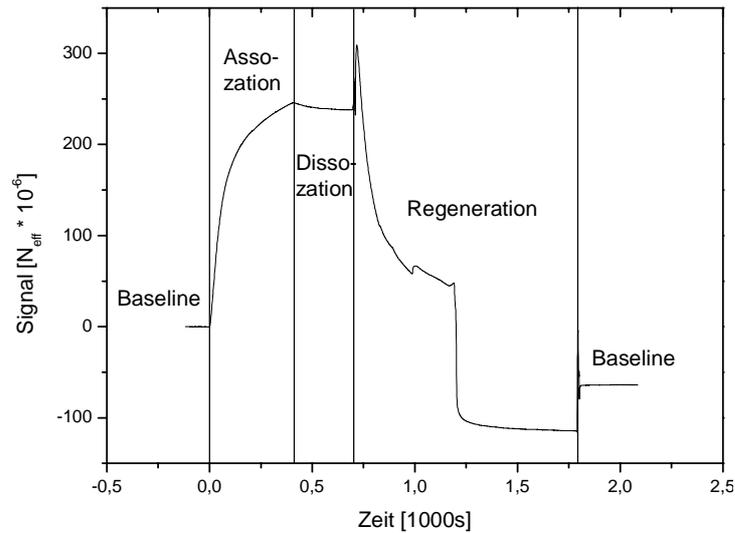


Abbildung 27: Spezifische Bindung des Antikörpers K4E7 auf kovalent auf einem Wellenleiter immobilisierten Atrazin

Um die Spezifität der Bindung zu prüfen, wurden nun verschiedene Konzentrationen Antikörper (5, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100 $\mu\text{g/ml}$) injiziert und die Bindung detektiert, wie in Abbildung 28 gezeigt.

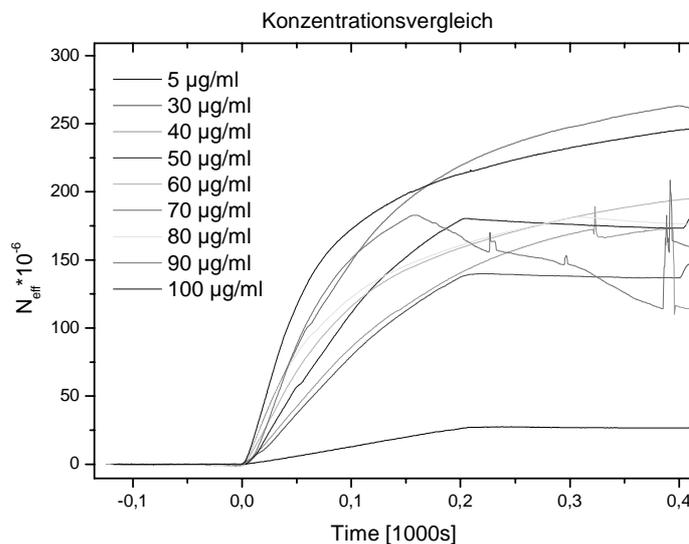


Abbildung 28: Assoziationskurven verschiedener Antikörperkonzentrationen

Da die Injektion manuell vorgenommen wurde, konnten nicht exakt gleiche Injektionszeiten eingehalten werden. Es ist jedoch erkennbar, dass mit steigender Konzentration ein zunehmend höheres Signal erzielt werden konnte, was auf eine spezifische Bindung schließen lässt.

Zum ersten Mal wurde hier also mit dem IBS 101 eine spezifische Wechselwirkung zwischen einem kovalent immobilisierten und einem weiteren Biomolekül reproduzierbar detektiert. Mit der Injektion steigender Antikörper-Konzentrationen wurden steigende Bindungssignale erzielt und es konnten auch reproduzierbare Ergebnisse bei wiederholten Assoziationen an den modifizierten Wellenleiter erzielt werden. Untereinander sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten modifizierten Wellenleiter vergleichbar und liefern stabile und reproduzierbare Signale.

Leider konnten die Daten nicht die kinetischen Konstanten aus den Kurven ermittelt werden, da die auswertbaren Bereiche, d. h. die Bereiche der Kurven bei denen stets unverdünnte Probe über den Sensorchip injiziert wurde und man eine Kinetik pseudo-erster Ordnung annehmen kann, nur sehr klein waren.

Sowohl die Limitierungen in der Detektion, hauptsächlich jedoch die der Fluidik, machten eine Auswertung der Daten hinsichtlich der Ratenkonstanten, also der Kinetik, und einen Vergleich mit den anderen hier verwendeten Systemen unmöglich.

4.1.6 Nachweis spezifischer Bindung kleiner Moleküle

Um das Potential der interferometrischen Detektion nachzuweisen, wurde nun versucht, die spezifische Bindung eines kleinen Moleküls zu detektieren. Hierzu wurde Streptavidin an eine kovalent mit Biotin modifizierte Oberfläche gebunden und versucht, die Bindung des sehr kleinen Moleküls Biotin mit einem Molgewicht von 247 g/mol nachzuweisen. Dabei wurden 700 µl einer 100 µg/ml hoch konzentrierten Biotinlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 µl/min injiziert, und die Assoziation an die modifizierte Oberfläche des Wellenleiters detektiert.

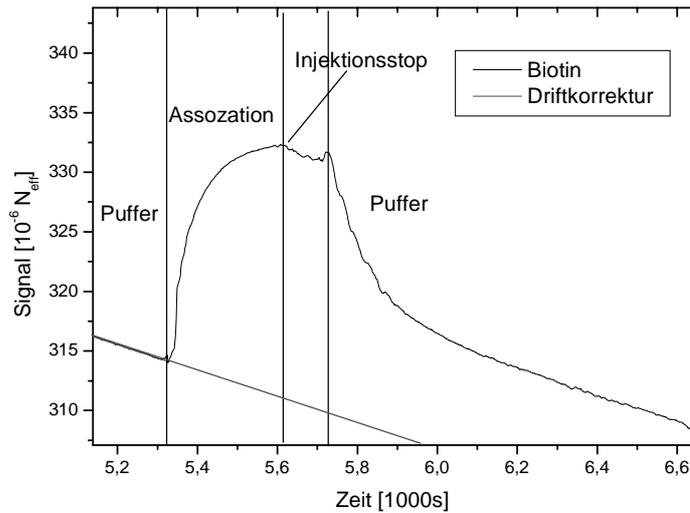


Abbildung 29: Spezifische Bindung von Biotin an auf einem Wellenleiter immobilisiertes Streptavidin mit Driftkorrektur

Nach Korrektur der Drift resultierte durch die Bindung des Biotins ein Signal von $9,2 \cdot 10^{-6} N_{\text{eff}}$. Trotz einer starken Drift des Signals konnte die Bindung nachgewiesen werden.

Bei der hier ermittelten Nachweisgrenze von $190 \text{ pN}_{\text{eff}}$ liegt das Signal also etwa um das 50fache höher als der Mindestwert für einen Nachweis der Bindung und zeigt das Potential der Detektionstechnik.

4.1.7 Zusammenfassung

Der vom IPM Freiburg zur Verfügung gestellte Prototyp des IBS 101 wurde im Rahmen einer Evaluierung der Technik und der Entwicklung einer Schichtpräparation für die Wechselwirkungsmessung von biologischen Molekülen hinsichtlich der Eignung für die BIA in Tübingen untersucht. Dabei wurden auch Fluidik, Detektion und Software untersucht und verändert. Erste Messungen von Interaktionen zwischen Protein G und einem Immunglobulin in Freiburg zeigten nicht die gewünschte Reproduzierbarkeit, daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für eine kovalente Immobilisierung geschaffen werden.

Das IBS 101 zeigte starke und unregelmäßige Driften, welche nach einer Veränderung der Fluidik und dem Ersetzen des Halbleiterlasers durch einen He-Ne-Laser stark eingeschränkt werden konnten.

Beim Vergleich von Rauschen und der daran gekoppelten Nachweisgrenze konnten mit dem IBS 101 die Werte der RIfS nahezu erreicht werden. Hierzu konnte bei der RIfS von einer ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Signalkalibrierung ausgegangen werden. Für das Young-Interferometer musste hierfür auf theoretische Berechnungen zurückgegriffen werden. Bei einem Vergleich der Basislinien-Drift zeigte sich jedoch, dass das IBS 101 einen weitaus höheren Wert als die RIfS erzielt. Hier ist zu beachten, dass bei der interferometrischen Detektion, als einem brechungsindexsensitiven Verfahren, eine Referenzierung unabdingbar ist. Es sollten daher nicht nur Einflüsse der Umgebung wie Temperaturschwankungen herausgemittelt werden, sondern auch hinsichtlich der Fluidik ein Abgleich stattfinden.

Eine der Hauptlimitierungen verursachte die Fluidik. Undichtigkeiten und dadurch bedingter ungleichmäßiger Druck konnten durch ein neues Material für die Flusszellen stark eingeschränkt werden. Querschnittsänderungen und eine nicht immer geradlinige Flussführung verursachen immer noch Verstopfungen durch auskristallisierenden Puffer. Hier sollte die Fluidik komplett durchdacht und besonders die direkte Probenzuführung auf den Chip umkonstruiert werden. Hierbei könnten dann auch die zu großen Totvolumina verringert werden. Ebenso sollte die stark benutzerabhängige Chiphandhabung beim Einbau überdacht werden. Ein von Messung zu Messung nicht reproduzierbarer Anpressdruck verursacht unterschiedliche Drücke und Flussraten, somit ungleiche Dicke der Nernstschen Diffusionsschicht und damit unreproduzierbare Ergebnisse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Detektion mit dem IBS 101 ein Schichtaufbau für die Siliziumoxinitridwellenleiter entwickelt. Im Hinblick auf spätere kinetische Messungen wurde hier besonders Wert auf eine Polyethylenglykolmodifikation gelegt, aber auch ein Aminodextran zur Verfügung gestellt. Damit konnte zum ersten Mal reproduzierbar eine spezifische Antikörperbindung mit dem IBS nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeiten mehrerer Bindungsmessungen auf einem Wellenleiter,

sowie zwischen verschiedenen Wellenleitern untereinander ist hervorragend. Auch konzentrationsabhängige Messungen wurden erfolgreich durchgeführt, jedoch konnte keine Auswertung der Daten zur Ermittlung kinetischer Konstanten durchgeführt werden, da zu große Totvolumina eine starke Dispersion der Probe und somit kein monoexponentielles Verhalten der Bindungskurven zuließen. Es gelang auch der Nachweis der Bindung des kleinen Moleküls Biotin zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der Methode.

Abschließend lässt sich sagen, dass es sich bei der Interferometrischen Detektion mit dem Young Interferometer IBS 101 um eine Methode mit sehr gutem Potential handelt. Im Vergleich zur RfS und auch anderen kommerziellen Geräten ordnet sie sich anhand der Leistungsparameter gut in das Spektrum der markierungsfreien Detektionstechniken ein. Der Prototyp bietet noch Potential zur Verbesserung, besonders hinsichtlich der Fluidik und der Probenhandhabung. Im Hinblick auf eine Kommerzialisierung sollte jedoch noch eine Signalkalibrierung mittel radioaktiv markierten Substanzen vorgenommen werden. Die komplizierte Chipeinpassung bedarf ebenfalls noch einer Weiterentwicklung.

4.2 Vergleich der RIfS mit kommerziellen Geräten zur markierungsfreien Detektion

Um die Methode RIfS in das Spektrum der kommerziell erhältlichen Geräte für die Detektion und Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen einordnen zu können, wurden hier einmal allgemeine Detektionsparameter wie zum Beispiel die Sensitivitäten der Detektionsmethoden sowie Probenhandhabungssysteme und Reproduzierbarkeit der Messungen anhand der Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Thrombin und einem Thrombininhibitor ermittelt und verglichen. Eine Auswertung der Bindungskurven hinsichtlich der Kinetiken der Bindungen stellte eine erhöhte Anforderung an die Instrumente dar und wurde zum Vergleich der Techniken herangezogen. Dafür wurden Charakterisierungen am Thrombin-Thrombininhibitor-System mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), repräsentiert durch das am Markt führende Gerät BIAcore 2000, weiterhin mittels Resonant-Mirror-Technik, vertreten durch das IAsys plus, und durch den RIfS-Labora Aufbau durchgeführt und verglichen.

4.2.1 Fluidik und Probenhandhabung

Bei der Benutzung von Durchflusssystemen ist die zeitliche Auflösung der Detektion durch die Probenhandhabung limitiert; zum Beispiel ist eine gewisse Zeit notwendig, um die Flüssigkeit in der Messzelle auszutauschen. Beim Vergleich der drei Techniken wurden nur zwei Fluidiksysteme verwendet, beim dritten Gerät handelte es sich um ein Küvetten system.

4.2.1.1 Die Fluidik des RIfS-Systems

Um Daten für die Bestimmung von kinetischen Konstanten auszuwerten, ist es wichtig den Bereich der maximalen Probenkonzentration in der Messzelle zu kennen. Nur mit einer bekannten Konzentration der zu beobachtenden Komponente sind die erhaltenen Messwerte hinsichtlich der Bestimmung der Ratenkonstanten auswertbar.

Zu diesem Zweck wurden für den Laboraufbau der RfS Konzentrationsprofile aufgezeichnet, um nach der Injektion von Probe die Verteilung der Probe bei Einströmen in die Zelle und die Dispersion, das heißt die Verdünnung durch den nachströmenden Trägerpuffer, zu ermitteln.

Hierzu wurden Farbstofflösungen unter denselben Bedingungen in das System injiziert, wie die später zu messenden Substanzen und anhand der reflektierten Intensität die Konzentrationsänderungen bei Einspritzen aufgezeichnet. Eine genauere Beschreibung dieser Methode ist in [124] zu finden. Entsprechend der verschiedenen Diffusionseigenschaften möglicher Proben wurden Farbstoffe mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet: Indigokarmin (MG 466 g/mol), Dextranblau (MG 1 Million g/mol) und ein Cy5-markierter Antikörper (150 000 g/mol). Thrombin hat ein Molekulargewicht von 39 000 g/mol. In Abbildung 30 sind Konzentrationsprofile der verschiedenen Farbstoffe gezeigt. Die maximale Probenkonzentration wurde hier gleich 100 % gesetzt.

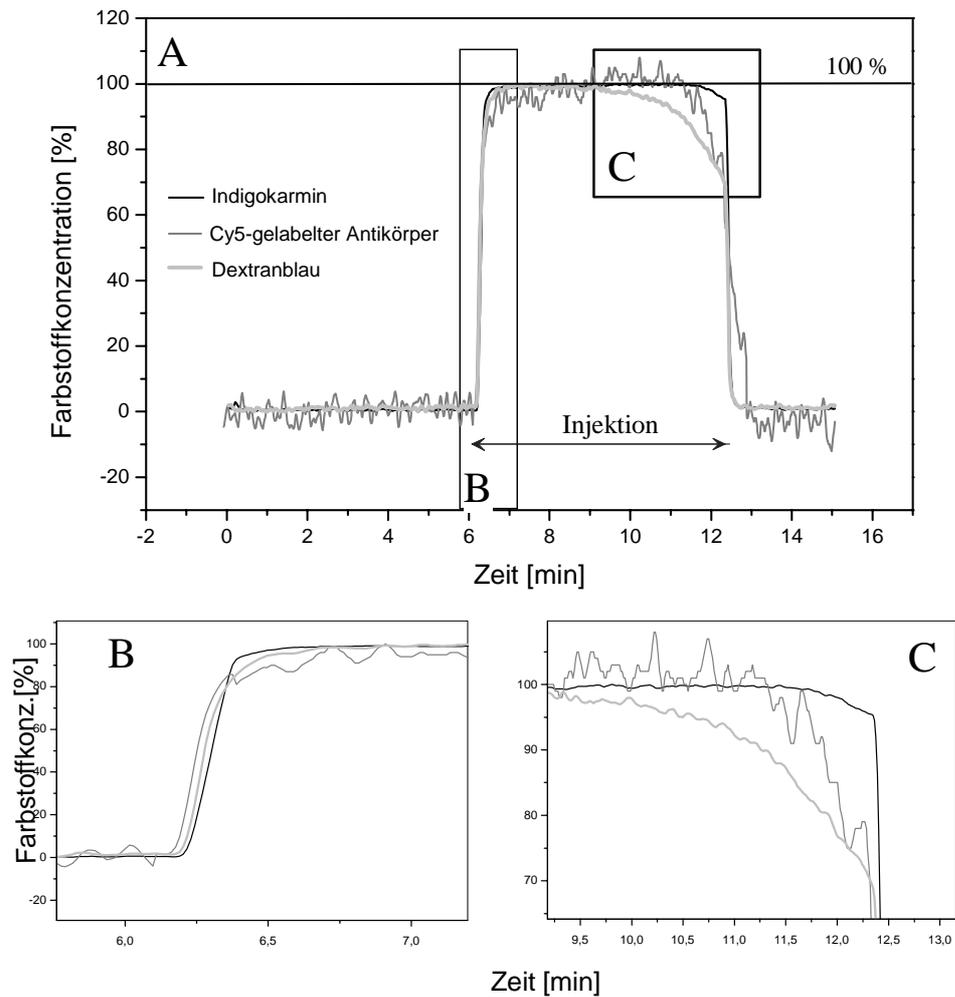


Abbildung 30: A) Bestimmung der auswertbaren Bereiche beim RI/S-System, welche durch die Verteilung des FIA-Peaks im Trägerstrom limitiert werden. (Das starke Rauschen des Antikörpers wird durch die sehr niedrige Konzentration der Komponente in der Lösung verursacht)
 B) Anstiegsbereich der Kurven, limitiert durch Eigenschaften des Fluidiksystems, wie das Totvolumen
 C) Fallende Konzentrationsbereiche, abhängig von der Molekülgröße.

Anhand dieser Konzentrationsprofile lassen sich die interessanten Zeiten bei einer Probeninjektion und somit die auswertbaren Bereiche der späteren Bindungskurven bestimmen (eine ausführliche Behandlung der Problematik ist in [124] zu finden).

Die maximale Konzentration wird für jeden Farbstoff nahezu zur selben Zeit erreicht. Innerhalb von 10 Sekunden sind die Probenkonzentrationen in der Zelle auf 90 % angestiegen. Innerhalb von 20 Sekunden ist ein kompletter Austausch des Trägerpuffers durch die Probe bei der Benutzung von Peristaltikpumpen erfolgt. Für alle genannten Konzentrationsprofile wurde die auch bei der Bindungsmessung übliche Förderrate von 80 $\mu\text{l}/\text{min}$ benutzt. Beim Hinausspülen der Probe aus der Messzelle hängt die Stärke der Verdünnung durch den nachdrückenden Trägerpuffer sehr stark vom Molekulargewicht der gelösten Komponente und den daraus resultierenden Diffusionseigenschaften ab. Wenn der Probenpfropf nicht mit einer Luftblase vom Trägerpuffer abgetrennt ist und dieser direkt an die Probe angrenzt, findet Diffusion statt, welche die ursprüngliche Konzentration der Probe verdünnt. Kleinere, leichtere Moleküle diffundieren schneller als größere und schwerere. Eine schnellere radiale Diffusion wirkt der Dispersion, verursacht durch axiale Konvektion, entgegen. Das heißt, dass Proben kleinerer Moleküle sich nicht so schnell mit dem Trägerstrom mischen wie die größerer Moleküle [127]. Der Probenverbrauch liegt bei der RfS zwischen 500 und 1000 μl pro Messung und könnte mit einer Verbesserung der Fluidik weiter reduziert werden.

4.2.1.2 Die Fluidik des BIAcore 2000

Das BIAcore 2000 besitzt eine hochpräzise Mikroflussskassette, welche den Probentransport, angetrieben durch hochpräzise Spritzenpumpen, in sehr dünnen, in einen Kunststoff eingepprägten Flusskanälen ermöglicht. Mit Hilfe von in der Fluidikkassette integrierten Membranventilen kann die Probe mittels eines Pressluftsystems direkt vor der Messzelle abgetrennt und mit einem sehr geringen Totvolumen ($< 1\mu\text{l}$) aufgegeben werden. Die Fluidikkassette ist in Abbildung 31 abgebildet.

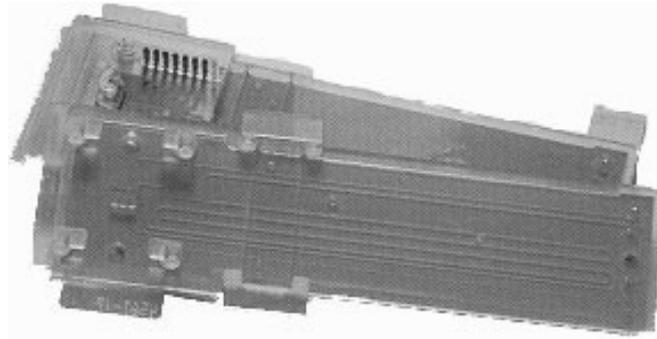


Abbildung 31: Mikrofluidikkassette eines BIAcore 2000 mit intergrierten Membranventilen

Vier verschiedene, einzeln ansteuerbare Messkammern können für verschiedene Immobilisierungen benutzt werden. Sie werden bei der Messung nacheinander durch den Fluss erreicht. Eine der Messzellen wird zur Referenzierung benutzt, um Temperaturdriften oder ähnliches auszugleichen. Der gewisse zeitliche Versatz von Bindungs- und Referenzkurve kann, bis auf kleine Artefakte bei größeren Bulkeffekten, mit Hilfe der Software herausgerechnet werden.

Die extreme Anfälligkeit der Mikrofluidik gegenüber Verschmutzungen und Verstopfungen kann durch häufiges Reinigen des Gerätes kompensiert werden. Der jährlich angeratene Austausch der Mikroflusskassette ist jedoch notwendig und ein zusätzlicher Kostenfaktor.

Der Probenverbrauch liegt für das BIAcore bei 100 bis 400 μl pro Bindungskurve und ist extrem gering für ein derartiges Verfahren.

4.2.1.3 Die Fluidik des IAsys plus

Das IAsys plus besitzt ein Küvettensystem, das zwei Kammern für Referenz und eigentliche Messung zur Verfügung stellt. In Abbildung 32 sind die Doppelküvette, die Mikrorührer und die Absaugschläuche des Gerätes zu sehen. Um eine Verarmung der Lösung während der Bindungsvorgänge zu vermeiden, wird hier die Lösung durch kleine Rührer ständig neu vermischt, so dass von einer konstanten Konzentration ausgegangen werden kann.

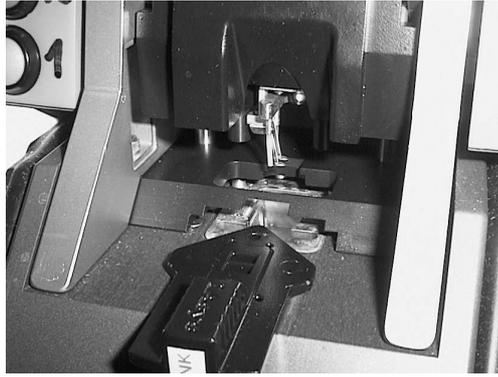


Abbildung 32: Doppelküvettenystem beim IAsys plus mit kleinen Rührern und Schläuchen zur Absaugen der Probenflüssigkeit

Limitierungen können im Fall der manuellen Probenaufgabe verursacht werden. Beide Kammern können so nicht zeitgleich befüllt werden, außerdem muss die Flüssigkeit dreimal ausgetauscht werden, um einen vollständigen Wechsel zu Probe oder Puffer zu gewährleisten. Hier muss eine Verfälschung der Konzentration der Probe absolut vermieden werden. Ein zeitlicher Versatz zwischen Referenz- und Messzelle ist daher unvermeidlich. Eine Korrektur mittels der Software ist auch hier möglich, aber nicht in allen Fällen ist ein vollständiger Ausgleich von Bulkeffekten möglich.

Langzeitmessungen könnten wegen Verdunstung der Probe aus den offenen Küvetten und somit einer Konzentrationsänderung nicht durchgeführt werden. Jedoch kann die Verdunstung durch kurze Messzeiten sehr gering gehalten werden.

Eine Messung mit etwas viskosem Material wie zum Beispiel Zellen ist mit einem Küvettenystem eher denkbar als mit einer gegen Verstopfung anfälligen Mikrofluidik, jedoch ist hier auch mit Fehlsignalen durch Sedimentation eher zu rechnen, als bei einem Flusssystem.

Der Probenverbrauch liegt bei IAsys plus bei 150 bis 500 μl pro Bindungskurve und ist durch den Austausch der Flüssigkeit in den Küvetten etwas höher als sie für die eigentliche Messung sein müsste. Dennoch ist die Probenmenge noch relativ gering.

4.2.1.4 Zusammenfassung

Sowohl bei der SPR als auch bei der RM-Technik ist stets eine Referenzierung des Signals notwendig, da es sich hier um brechungsindex-sensitive Methoden handelt. Jede Änderung des Brechungsindex durch andere Zusammensetzung der Lösung, oder durch Temperaturschwankungen beim Wechsel der Lösung oder in der Umgebung verursacht erhebliche Signaländerungen, die über eine Referenzierung herausgerechnet werden muss. Eine räumliche Nähe von Referenz- und Messzelle ist daher von Vorteil.

Bei der RfS ist diese Art der Referenzierung nicht notwendig, da hier das Produkt aus Brechungsindex und Schichtdicke $n \cdot d$ Messgröße ist. Bei einer Temperaturänderung der Umgebung beispielsweise verhalten sich beide Größen näherungsweise umgekehrt proportional, und das eigentliche Signal wird nicht beeinflusst. Von Vorteil wäre eine solche Referenzierung jedoch auch hier, weil unter Umständen auch bei dieser Methode Bulkeffekte auftreten und so eliminiert werden können.

Durch die Verwendung der beiden Systeme BIAcore 2000 und IAsys plus, sowie durch die Weiterentwicklung der RfS und des IBS 101 konnten einige Erfahrungen in der Probenhandhabung gesammelt werden. Grundsätzlich ist es möglich, beide Varianten zu nutzen, d. h. sowohl ein Flusssystem als auch eine gerührte Lösung sind denkbar. Eine Fluidik ist jedoch gebräuchlicher und erprobter. In diesem Fall sollten geringe Totvolumina und Schlauchdurchmesser sowie ein Vermeiden von Aufweitungen und plötzlichen Querschnittsänderungen die Dispersion der Probe möglichst gering halten. Bei biologischen Proben ist ein geringer Probenverbrauch absolut erforderlich. Von Vorteil wäre zudem eine automatische Probenhandhabung mittels eines Autosamplers, da eine reproduzierbare Probenaufgabe hier keine Limitierungen verursachen sollte.

4.2.2 Vergleich von Leistungsparametern

Die Leistungsfähigkeit einer Detektionsmethode und somit die Sensitivität hängt in erster Linie von grundsätzlichen Parametern wie Rauschen und Drift ab. In der vorliegenden Arbeit wurden hierüber Untersuchungen unter realen Messbedingungen gemacht.

Es wurden von den drei zu vergleichenden Geräten die Drift der Baseline während einer Messung bestimmt. Für die Bestimmung der Empfindlichkeiten muss die Signalkalibrierung bekannt sein, das heißt, jeder Signaländerung muss eine bestimmte an die Oberfläche bindende Menge an zu messender Substanz zugeordnet werden können (g/mm^2). Messungen mit radioaktiv markierten Proteinen können diese Daten liefern. Für die beiden kommerziellen Geräte wurden diese Daten auf der Literatur entnommen [128], [129] und für die Methode RIFS ist diese Kalibrierung in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben.

Ein Vergleich dieser Daten ist in Tabelle 8 gezeigt. Für eine bessere Vergleichbarkeit des Rauschens und der Drift wurden die Werte mit Hilfe der kalibrierten Signale in Einheiten der Konzentration umgerechnet. Hierzu liegen die folgenden Empfindlichkeiten¹ für die einzelnen Geräte zugrunde:

Bindung von

1 ng Protein/ mm^2 = 1750 pm Zunahme der optischen Schichtdicke (RIFS)
163 arcsec Änderung des Resonanzwinkels (IASys)
1000 RU Verschiebung des Plasmons (BIAcore).

¹ Im folgenden wird die der jeweiligen gemessenen Einheit (wie zum Beispiel bei der RIFS pm Schichtdickenzunahme) zugeordnete entsprechende pro mm^2 gebundene Proteinmenge zur Vereinfachung als Empfindlichkeit bezeichnet. Gemeint ist die der jeweiligen Signalzunahme zugeordnete Massenzunahme an der Sensoroberfläche, also die Steigung der Kalibriergeraden, wie auch in 2.2.1.3 beschrieben.

Instrument	RMS-Rauschen	Nachweisgrenze (3 x RMS/ Empfindlichkeit)	Drift	Drift (in Einheiten der Konzentration)
RIfS-Laboraufbau	0,80 pm	1,4 pg/mm ²	10 pm/h	5,7 pg/h mm ²
BIAcore 2000	0,26 RU	0,78 pg/mm ²	6 RU/h	6 pg/ h mm ²
IAsys plus	0,40 arcsec	7,36 pg/mm ²	4 arcsek	24,5 pg/ h mm ²

Tabelle 8: Vergleich allgemeiner Leistungsparameter wie Rauschen und Drift erhalten aus Baselinemessungen mit den Geräten BIAcore 2000, IAsys plus und RIfS.

Das Signalrauschen wurde durch Basislinienmessungen als Standardabweichung des Signals nach Abzug der Drift erhalten. Es wurde jeweils aus der fünfminütigen Basislinie vor einer Bindungsmessung von Thrombin an auf der Oberfläche immobilisierten Thrombininhibitor bestimmt. Eine weitere Limitierung ist die Drift. Sie schränkt die Detektion von langsamen Wechselwirkungen ein. Die Drift wurde aus der Steigung nach linearer Regression der Basislinienmessungen erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt.

Bezüglich der Empfindlichkeiten wurden für alle untersuchten Geräte vergleichbare Werte erhalten. Der niedrigste Wert wurde mit dem BIAcore 2000 erreicht, der Wert für die RIfS ist etwa doppelt so hoch wie für das BIAcore-Gerät, für das IAsys plus liegt er etwa 9-fach höher. Alle erhaltenen Daten liegen jedoch innerhalb einer Größenordnung. Die Bindung von Proteinen, die im Bereich von einigen kilo-Dalton liegen, können damit leicht nachgewiesen und aufgezeichnet werden.

4.2.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten mit verschiedenen markierungsfreien Detektionsmethoden

Zum weiteren Vergleich der RIfS mit den beiden kommerziellen Geräten wurden jeweils Messungen zur Ermittlung kinetischer Konstanten

durchgeführt, da dies höhere Ansprüche an sowohl die Detektion als auch die Fluidik stellt.

Um die Bindungskonstanten zu ermitteln, wurden Assoziation und Dissoziation verschiedener Konzentrationen Thrombin an auf der Oberfläche immobilisierten Thrombininhibitor detektiert und ausgewertet.

Für die RIfS wurde ein Schichtaufbau auf den Transducern bis zum Diamino-Polyethylenglykol (DA-PEG) hergestellt, umgepolt und Thrombininhibitor über Peptidkopplung immobilisiert, wie in 3.2.1 beschrieben. Für die Interaktionsmessungen mit dem BIAcore 2000 wurde der Thrombininhibitor online an einen CM5-Chip kovalent gebunden, wie in 3.2.2 gezeigt, und für die Wechselwirkungsanalyse mit dem Resonant Mirror Gerät IAsys plus wurden CMD-Küvetten mit dem Inhibitor kovalent online modifiziert, nachzulesen in 3.2.3.

Bei den beiden kommerziellen Geräten, die eine Möglichkeit zur inline-Referenzierung besitzen, wurde das Signal der Referenzzelle von dem der Messzelle subtrahiert.

4.2.3.1 Reproduzierbarkeit der Interaktionsmessungen

Für die Ermittlung der Ratenkonstanten des Thrombins an den Thrombininhibitor mit den drei zu vergleichenden Geräten wurde für jede eingesetzte Konzentration an Thrombin jeweils eine Dreifachmessung durchgeführt. Die Bindungskurven sind in Abbildung 33 gezeigt.

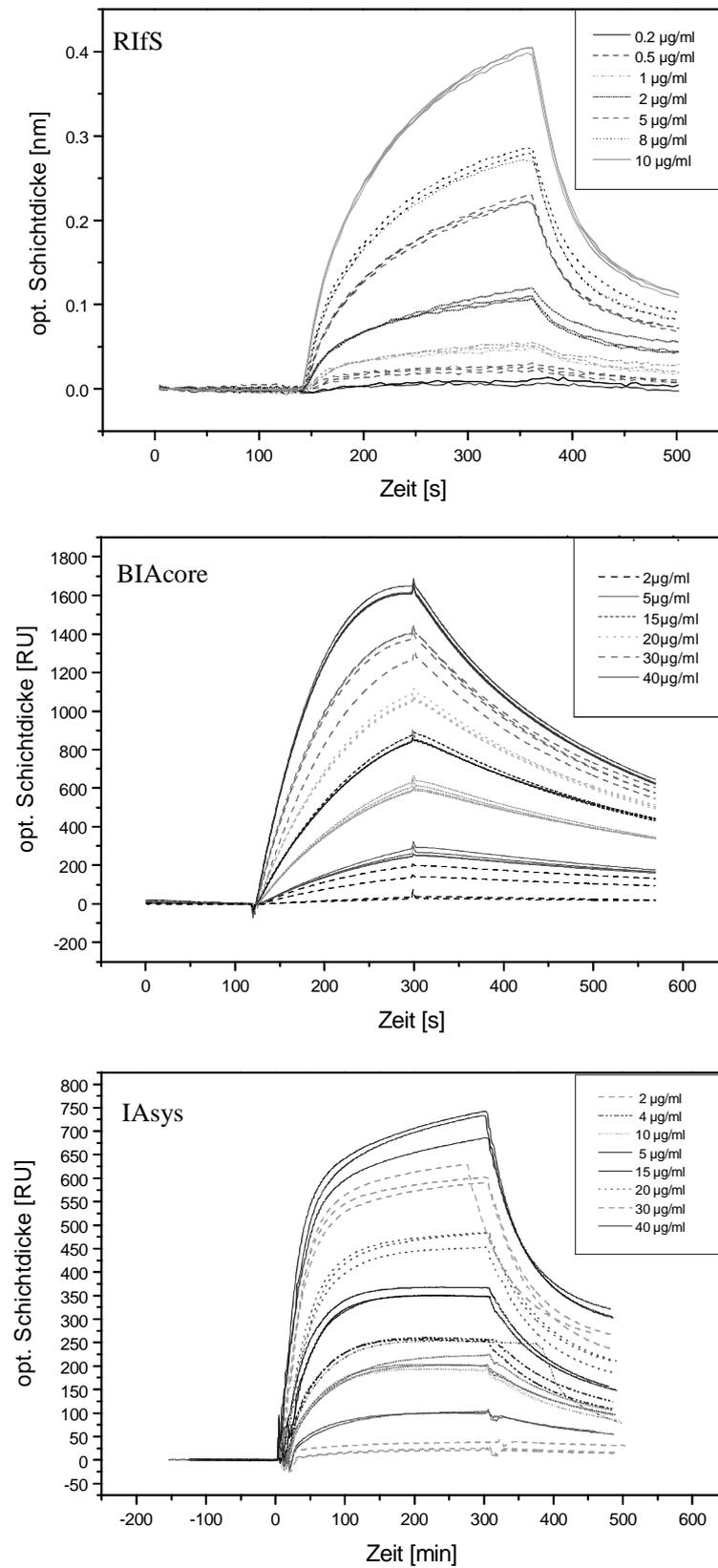


Abbildung 33: Bindungskurven von Thrombin an immobilisierten Thrombininhibitor, gemessen mit dem RfS-Labora Aufbau, dem BIAcore 2000 und dem IA sys plus.

Für die aufgenommenen Bindungskurven wurde die Reproduzierbarkeit der Bindung des Thrombins für jedes Gerät anhand der Dreifachmessungen abgeschätzt. Hierzu wurden die Standardabweichungen der ermittelten k_{obs} -Werte für jede Konzentration prozentual auf den ermittelten k_{obs} -Wert selbst referenziert. Der Durchschnitt der prozentualen Standardabweichung ist in Tabelle 9 gezeigt.

Gerät	Mittelwert der Standardabweichung von k_{obs} in Prozent bezogen auf k_{obs} [%]
RIfS-Labora Aufbau	8
BIAcore 2000	15
IAsys plus	15

Tabelle 9: Vergleich des Durchschnitts der prozentualen Standardabweichung von k_{obs} gemessen mit RIfS, BIAcore 2000 und IAsys plus.

Diese Betrachtungen zeigen, dass mit dem RIfS-Laboraufbau die niedrigste Standardabweichung bei diesen Messungen erzielt werden konnte. Trotz der Tatsache, dass bei dieser Detektionsmethode als einziges keine Referenzierung des Signals stattfindet, liegen bei der RIfS die Werte für die Reproduzierbarkeit unter denen der beiden kommerziellen Methoden. Die Standardabweichungen sind hier doppelt so hoch als die mit dem RIfS-Setup erzielten.

4.2.3.2 Assoziationsratenkonstanten

Die Assoziationskinetik der Bindung von Thrombin an den immobilisierten Inhibitor ist ein bimolekularer Prozess, bei dem ein Komplex auf der Oberfläche gebildet wird, und folgt einer Kinetik zweiter Ordnung.

Da jedoch unter Durchflussbedingungen bzw. in gerührter Lösung gemessen und die Konzentration des Thrombins als konstant betrachtet werden können,

kann von der wesentlich einfacheren Kinetik pseudo-erster Ordnung ausgegangen werden [88], [89].

Um die Assoziationsratenkonstanten aus den gemessenen Bindungskurven bestimmen zu können, wurde nun wie im Theorieteil in 2.2.3 beschrieben an den Assoziationsteil jeder einzelnen Bindungskurve eine Exponentialfunktion $\Gamma(t) = \Gamma_{GG} [1 - e^{-k_{obs} t}]$ angepasst, um die observable Bindungskonstante k_{obs} zu erhalten. Um alle Daten gleich zu behandeln, wurden auch die mit BIAcore und IAsys erhaltenen Kurven exportiert und mit Hilfe der Software Origin 5.0 die Kurvenanpassung vorgenommen, anstelle der zum jeweiligen Gerät mitgelieferten Auswertesoftware.

Eine Limitation bei der Kurvenanpassung stellt zum einen die Dispersion der Probe im Trägerpuffer dar und zum anderen der Massentransport, der eine Bestimmung kinetischer Konstanten limitieren würde. Um sicherzustellen, im Bereich der Kinetik erster Ordnung, also konstanter Probenkonzentration, auszuwerten, wird der Bereich der Auswertung mit den Flussprofilen abgeglichen, wie in der folgenden schematischen Darstellung in Abbildung 34 gezeigt.

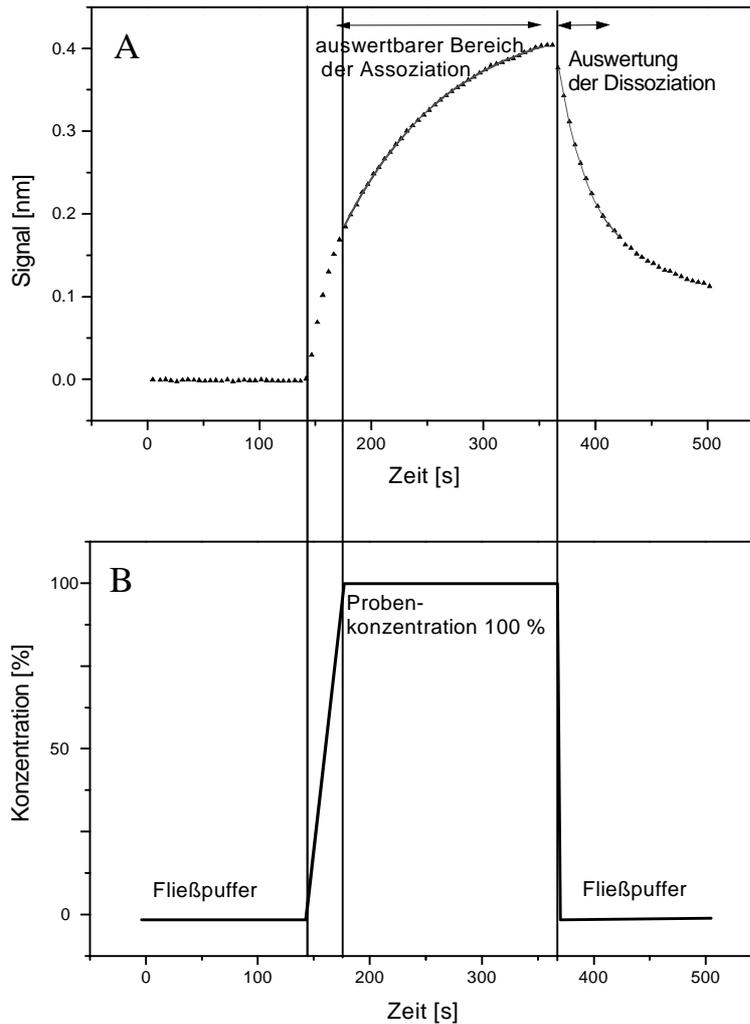


Abbildung 34: Schematische Darstellung der aufgrund der Verdünnung der Probe auswertbaren Bereiche der Bindung, neben dem Ausschluss des Massentransports ist das Bindungsmodell nur bei einer konstanten Probenkonzentration (100 %) gültig

Die Methode zum Ausschluss der Massentransportlimitierung wird im Anschluss an die normale Auswertung demonstriert, da sie zudem noch eine weitere Methode zur Ermittlung der Bindungskonstanten darstellt, wenn auch weniger gebräuchlich.

Für jede einzelne Assoziationskurve wird durch das Anpassen der Exponentialfunktion ein Wert für k_{obs} erhalten. Für jede Konzentration werden aus den Dreifachmessungen der Mittelwert und die Standardabweichung für k_{obs} ermittelt und gegen die entsprechende Konzentration für jedes Daten-Set in einem Diagramm aufgetragen. Entsprechend der Gleichung $k_{obs} = k_a C_0 + k_d$ ergibt sich die Assoziationsratenkonstante jeweils direkt aus der Steigung der

linearen Regression der Daten dieser Sekundär-Diagramme. Sie sind für die Bestimmung der Ratenkonstanten für alle Geräte in Abbildung 35 gezeigt.

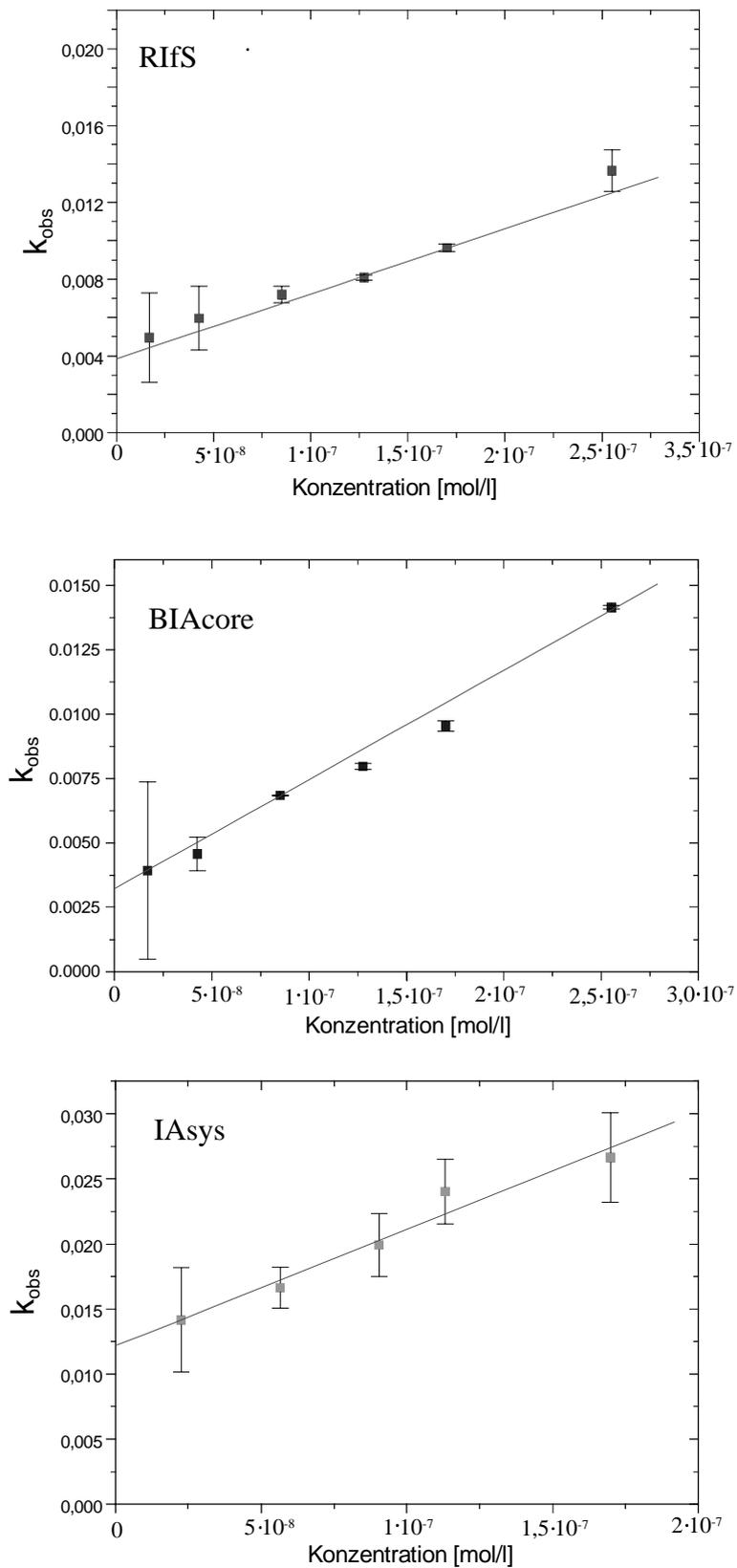


Abbildung 35: Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten durch lineare Regression der Auftragung von k_{obs} gegen die molare Konzentration von 6 verschiedenen Thrombinkonzentrationen für RIfS, BIAcore und IAsys

Theoretisch kann hierbei auch die Dissoziationsratenkonstante k_d aus dem y-Achsenabschnitt ermittelt werden. Jedoch ist dieser Wert, besonders bei niedrigem k_d , stark fehlerbehaftet und kann nicht exakt bestimmt werden. Die auf diesem Weg erhaltenen Werte der Assoziation sind für alle Geräte in Tabelle 10 gezeigt und verglichen.

Gerät	k_a [$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] ermittelt aus k_{obs} -Auftragung	Standardabweichung von k_a [%]	k_a [$10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] ermittelt aus Linearisierung	Standardabweichung von k_a [%]
RIfS-Laboraufbau	$2,1 \pm 0,9$	43	$5,2 \pm 0,2$	4
BIAcore 2000	$3,2 \pm 0,3$	9	$7,3 \pm 2,3$	31
IASys plus	$9,0 \pm 1,0$	11	$9,2 \pm 0,2$	2

Tabelle 10: Vergleich der ermittelten Assoziationsratenkonstanten der Wechselwirkung von Thrombin mit immobilisiertem Thrombininhibitor gemessen mit RIfS, BIAcore 2000 und IASys plus.

Wie schon erwähnt, kann auch der Massentransport geschwindigkeitsbestimmend sein, wie ausführlich in [90] beschrieben wird. Um sicherzustellen, den Bereich einer Kurve mit einer rein kinetischen Information, ohne Einfluss von Massentransport ausgewertet werden kann, wird die Ableitung des Signals gegen das Signal selbst aufgetragen.

Nach Gleichung $d\Gamma(t)/dt = \text{const.} - (k_a A_0 + k_d) \Gamma(t)$ sollte die Kurve ein lineares Verhalten zeigen, solange mono-exponentielles Verhalten der Assoziationskurve gegeben ist [89]. Diese Methode dient also zur Wahl der auswertbaren, nicht durch Massentransport limitierten Kurvenbereiche, kann aber auch zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten selbst benutzt werden. Die Auftragung der Ableitung des Signals gegen das Signal kann entsprechend der gezeigten Gleichung direkt aus der Steigung der Kurve die Assoziationsratenkonstante liefern, wie in Abbildung 36 gezeigt.

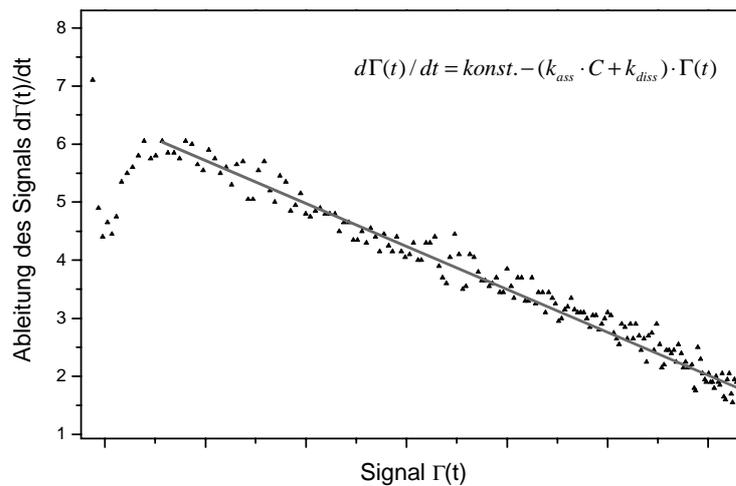


Abbildung 36: Bestimmung des auswertbaren Bereiches für eine Assoziationskurve, der Massentransport kann durch Auftragung der Ableitung des Signals gegen das Signal erfasst werden. Durch lineare Regression kann aus dieser Auftragung auch die Assoziationsratenkonstante bestimmt werden.
(Beispiel anhand einer mit RIFS erzeugten Kurve)

Die so gewonnenen Werte für die Assoziationsratenkonstante k_a sind ebenfalls in Tabelle 10 gezeigt.

Die Ergebnisse, die mit Hilfe dieser Methode ermittelt worden sind, liegen eine Größenordnung unter denen der Exponentialkurvenanpassung. Die Linearisierung kann also einen Informationsverlust beinhalten. Dennoch zeigt der Vergleich der Daten untereinander eine sehr gute Übereinstimmung, die Werte für die Assoziationsratenkonstanten liegen innerhalb einer Größenordnung. Die geringste Standardabweichung für diese Auswertemethode wird durch IAsys plus erzielt, die mit der RIFS-Detektion erhaltenen Standardabweichungen sind doppelt so hoch und für das BIAcore 2000 15fach höher.

Für eine Ermittlung der Assoziationskonstante ist daher eher die Methode der Anpassung einer Exponentialfunktion geeignet. Die Ergebnisse liegen hier innerhalb einer Größenordnung für jedes der Instrumente. Hier erzielte das BIAcore-Gerät die besten Resultate bezüglich der Standardabweichung der Kurvenanpassung an die Assoziationskurve. Sie beträgt nur 1/10 des k_a -Wertes. Für IAsys und RIfS liegen die Werte höher, die Standardabweichung ist hier 4fach so hoch wie die mit dem BIAcore erzielte.

4.2.3.3 Dissoziationsratenkonstanten

Eine Ermittlung der Dissoziationsratenkonstante aus dem y-Achsenabschnitt der k_{obs} -Auftragung ist zwar möglich, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, jedoch aufgrund der hohen Fehleranfälligkeit wenig gebräuchlich.

Normalerweise wird die Dissoziationsratenkonstante direkt aus der Messung der Dissoziation erhalten. Anhand der Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit $d\Gamma(t)/dt = -k_d\Gamma(t)$ kann nach Intergration eine exponentielle Funktion $\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot e^{-k_d t}$ an die Kurve angepasst werden. Eine typische Kurvenanpassung ist als Beispiel in Abbildung 34 gezeigt.

Hierbei muss beachtet werden, dass Massentransportlimitierung ausgeschlossen werden kann. Wie schon für die Assoziation erklärt, lässt sich durch die Auftragung der Ableitung des Signals gegen das Signal ein geeigneter Bereich mit mono-exponentiellem Verhalten festlegen. Genauso wurde auch hier verfahren. Für jeden einzelnen Kurvenabschnitt der Dissoziation wurde erst der Bereich monoexponentiellen Verhaltens festgestellt und dann mit Hilfe von Origin 5.0 eine Kurveanpassung vorgenommen. Hierbei wurden ebenfalls wieder die mit den kommerziellen Geräten erzeugten Kurven exportiert, um eine exakt identische Auswertung durchführen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Instrument	k_d [10^{-2} s^{-1}]	Standardabweichung [%]
RIfS	$3,00 \pm 0,04$	1.3
BIAcore 2000	$0,70 \pm 0,01$	1.4
IASys plus	$2,00 \pm 0,10$	5

Tabelle 11: Vergleich der mit RIfS, BIAcore und IASys erhaltenen Werte für die Dissoziationsratenkonstante k_d aus der Kurvenanpassung

Um das Problem der Rückbindung zu verhindern, wurde die Daten nur von den hohen Konzentrationen ausgewertet, da hier von einer hohen Oberflächenbeladung und somit von einer geringen Rückbindung ausgegangen werden kann.

Beim Vergleich der Daten der verschiedenen Instrumente liegen die erhaltenen Werte für die Dissoziationsratenkonstante relativ dicht beieinander, auch die Standardabweichungen liegen in einem ähnlichen Rahmen. Für BIAcore wurde der niedrigste Wert erhalten, für RIfS ist die Standardabweichung 4fach höher und bei der Messung mit dem IASys plus 10fach höher. Betrachtete man die prozentualen Abweichungen, so liegen BIAcore und RIfS im selben Bereich und IASys plus 3,5-4fach höher.

4.2.4 Zusammenfassung

Alles in allem sind die mit der Methode der RIfS erhaltenen Werte für Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, sowie die Abweichungen sehr gut vergleichbar mit den durch die kommerziellen Systeme erhaltenen Daten. Das Detektionssystem wurde als Ganzes verglichen, mit all seinen Vorteilen und Limitierungen, um die prinzipielle Eignung der RIfS-Detektion zu demonstrieren.

BIAcore, ausgestattet mit einer hochkomplexen und sehr vorteilhaften Fluidik, und IASys plus besitzen beide die Möglichkeit zur direkten Signalreferenzierung und somit zur Reduktion von Limitierungen wie unspezifischer Bindung, Bulkeffekten und Drift. Eine

Temperaturstabilisierung minimiert den Einfluss der Änderung des Brechungsindex auf das Signal bei Temperaturschwankungen in der Umgebung. Es kann auch zur Reduzierung des Detektorrauschens beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass der RIfS-Aufbau, als eine robuste und preiswerte Möglichkeit, in höchstem Maß vergleichbare Daten bereits ohne kompliziertes Fluidiksystem und extensive Temperaturkontrolle liefert.

Zusammenfassend wurde die RIfS anhand der Leistung eines Laboraufbaus mit zwei weiteren Detektionsmethoden zur zeitaufgelösten und markierungsfreien Detektion von biomolekularen Wechselwirkung verglichen. Dabei handelte es sich um eine SPR-Methode, repräsentiert durch das BIAcore 2000 und um eine Resonant Mirror Methode, vertreten durch das IAsys plus System. Beide kommerziell erhältlichen Geräte sind weit verbreitet. Besonders BIAcore ist durch unzählige Publikationen und Anwender bekannt. Der in der Arbeitsgruppe Gauglitz verwendete RIfS-Labora Aufbau sowie die beiden kommerziellen Geräte wurden anhand der Charakterisierung der Interaktionen eines Thrombininhibitors mit Thrombin verglichen. Die Messungen wurden für alle Geräte unter denselben Bedingungen vorgenommen und die Auswertung der erhaltenen Daten auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Die Bestimmung der Affinitätsratenkonstanten hat gezeigt, dass die RIfS mit dem bestehenden Aufbau eine vergleichbare Technik darstellt.

Allgemeine Leistungsparameter wie Rauschen und Drift stimmen sehr gut mit denen des BIAcore 2000 und des IAsys plus überein. Hinsichtlich der Empfindlichkeit erreicht die RIfS in der Praxis fast die der SPR und übertrifft die des Resonant Mirror.

Trotzdem eine Referenzierung bei der RIfS, als einer nicht rein brechungsindexsensitiven Methode, nicht notwendig ist, könnten die durch die Lichtquelle verursachte Drift weiter reduziert und somit das System aufgewertet werden. Eine Referenzierung der Methode wurde schon erfolgreich getestet [62]. Um das vom Detektor verursachte Rauschen weiter

zu vermindern, wäre ein gekühlter Detektor von Vorteil. Dies würde die Selektivität maßgeblich steigern.

Der Probenverbrauch mit dem hier untersuchten RIfS-Setup ist höher als der der anderen beiden untersuchten Geräte. Verbesserungen in der Fluidik und Probenhandhabung, wie zum Beispiel ein Mikroflusssystem, das in Ansätzen schon in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde, wären vorteilhaft. Luftblasen zum Abtrennen des Probenpfropfs vom nachströmenden Puffer und geringere Totvolumina könnten die Dispersion nachhaltig reduzieren und somit den Probenverbrauch erheblich einschränken.

Passende Oberflächenmodifikationen für die verschiedensten Anforderungen werden von den beiden Firmen zu den Geräten angeboten. Modifikationen für die RIfS-Transducer sind in nahezu derselben Breite zugänglich und in der Arbeitsgruppe erprobt. Zusätzlich dazu wurde in der Arbeitsgruppe eine Polyethylenglykol(PEG)-Oberfläche etabliert und patentiert, die besonders für die Anforderungen kinetischer Messungen geeignet ist. Insgesamt ist die RIfS sehr gut vergleichbar mit den anderen etablierten Geräten zur biomolekularen Interaktionsanalyse.

Wünschenswert für zukünftige Entwicklungen ist, obwohl nicht notwendigerweise zur Signalstabilisierung, dennoch eine temperaturkontrollierte Messzelle, um zum Beispiel unter physiologischen Bedingungen messen zu können oder zum Beispiel Schmelzpunkte von DNA zu bestimmen. Erste Versuche dazu wurden mit einer neu entwickelten Zelle schon in der Arbeitsgruppe durchgeführt, hierbei lassen sich neue Erkenntnisse über die Temperaturabhängigkeit von biomolekularen Wechselwirkungen an der Oberfläche ableiten.

Zudem lässt sich die RIfS einfacher als die anderen Techniken miniaturisieren. Statt Licht des gesamten sichtbaren Spektrums für die Interferenzmessung zur Verfügung zu stellen, genügt es, das Licht von vier LEDs, also nur vier Wellenlängen, zu nutzen und an die entsprechend mittels Photodioden gemessenen Intensitäten das Interferenzspektrum anzupassen. So gelingt es,

ohne ein Diodenzeilenspektrometer auszukommen. Dies wurde schon erfolgreich in der Arbeitsgruppe getestet [130].

Eine Kalibrierung des Systems mittels radioaktiver Proteine, welches für die Einordnung und Vergleichbarkeit der Empfindlichkeit notwendig ist, ist ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden.

4.3 Absolute Kalibrierung des RfS Systems mit radioaktiv markierten biologischen Molekülen

Ziel dieser Untersuchungen war es, die durch das Messen mit dem RfS-System erhaltenen optischen Schichtdicken mit der tatsächlich gebundenen Menge an Analyt zu korrelieren. Die bisher arbeitsgruppenintern nur theoretisch abgeschätzte Korrelation ergab einen Wert von 1,6 pm Änderung der optischen Schichtdicke bei der Bindung von 1 pg Protein pro mm² Fläche. Angesichts dieser theoretischen Werte sollte die Detektionsmethode eine ähnlich hohe Empfindlichkeit wie die Oberflächenplasmonenresonanz erzielen.

Zur genaueren Bestimmung der absoluten Empfindlichkeit wurden im Rahmen dieser Arbeit Messungen mit radioaktiv markierten Biomolekülen durchgeführt. Dazu wurde auf der Oberfläche nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll Biotin kovalent immobilisiert und ¹²⁷I-markiertes Streptavidin spezifisch an die so modifizierte Oberfläche gebunden. Über die Messung der γ -Strahlung und die Änderung der optischen Schichtdicke wurde so das Verhältnis von RfS-Signal und tatsächlich gebundener Menge an Streptavidin korreliert.

Die Methode der Quantifizierung über radioaktiv markierte Proteine bietet den Vorteil, dass noch Konzentrationen bis 10⁻¹⁵ Mol pro Liter eines vierfach markierten Proteins nachweisbar sind, die Nachweisgrenze liegt also mehrere Größenordnungen unter der von spektralen Methoden [131].

4.3.1 Messung mit radioaktiv markierten Substanzen

Alle Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen wurden im Isotopenlabor der Universität Tübingen durchgeführt.

¹²⁵I ist ein γ -Strahler, der unter Elektroneneinfang hauptsächlich in das stabile Tochternuklid ¹²⁵Te zerfällt. Es besitzt eine physikalische Halbwertszeit von 60,1 Tagen. Die biologische Halbwertszeit beträgt für den Ganzkörper 12 Tage, da die Anreicherung jedoch hauptsächlich in der Schilddrüse (30%) erfolgt, beträgt die Halbwertszeit dort 120 Tage. Die Freigrenzen, das heißt die

Menge, die noch außerhalb eines speziell dafür ausgestatteten Labors gehandhabt werden darf, beträgt in Deutschland $5 \cdot 10^4$ Bq (Bq = Zerfälle/s).

Es sind beim Arbeiten mit höheren Konzentrationen *geeignete Abschirmungsmaßnahmen zu treffen!* Die Abschirmung der Behältnisse erfolgt mit Blei, wobei die Halbwertschichtdicke 0,07 mm und die Zehntelwertschichtdicke 0,2 mm beträgt. *Sicherheitshinweis: Lösungen mit entsprechenden Jodverbindungen können durch dünne Gummihandschuhe diffundieren, es sind daher Polyethylenhandschuhe zu benutzen! Jod ist nicht mit Edelstahl in Berührung zu bringen, da die Kontamination sehr schlecht zu entfernen ist!*

Das verwendete markierte Streptavidin wurde von Amersham bezogen, wo es mit Natrium[^{125}I]Iodid synthetisiert und mit Hilfe einer Gelfiltration aufgereinigt wurde. Die Herstellerangaben beinhalten den Tag der Markierung und den Markierungsgrad. So lässt sich bei bekannter Halbwertszeit die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls nach einer Reaktion erster Ordnung über die Gleichung

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

$$k = 0,0115 [1/d]$$

ermitteln und mit

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-kt}$$

die Konzentration an aktivem Material zu jedem Zeitpunkt berechnen.

4.3.2 Korrelation des RfS-Signals mit der gebundenen Proteinmenge

Für die Kalibrierung wurde die spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin ausgewählt. Zum einen aufgrund dessen, dass die RfS bei der Untersuchung von spezifischen Interaktionen von Proteinen eingesetzt wird, zum anderen, weil die nichtkovalente Bindung des Streptavidins an das Biotin ein irreversibler Prozess ist und beim Spülen des Chips nach dem Messen keine Dissoziation stattfindet.

Für die Messungen der spezifischen Bindungen mit dem markierten Biotin-Streptavidin-System wurde eine „stopped-Flow“-Zelle und ein normaler RfS-Labora Aufbau verwendet. Um keine störenden Reflexe vom Meniskus der Probe zu erhalten und eventuellen Einfluss der verschiedenen Füllstandshöhen der Messzelle zu vermeiden, wurde eigens für diese Messungen eine Flusszelle konstruiert, wie im Methodenteil beschrieben.

Es wurden Bindungskurven für 9 verschiedene Konzentrationen des markierten Streptavidins an immobilisiertes Biotin aufgenommen. Für die Messungen der einzelnen Konzentrationen wurde jedes Mal ein PEG-Transducer benutzt, der nach jeder Messung in der Messkammer gespült, ausgebaut und im Szintillationszähler vermessen wurde. Nach Kalibration der Effizienz des Counters konnte die Aktivität jedes einzelnen Transducers bestimmt werden.

Anhand der Auswertung von Bindungsprofilen mit fluoreszenzmarkierten Anti-Atrazin-Antikörpern wurde die genaue, durch die Probe benetzte Fläche bestimmt und mit der Aktivität korreliert. Die gebundene Menge an Protein pro Fläche wurde nun in einem Diagramm mit dem gemessenen RfS-Signal korreliert und die Steigung der Kalibriergeraden bestimmt, wie in Abbildung 37 gezeigt.

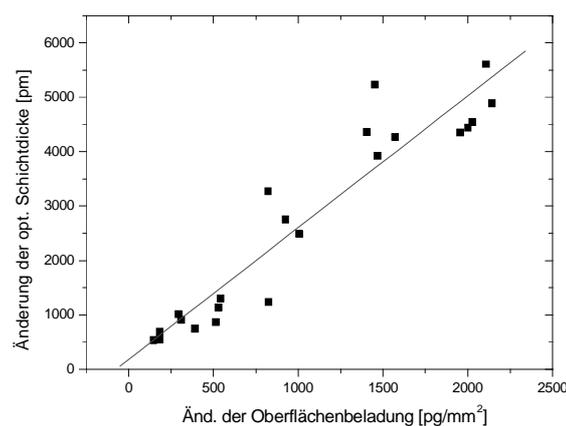


Abbildung 37: Korrelation des gemessenen Signals mit der tatsächlich gebundenen Menge an markierten Streptavidin

Eine lineare Kurvenanpassung ergab eine Steigung der Kalibriergeraden von 2,42 pm/ng Protein pro mm². Arbeitskreisinterne, nicht-publizierte

Abschätzungen der Empfindlichkeit von RIfS über Proteinmassen und ihre Größen jedoch wurden immer mit einem Wert von $1,6 \text{ pm/ng Protein pro mm}^2$ angegeben. Die Überprüfung mittels Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen bestätigte also die theoretischen Betrachtungen nicht. Die RIfS schien zu empfindlich zu sein. Es musste daher überprüft werden, ob die Bindung homogen über die Fläche stattfindet oder das bindende Protein aus irgendwelchen Gründen ungleichmäßig verteilt ist. Da kein Radioaktiv-Imager zur Verfügung stand, wurden Versuche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angestellt und die für die Bindung zur Verfügung stehende Fläche durch ein bildgebendes Verfahren dargestellt.

Die Vermutung der Überschätzung der Empfindlichkeit für die RIfS aufgrund eines inhomogenen Bindungsmusters, wie in Abbildung 38 gezeigt, wurde bestätigt.

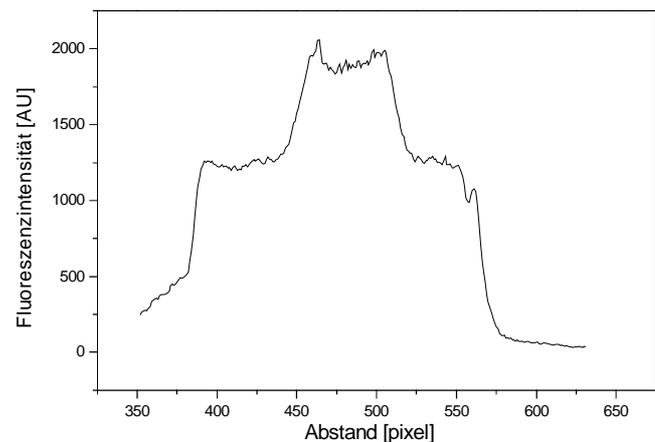
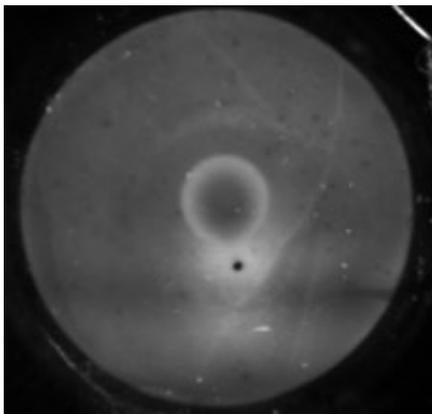


Abbildung 38: Bindungsfläche auf einem Transducer und Intensitätsprofil der im Szintillationszähler ausgewerteten Fläche

Online-Messungen, also Verfolgung der Bindung an die Oberfläche mittels aufgesetztem Lichtleiter, ergaben ein inhomogenes Bindungsmuster, Offline-Messungen ohne Lichtleiter ergaben ein homogenes, ebenes Bindungsprofil. Anhand der erhaltenen Bindungsprofile konnte eine geometrische Korrektur vorgenommen werden. Die geometrische Korrektur gleicht die Überschätzung der Empfindlichkeit aus. Die Überschätzung beruht vermutlich darauf, dass an der Berührungsstelle des Transducers mit dem Lichtleiter die partielle

Erwärmung für eine raschere Bindung des Streptavidins oder eine Quellung des Polymers (was bei PEG jedoch nicht in einem großen Maße zu vermuten ist) und somit für ein höheres Signal als auf der restlichen Fläche sorgt. Detektiert wird mit RIfS nur die Änderung der optischen Schichtdicke an der Stelle, an der der Lichtleiter aufsetzt.

Es ergibt sich nun nach der Korrektur ein Wert von $1,75 \text{ pm}/(\text{pg}/\text{mm}^2)$, der dem berechneten Wert von 1,6 für Proteine gut entspricht.

4.3.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Kalibrierung der Methode RIfS stimmen gut mit den theoretischen Vorhersagen überein. Erstmals wurde experimentell eine Kalibrierung des bei der RIfS detektierten Signals vorgenommen. Dies bietet so die Möglichkeit des direkten Vergleichs mit den kommerziellen Methoden und ist unabdingbar bei der Bestimmung und Angabe einer Nachweisgrenze.

Die anfänglichen Schwierigkeiten eine Überschätzung der Empfindlichkeit konnten mit geometrischen Korrekturen ausgeglichen werden.

4.4 Interaktionen von NPY5 mit dem NPY5-Rezeptor mit der RIfS

4.4.1 Immobilisierung des NPY5

Zur Messung der spezifischen Interaktion zwischen dem Neuropeptid Y und dem humanen NPY-Rezeptor wurde ein Derivat des NPY, welches aus 36 Aminosäuren besteht, auf der Oberfläche immobilisiert. Da die Regionen, die zur spezifischen Erkennung dienen, sich an den beiden Enden des Peptides befinden, wurde die Modifizierung an Position 14 vorgenommen und dort eine Cystein-Gruppe eingeführt. Das NPY konnte so als Thioether über EMCS (6-Maleinimido-Caprinsäure-N-Succinimidylester) auf einer Amingruppen-tragenden Oberfläche (z. B. Aminodextran, Diamino-Polyethylenglykol) immobilisiert werden (nach [132]).

Die Immobilisierung wurde auf jeweils einer Diamino-PEG und einer AMD-Schicht wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die AMD-Schicht

zeigte jedoch deutlich mehr unspezifische Wechselwirkungen als die PEG-Schicht, wie in Abbildung 39 gezeigt ist.

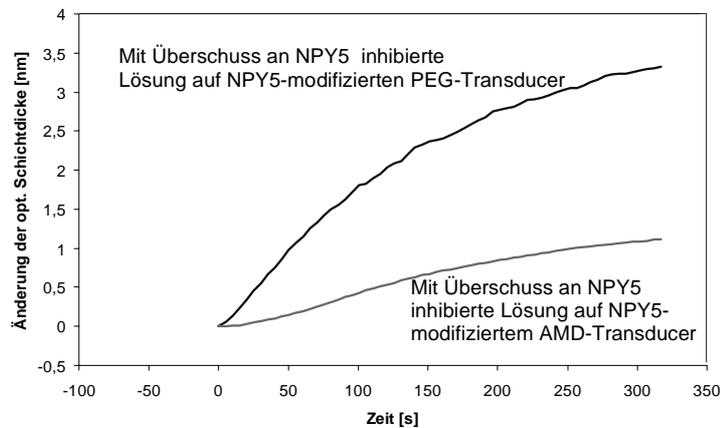


Abbildung 39: *Mit einem Überschuss an NPY5 inhibierte Rezeptorlösung erzeugte unspezifische Wechselwirkung auf AMD bzw. auf DA-PEG.*

Daher wurden im folgenden ausschließlich PEG-Transducer verwendet.

4.4.2 Wechselwirkung des NPY 5 mit dem NPY5-Rezeptor

Da nur sehr wenig Rezeptorlösung zur Verfügung stand und diese relativ teuer war, wurden alle Messungen in einer kleinen Stopped-Flow-Zelle durchgeführt. Es standen zweimal 13 μl einer ca. 200 nanomolaren Rezeptorlösung aus einer unverdünnten und unaufgereinigten Membranpräparation von rekombinanten CHO-K1 Zellen zur Verfügung, auf deren Membran humaner NPY-5-Rezeptor exprimiert wurde. Die Probe wies leicht streuende Eigenschaften auf.

Zum Nachweis der spezifischen Wechselwirkungen wurden die 13 μl Membranpräparation mit Bindungspuffer auf die Hälfte verdünnt, da für die Größe der Messzelle mindestens eine Menge von 25 μl notwendig ist. Die Rezeptorkonzentration war mit ca. 100 μM Rezeptor sehr niedrig. Mit der eingesetzten Rezeptorkonzentration konnte ein Bindungssignal von 4,8 nm optischer Schichtdickenzuwachs gemessen werden.

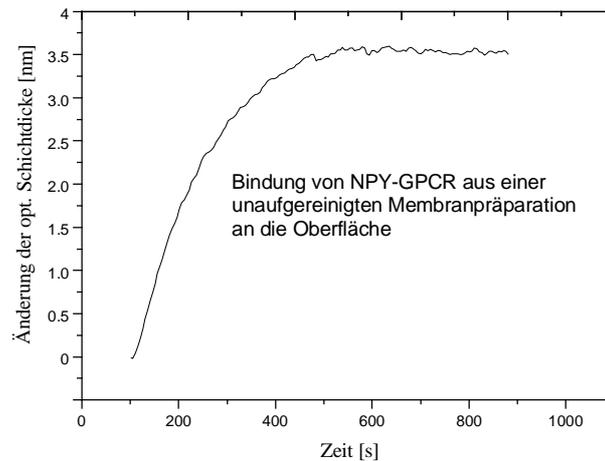


Abbildung 40: Bindungskurve des unaufgereinigten NPY-5-Rezeptors an die Oberfläche, Wiederholungsmessung nach einer Regeneration

Anschließend wurde die Oberfläche zunächst mit HCl und dann mit Pepsin regeneriert. Die Probe wurde jeweils mehrfach verwendet (Herauspipettieren der Rezeptor-Lösung aus der Messzelle nach der Messung), um die Stabilität der Oberfläche und die Reproduzierbarkeit einer Bindung nach der Regeneration zu zeigen. Hierbei nahm das Signal zwar bei jeder neuen Messung im Vergleich zur vorausgegangenen ab (Verdünnung der Probe durch häufiges Umpipettieren bzw. durch Bindung von Rezeptor an die Oberfläche), jedoch konnte die Regeneration optimiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Bindung an die modifizierte Oberfläche reproduzierbar auch nach Regenerieren des Rezeptors stattfindet.

Die leicht streuenden Eigenschaften der kaum verdünnten Membranpräparation störten hierbei die Messung nicht.

4.4.3 Nachweis der Spezifität der Bindung

Um eine spezifische Bindung an den immobilisierten NPY-Rezipienten nachzuweisen, wurden nun verschiedene, mit unmodifiziertem NPY 5 vorinkubierte Proben untersucht, um festzustellen, ob eine Inhibierung der Bindungsstelle des Rezeptors und somit eine Unterdrückung der Bindung an die Oberfläche möglich ist.

Die üblichen Inhibitorkonzentrationen, wie zum Beispiel auch bei der Durchführung von Bindungshemmtests, erstrecken sich im Bereich von 0,1 bis 10 fach K_D .

Die bei diesen Messungen eingesetzten Proben wurden auf ein Zwanzigstel der Ursprungskonzentration, also auf 10 pM verdünnt. Es wurden jeweils erst die Bindungskurven der nichtinhibierten Proben und nach der Regeneration die der inhibierten Probe aufgenommen. Die NPY5-Konzentrationen für die Vorinkubation wurden so gewählt, dass einmal ein 10facher und einmal ein 0,5facher K_D -Wert zur Inhibierung eingesetzt wurde.

In Abbildung 41 sind die Bindungskurven des Rezeptors von einem zwanzigstel der Ursprungskonzentration und die nach der Regeneration anschließende Bindung der mit 10fach K_D mit NPY5 inhibierten Probe gezeigt. Diese Messung wurde zweimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen festzustellen.

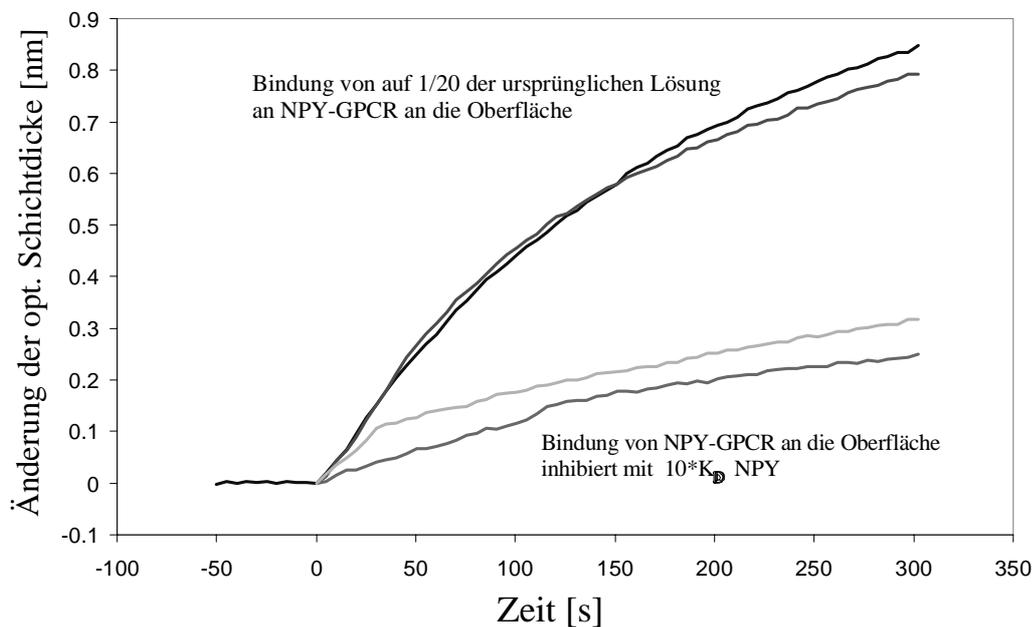


Abbildung 41: Bindungskurve von NPY5-Rezeptor bei einem zwanzigstel der Ursprungskonzentration und anschließende Messung der inhibierten Probe

Bei einem Zwanzigstel der Ursprungskonzentration ist ein noch sehr gutes Signal von über 0,8 nm messbar. Die Zweifachmessung zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Bindung. Bei einer Vorinkubation der Probe wird das

RIfS-Signal sehr stark; auf ca. 200 pm; reduziert, was auf eine spezifische Bindung schließen lässt. Die Tatsache, dass das Signal nicht ganz verschwindet, lässt sich auf Sedimentationseffekte der Membranpräparation und geringfügige unspezifische Wechselwirkungen der unaufgereinigten Probe zurückführen. Auch die Messung der inkubierten Proben wurde zweifach durchgeführt und ist sehr gut reproduzierbar.

4.4.4 Zusammenfassung

Die Methode der RIfS ist ein geeignetes Werkzeug zur Charakterisierung von Wechselwirkungen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Am Beispiel des NPY5-Rezeptors wurde demonstriert, dass eine Messung der Interaktion aus einer Membranpräparation möglich ist. So konnten die Bindungseigenschaften des unveränderten Rezeptors evaluiert werden. Die Problematik der Stabilität von Membranproteinen, die ohne Einbettung in die Zellmembran meist aufgrund von Konformationsänderungen ihre Bindungseigenschaften verlieren, konnte damit umgangen werden.

Die leicht streuenden Eigenschaften der Probe beeinflussten die Messungen nicht. Außerdem wurde durch Inhibierungsversuche gezeigt, dass eine spezifische Wechselwirkung des Rezeptors mit seinem Rezipienten vorlag.

Besonders im Hinblick auf ein Targetscreening für GPCRs demonstrieren diese Messungen eine besondere Eignung der Detektionsmethode.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im ersten Ergebnisteil der Arbeit wurde der Prototyp eines Young Interferometers, das im IPM Freiburg entwickelte IBS 101, bezüglich seiner Eignung als Biosensor untersucht. Das IBS 101 wurde hinsichtlich seiner Fluidik, der Probenhandhabung, der Detektion und der Leistungsparameter Rauschen und Drift, d. h. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze, untersucht und mit dem in Tübingen etablierten RfS-Setup verglichen. Das IBS 101 zeigte zu Beginn starke und unregelmäßige Drift, welche nach einer Veränderung der Fluidik und dem Ersetzen des Halbleiterlasers durch einen He-Ne-Laser stark eingeschränkt werden konnte.

Beim Vergleich von Rauschen und der daran gekoppelten Nachweisgrenze konnten mit dem IBS 101 die Werte der RfS nahezu erreicht werden. Hierzu konnte bei der RfS von einer ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Signalkalibrierung mittels spezifischer Bindung radioaktiv markierter Proteine ausgegangen werden, für das Young-Interferometer musste hierfür auf theoretische Berechnungen zurückgegriffen werden. Bei einem Vergleich der Baseline-Drift zeigte sich jedoch, dass das IBS 101 einen weitaus höheren Wert als die RfS erzielt. Eine bei dieser brechungsindexsensitiven Methode notwendige Referenzierung sollte auch hinsichtlich der Flussbedingungen durchgeführt werden.

Eine der Hauptlimitierungen, verursacht durch die Fluidik, konnte durch ein neues Flusszellenmaterial und dem Einsatz präziserer Spritzenpumpen stark eingeschränkt werden.

Eine nicht immer geradlinige Flussführung kann jedoch immer noch Verstopfungen durch auskristallisierenden Puffer verursachen. Eine weitere Verbesserung der Fluidik, insbesondere eine starke Reduzierung der zu großen Totvolumina, sind für die weitere Arbeit mit dem IBS 101 anzuraten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Detektion mit dem IBS 101 ein Schichtaufbau für die Siliziumoxinitridwellenleiter entwickelt. Im

Hinblick auf spätere kinetische Messungen wurde hier besonders Wert auf eine DA-Polyethylenglykolpräparation gelegt, aber auch ein Aminodextran zur Verfügung gestellt. Damit konnte zum ersten Mal reproduzierbar eine spezifische Antikörperbindung mit dem IBS nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeiten mehrerer Assoziationsmessungen auf einem Wellenleiter, sowie unter verschiedenen Wellenleitern ist hervorragend. Auch konzentrationsabhängige Messungen wurden erfolgreich durchgeführt, jedoch konnte keine Auswertung der Daten nach kinetischen Gesichtspunkten durchgeführt werden, da zu große Totvolumina eine starke Dispersion der Probe und somit kein monoexponentielles Verhalten der Bindungskurven zuließen. Es gelang auch der Nachweis der Bindung des kleinen Moleküls Biotin zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der Methode.

Abschließend lässt sich sagen, dass es sich bei der interferometrischen Detektion mit dem Young Interferometer IBS 101 um eine Methode mit sehr gutem Potential handelt. Im Vergleich zur RIfS und auch anderen kommerziellen Geräten ordnet sie sich anhand der Leistungsparameter gut in das Spektrum der markierungsfreien Detektionstechniken ein. Der Prototyp bietet noch Potential zur Verbesserung, besonders hinsichtlich der Fluidik und der Probenhandhabung. Im Hinblick auf eine Kommerzialisierung sollte jedoch noch eine Signalkalibrierung mittels radioaktiv markierter Substanzen vorgenommen werden. Die komplizierte Chipeinpassung bedarf ebenfalls noch einer Weiterentwicklung.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) anhand allgemeiner Leistungsparameter der Detektion, der Probenhandhabung und Fluidik sowie einer kinetischen Untersuchung eines Modellsystems mit zwei anderen optischen Detektionsverfahren verglichen und in den Gesamtzusammenhang kommerzieller optischer Biosensoren eingeordnet. Das Detektionssystem wurde als Ganzes verglichen, mit all seinen Vorteilen und Limitierungen, um die prinzipielle Eignung der RIfS-Detektion zu demonstrieren.

BIAcore, ausgestattet mit einer hochkomplexen und sehr vorteilhaften Fluidik, und IAsys plus, ohne Fluidik mit einem Doppelküvettesystem, besitzen beide die Möglichkeit zur direkten Signalreferenzierung und somit zur Reduktion von Limitierungen wie unspezifischer Bindung, Bulkeffekten und Drift. Eine Temperaturstabilisierung minimiert den Einfluss der Änderung des Brechungsindex auf das Signal bei Temperaturschwankungen in der Umgebung. Es konnte gezeigt werden, dass der RIfS-Aufbau, als eine robuste und preiswerte Möglichkeit, in höchstem Maß vergleichbare Daten bereits ohne kompliziertes Fluidiksystem und extensive Temperaturkontrolle liefert. Anhand der Charakterisierung der Wechselwirkung eines von der BASF zur Verfügung gestellten Thrombininhibitors mit Thrombin wurde die RIfS mit zwei kommerziellen Geräten verglichen. Hierbei wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Bindungsmessungen bestimmt, wobei die RIfS am besten unter den verglichenen Methoden abschnitt. Anhand der Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, sowie deren Abweichungen sollte zudem die Tauglichkeit der RIfS für die Bestimmung kinetischer Konstanten abgeschätzt werden. Hierbei erzielte die RIfS bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation nach der Linearisierung nach Karlsson die besten Ergebnisse, d. h. die geringste Standardabweichung. Für die eher gebräuchliche Anpassung einer monoexponentiellen Funktion resultierten für das BIAcore die kleinsten Standardabweichungen, wobei die RIfS dennoch mit einem dreifach höheren Wert sehr gute Ergebnisse lieferte. Insgesamt lagen die mit den unterschiedlichen Biosensoren erzielten Ergebnisse für die Assoziationsratenkonstanten innerhalb einer Größenordnung. Für die Ermittlung der Dissoziationsratenkonstanten, die durch auftretende Probleme wie Rückbindung limitiert werden kann, liegen die erhaltenen Werte untereinander ebenfalls im selben Bereich, die erhaltenen Standardabweichungen ebenso. Für Messungen mit BIAcore wurde der niedrigste Wert erhalten, bei RIfS ist die Standardabweichung 4fach höher.

Beim Vergleich der Daten der verschiedenen Instrumente zeigte sich anhand von Messungen unter realen Bedingungen, also mit modifiziertem Transducer und Puffer als Trägerflüssigkeit, dass die Reflektometrische Interferenzspektroskopie, repräsentiert nur durch den Laboraufbau, gleich gute Ergebnisse bei der Bestimmung kinetischer Konstanten liefert, wie die am Markt führenden Geräte.

Der dritte Teil dieser Arbeit umfasst die Kalibrierung des Signals bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie mittels spezifischer Bindung eines radioaktiv markierten Proteins und die Anwendung der Methode auf ein interessantes Problem der biomolekularen Wechselwirkungen.

Die Ergebnisse der Kalibrierung der Methode RIfS stimmen gut mit den theoretischen Vorhersagen überein. Sie bietet zum ersten Mal die Möglichkeit des direkten Vergleichs mit den kommerziellen Methoden und ist unabdingbar bei der Bestimmung und Angabe einer Nachweisgrenze.

Beim Nachweis der Interaktion eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit seinem Liganden, hat sich die RIfS als die geeignete Methode erwiesen. Hier stellte sich ein Messproblem, dessen Lösung mit rein brechungsindexsensitiven Methoden, wie zum Beispiel mit der SPR, mit starken Schwierigkeiten behaftet ist.

Am Beispiel des NPY5-Rezeptors wurde demonstriert, dass mit der RIfS eine Messung der Wechselwirkung aus einer Membranpräparation möglich ist. So konnten die Bindungseigenschaften des unveränderten Rezeptors evaluiert werden. Die Problematik der Stabilität von Membranproteinen, die ohne Einbettung in die Zellmembran meist aufgrund von Konformationsänderungen ihre Bindungseigenschaften verlieren, konnte damit umgangen werden. Die leicht streuenden Eigenschaften der Probe beeinflussten die Messungen nicht. Außerdem wurde durch Inhibierungsversuche gezeigt, dass eine spezifische Wechselwirkung des Rezeptors mit seinem Rezipienten vorlag. Besonders im Hinblick auf ein Targetscreening für GPCRs demonstrieren diese Messungen eine besondere Eignung der Detektionsmethode RIfS.

5.2 Ausblick

Insgesamt fügt sich die RIfS durchaus in das Spektrum der besten der bereits kommerzialisierten optischen Biosensoren ein. Sie erlaubt zeitaufgelöste und markierungsfreie Wechselwirkungsstudien und somit Bestimmung von Spezifität, Kinetik, Affinität oder Konzentrationen in Echtzeit und ohne die Notwendigkeit einer Markierung für ein breites Spektrum biologisch interessanter Substanzen.

Sie bietet dazu noch die Möglichkeit einer einfachen Miniaturisierung und Parallelisierung, was sie zu einer Anwendung in weiten Gebieten der Wirkstoffsuche, einschließlich der Targetidentifizierung, befähigt.

Doch auch als Einzelplatzmesssystem kann die RIfS Anwendung in allen Gebieten der pharmazeutischen und diagnostischen Forschung finden. Die sowohl akademische als auch industriell motivierte Anwendung hat die Akzeptanz optischer Biosensoren verstärkt und einen gesteigerten Bedarf erzeugt. Besonders in der akademischen Anwendung besteht der Bedarf nach einem markierungsfreien Biosensor zur biomolekularen Interaktionsanalytik im unteren Preissegment.

Eine Kommerzialisierung, für die in dieser Arbeit eine Grundlage geschaffen wurde, ist mit der Firma Analytik Jena AG durchgeführt worden. Das zur Zeit in einer Kleinserie produzierte Gerät BIAffinity, siehe Abbildung 42, erlaubt eine biomolekulare Wechselwirkungsanalyse und kann eine preiswerte Alternative zu bestehenden kommerziellen Biosensoren sein.



Abbildung 42: BIAffinity basiert auf dem Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie und erlaubt eine markierungsfreie, einfache, schnelle und zeitaufgelöste Analytik von Bindungsvorgängen

Eine Marktnische ist für die preisgünstigere Variante eines Biosensors vorhanden. Eine Kommerzialisierung eines parallelen Gerätes wäre ebenfalls denkbar, zu der in der Arbeitsgruppe Gauglitz in zahlreichen Projekten mehr als eine Grundlage geschaffen worden ist.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungen

M. Killenberg-Jabs, G. Gauglitz, C. Hänel, Markierungsfreie Detektion biomolekularer Reaktionen, *LaborPraxis* 10, 26-29 (2001).

C. Hänel, G. Gauglitz, Comparison of reflectometric interference spectroscopy with other instruments for label-free optical detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 91-100, 2002.

6.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel[†],
G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, A. Kovar, B. Koppenhöfer,
D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, M. Meyer,
H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, B. Rieger,
A. Rieker, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W.
Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

6.3 Lebenslauf

Name: Cornelia Hänel

Geburtsdatum: 22.07.1971

Geburtsort: Zschopau

Schulbildung: 1978-1988 Allgemeinbildende Polytechnische
Oberschule „Wladimir Majakowski“ Karl-Marx-
Stadt
1988-1992 Friedrich-List-Gymnasium
Reutlingen und Ernährungswissenschaftliches
Gymnasium Reutlingen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992-1998 Studium der Chemie an der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen
1995-1998 Stipendiatin der „Studienstiftung des
deutschen Volkes“

Diplomprüfung: Mai 1998

Diplomarbeit: November 1998 - Mai 1999
bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für
physikalische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: Vergleichende Charakterisierung eines
Prototypen zur Detektion biomolekularer
Wechselwirkungen mittels Reflektometrischer
Interferenzspektroskopie

Promotion: Mai 1999 - Dezember 2002
unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz,
Institut für Physikalische Chemie, Universität
Tübingen.
Titel: Parameteroptimierung für zwei Verfahren
zur markierungsfreien Analyse biomolekularer
Wechselwirkungen

7 Literatur

- [1] Wood RM, Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity, *Phil. Mag.* **23**, (1912).
- [2] Burstein E, Chen WP, Hartstein A, Surface polaritons-propagating electromagnetic modes at interfaces, *J. Vac. Sci. Technol.* **11**, (1974).
- [3] Bernard B, Lengeler B, Electronic Structure of Noble Metals and Polariton-Mediated Light Scattering (eds Agranovich VM, Mills DL), Springer-Verlag, Berlin, (1978).
- [4] Liedberg B, Nylander C, Lundstroem I, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Lab Sensors Actuators* **4**, (1983).
- [5] Flanagan MT, Pantall RH, Surface plasmon resonance and immunosensors, *Electron Lett* **20**, (1984).
- [6] Guermazi S et.al., Further evidence for the presence of anti-protein S autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, *BLOOD Coagul. Fibrinolysis* **11**, (2000).
- [7] Catimel B, Weinstock J, Nerrie M, Domagala T, Nice MC, Micropreparative ligand fishing with a cuvette-based optical resonant mirror biosensor, *J.Chromatogr. A* **869**, (2000).
- [8] Elliot JL, Mogridge J, Collier RJ, A quantitative study of interactions of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen, *Biochemistry* **39**, (2000).
- [9] Charalambous BM, Feavers IM, Peptide mimics elicit antibody responses against the outer-membrane lipooligosaccharide of group B *Neisseria meningitidis*, *FEMS Microbiol. Lett.* **19**. (2000).
- [10] Chen HM, Clayton AH, Wang W, Sawyer WH, Kinetics of membrane lysis by custom lytic peptides and peptide orientations in membrane, *Eur. J. Biochem.* **268**, (2001).
- [11] Xing L et. Al., Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses, *EMBO J.* **19**, (2000).

-
- [12] Inoue K, Arai T, Aoyagi M, Sensitivity of real time viral detection by an optical biosensor system using a crude home-made antiserum against measles virus as a ligand, *Biol. Pharm. Bull.* **22**, (1999).
- [13] McDermott BM Jr, Rux AH, Eisenberg JR, Cohen GH, Ranaciello VR, Two distinct binding affinities of poliovirus for its cellular receptor, *J. Biol. Chem.* **275**, (2000).
- [14] Achen MG et. Al., Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor-D block its interactions with both VEGF receptor-2 and VEGF receptor-3, *Eur. J. Biochem.* **267**, (2000).
- [15] Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S, Each of three binding sites on Complement factor H interacts with a distinct site on C3b, *J. Biol. Chem.* **275**, (2000).
- [16] Vogel M et. al., Mimicry of human IgE epitopes by antiidiotypic antibodies, *J. Mol. Biol.* **298**, (2000).
- [17] Stoop AA, Jespers L, Lasters I, Eldering E, Pannekoek H, High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor (PAI-I), *J. Mol. Biol.* **301**, (2000).
- [18] Tünnemann R, Mehlmann M, Süßmuth R, Pelzer S, Wohlleben W, Fiedler HP, Wiesmüller KH, Gauglitz G, Jung G, Monitoring Studies of Glycopeptide Antibiotic Fermentation Using White Light Interference, *Analytical Chemistry* **73**, (2001).
- [19] Andersen OM et. Al., Identification of the minimal functional unit in the low density lipoprotein receptor-associated protein (RAP), *J. Biol. Chem.* **275**, (2000).
- [20] Holaska JM et. al., Calreticulin is a receptor for nuclear export, *J. Cell. Biol.* **152**, (2001).

-
- [21] Uegaki K et. al., Structure of the CAD domain of caspase-activated Dnase and interaction with the CAD domain of its inhibitor, *J. Mol. Biol.* **297**, (2000).
- [22] Nielsen PK et. al., Identification of major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin α 5 chain, *J. Biol. Chem.* **275**, (2000).
- [23] Li SY, Ramsden JJ, Prenosil JE, Heinzle E, Measurement of adhesion and spreading kinetics of baby hamster kidney and hybridoma cells using an integrated optical method, *Biotechnol. Prog.* **10**, (1994).
- [24] Gaullier JM, Ronning E, Gillooly DJ, Stenmark H, Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues, *J. Biol. Chem* **275**, (2000).
- [25] Ellson CD et. al., Ptdins(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox), *Nature Cell Biol.* **3**, (2001).
- [26] Sauer M, Brecht A, Charisse K, Stemmler I, Gauglitz G, Bayer E, Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: a label free interaction study, *Anal. Chem.* **71**, (1999).
- [27] Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Norden B, Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA)with DNA and RNA studied with the BIAcore technique, *Biochemistry* **36**, (1997).
- [28] Sando S, Saito I, Nakatani K, Scanning of guanine-guanine mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance, *Nature Biotechnol.* **19**, (2001).
- [29] Bier F, Kleinjung F, Scheller FW, Real time measurement of nucleic acid hybridization using evanescent wave sensors – step towards the genosensor, *Sensors Actuators B* **38-39**, (1997).
- [30] Hart DJ, Speight RE, Cooper MA, Sutherland JD, Blackburn JM, The salt dependence of DNA recognition by NF- κ Bp50: a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity, *Nucleic Acids Res.* **27**, (1999).
- [31] Blaesing F, Weigel M, Welzeck M, Messer W, Analysis of DNA-binding domain of *Escherichia coli* DnaA protein, *Mol. Microbiol.* **36**, (2000).

-
- [32] Steinrucke P et. al., Design of helical proteins for real time endoprotease assays, *Anal. Biochem.* **286**, (2000).
- [33] Scire A, Tafani F, Bertoli E, Principato G, Specific interaction of cytosolic and mitochondrial glyoxalase II with acidic phospholipids in form of liposomes results in the inhibition of the cytosolic enzyme only, *Proteins* **41**, (2000).
- [34] Homola J, Yee SS, Gauglitz G, Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors & Actuators* **B54**, (1999).
- [35] LeatherbarrowRJ, Edwards PR, Analysis of molecular recognition using optical biosensors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, (1999).
- [36] Mullett WM, Lai EP, Yeung JM, Surface plasmon resonance-based immunoassays, *Methods* **22**, (2000).
- [37] McDonnell JM, Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, (2001).
- [38] Myszka DG, survey of the 1998 optical biosensor literature, *J. Mol. Recogn.* **12**, (1999).
- [39] Rich RL, Myszka DG, Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature, *J. Mol. Recogn.* **13**, (2000).
- [40] Myszka DG, Rich RL, Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery, *Pharm. Sci. Technol. Today* **3**, 2000.
- [41] Weimar T, Recent trends in the application of evanescent wave sensors, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **39**, (2000).
- [42] Ziegler C, Goepel W, Biosensor development, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, (1998).
- [43] Cooper M, Optical Biosensors in Drug Discovery, *Nature reviews*, (2002).
- [44] Gauglitz G, *Technisches Messen* **62**, (1995).
- [45] Bilitewskie U, Turner APF, *Biosensors for environmental monitoring*, Harwood academic publishers, (2000).

-
- [46] Wohltjen H, Ballantine DS, Jarvis NL, Chemical Sensors and Microinstrumentation, ASC, (1989).
- [47] Baltes H, Göpel W, Hesse J, Sensors *Updates*, Verlag VCH Weinheim, (1996).
- [48] Angel SM, Kulp TJ, Myrick ML, Chem. Sens. Technol **3**, (1991).
- [49] Wagner E, Spenner K, Dendliker R, Sensors, Göpel W, Hesse J, Zemel JN (eds.), Vol. **6**, Weinheim, VCH, (1992).
- [50] Born M, Wolf E, Principles of Optics, New York, Pergamon Press, (1980).
- [51] Hecht E, Zaiec A, Optics, Addison-Wesley, Reading, MA.
- [52] Brecht A, Gauglitz G, Biosens. & Bioelektron. **10**, (1995).
- [53] Struwe P, Sensors, Göpel W, Hesse J, Zemel JN (eds.) Vol. **6**, Weinheim, VCH, (1992).
- [54] Burgess LW, Sens. & Actuators B **29**, (1995).
- [55] Homan DA, Thompsom AW, Bennett DW, Otvos JD, Anal. Chem. **66**, (1984).
- [56] Klotz A, Fluoreszenzbasiertes optisches Biosensorsystem: Entwurf, Modellierung und Optimierung, Dissertation Tübingen, (1998).
- [57] Otto A, Z. Phys. **23a**, (1968).
- [58] Cush R, Cronin JM, Stewart WJ, Maule CH, Molloy J, Goddard NJ, Biosens & Bioelectron. **8**, (1993).
- [59] Lukos W, Sens & Actuators **B29**, (1995).
- [60] Hecht E, Siemens F, (Übers.), Optik, Edison-Wesley, Bonn, München (1989).
- [61] Bergmann L, Schaefer C, Lehrbuch der Experimentalphysik, 9. Auflage (1993), Verlag de Gruyter, Berlin.
- [62] Haake H-M, Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation, Tübingen (2000).

-
- [63] J. Piehler, Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen an chemisch modifizierten Glastypoberflächen, Diplomarbeit, Universität Tübingen, (1993).
- [64] Brecht A, Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen; Dissertation Tübingen (1993).
- [65] Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, Nahm W, Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators B* **11** (1993).
- [66] Wood RW, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Phil. Magm.* **4**, (1902).
- [67] Ritchie RH, Plasma losses by fast electrons in thin films, *Phys. Rev.* **106**, (1957).
- [68] Kretschmann E, Raether H, Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch.***23A**, (1968).
- [69] Otto A, Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Z. Physik* **216**, (1968).
- [70] Nylander C, Liedberg B, Lind T, Gas detection by means of surface plasmon resonance, *Sensors & Actuators* **3**, (1982).
- [71] Liedberg B, Nylander C, Lundström I, Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing, *Sensors & Actuators* **4**, (1983).
- [72] Liedberg B, Nylander C, Lundström I, Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started, *Biosens. & Bioelectron.***10**, (1995).
- [73] Kieser B, Charakterisierung sensitiver Schichten zur Selektivitätssteigerung optischer Chemosensoren, Dissertation, Tübingen (2002).
- [74] Brandenburg A, Differential refractometry by an integrated optical Young-Interferometer, *Sensors & Actuators B* **38-39**, (1997).
- [75] Brandenburg A, Henninger R, Integrated optical Young interferometer, *Applied Optics* **33** No 25, (1994).

-
- [76] Brandenburg A, Krauter R, Künzel C, Stefan M, Schulte H, Interferometric Detection of Bioreactions.
- [77] Tiefenthaler K, Lukosz W, Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors, *Journal of the optical society of America* **B 6**, (1989).
- [78] Tiefenthaler K, Lukosz W, Sensitivity of grating couplers as integrated-optical sensors, *Journal of the optical Society of America* **B 6**, (1989).
- [79] Tamir T, *Guided-Wave Optoelectronics*, Springer Series in Electronics and Photonics **26**, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1988).
- [80] De Feijter JA, Benjamins J, Veer FA, Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface, *Biopolymers* **17**, (1978).
- [81] Birkert O, Haake HM, Schütz A, Mack J, Brecht A, Jung G, Gauglitz G, A streptavidin surface on planar glass substrates for Detection of Biomolecular interaction, *Anal. Biochem.* **282**, (2000).
- [82] Piehler J, Brecht A, Hehl K, Gauglitz G, Protein interactions in covalently attached dextran layers, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, (1999).
- [83] Piehler J, Brecht A, Valiokas R, Liedberg B, Gauglitz G, A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens. & Bioelectron.*, (2000).
- [84] Piehler J, Brecht A, Geckeler KE, Gauglitz G, Surface modification for direct immunoprobes, *Biosens. & Bioelectron.* **11**, (1996).
- [85] Rothmund M, Dissertation, Tübingen, (1999).
- [86] Gauglitz G, Einführung in die Software für das Anfängerpraktikum Physikalische Chemie zur Bewertung von Messergebnissen, Tübingen, (1999).
- [87] Piehler J, Brecht A, Giersch T, Hock B, Gauglitz G, Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *Journal of Immunological methods* **201**, (1997).
- [88] O`Shannessy DJ et al, *Anal. Biochem.*, **249**, (1993).

-
- [89] Karlson R, Michaelson A, Mattson L, Kinetic Analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system, *Journal of Immunological methods*, (1991).
- [90] O'Shannessy DJ, Winzor D, Interpretation of deviations from pseudo-first order kinetic behavior in the Characterization of ligand binding by biosensor technology, *Anal. Biochem.* **236**, (1996).
- [91] Eddowes MJ, Direct immunochemical sensing: Basic Chemical principles and fundamental limitations, *Biosensors* **3**, (1987/88).
- [92] Klingler J, Friedrich T, Site-Specific Interaction of Thrombin and Inhibitors Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophys. J.* **73** (1997).
- [93] Dodt J, Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirundin zu Hirudinmimetica, *Angew. Chem.* **107** (1995).
- [94] Qiu X, Yin M, Padmanadhan K, Krstenansky J, Tulinsky A, Structures of Thrombin Complexes with a Designed and a Natural Exosite Peptide Inhibitor, *J. Biol. Chem.* **268** (1993).
- [95] Schütz A., mündliche Mitteilung, (1998).
- [96] Birkert O, Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation, Tübingen (2001).
- [97] Lindner ME, Gilman AG, General Review, *Scientific American*, (1992).
- [98] Chollet A, Turcatti G, Biophysical approaches to G-Protein-coupled receptors: Structure, function and dynamics, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **13**, (1999).
- [99] Gundermann T, Nurnberg B, Schultz G, Receptors and G-Proteins as primary components of transmembrane signal transduction, Part 1, G-Protein-coupled receptors: structure and function, *J. Mol Med.* **73**, (1995).
- [100] Oliveira P, Paiva ACM, Vriend G, A low resolution model for the interaction of G proteins with G-protein-coupled receptors, *Protein. Eng.* **12** (12), (1999).

-
- [101] Gouldson PR, Snell CR, Reynolds CA, A new approach to docking in the beta 2-adrenergic receptor that exploits the domain structure of G-Protein-coupled receptors, *J. Med. Chem.* **40**, (1997).
- [102] Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR, Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in NPY1 receptor-deficient mice, *Nat. Med.* **4**, (1998).
- [103] Mercer JG, Moar KM, Rayer DV, et al, Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold exposed lean mice. *FEBS Lett* **402**, (1997).
- [104] Xu B, Kalra PS, Moldawer LL, Kalra SP, Increased appetite augments hypothalamic NPY Y1 receptor gene expression: effects of anorexigenic ciliary neurotropic factor, *Regul. Pept.* **75-76**, (1998).
- [105] Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, et al, Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor, *Nat. Med.* **5**, (1999).
- [106] Kokot F, Ficek R, Effects of neuropeptide Y on appetite, *Minor Electrolyte Metab* **25**, (1999).
- [107] Woods SC, Figlewicz DP, Madden L, et al, NPY and food intake: discrepancies in the model, *Regul. Pept.* **75-76**, (1998).
- [108] Zimanyi IA, Fathi Z, Poindexter GS, Central control of feeding behaviour by neuropeptide Y, *Curr. Pharm. Des.* **4**, (1998).
- [109] Sahu A, Kalra SP, Neuropeptidergic regulation of feeding behaviour. Neuropeptide Y, *Trends Endocrinol. Metab* **4**, (1993).
- [110] Mierke DF, Dürr H, Kessler H, Jung G, Neuropeptide Y – Optimized solid-phase synthesis and conformational analysis in trifluoroethanol, *Eur. J. Biochem* **206**, (1992).
- [111] Beck-Sickinger AG, Gaida W, Schnorrenberg G, Lang R, Jung G, Neuropeptide Y: identification of the binding site, *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, (1990).

-
- [112] Beck-Sickinger AG, Jung G, Structure-Activity Relationships of Neuropeptide Y Analogues with Respect to Y₁ und Y₂ Receptors, *Biopolymers (Peptide Science)* **37**, (1995).
- [113] Beck-Sickinger A, Wieland H, Wittneben H, Willim KD Rudolf K, Jung G, Complete L-Alanine scan of neuropeptide Y reveals ligands binding to Y₁ and Y₂ receptors with distinguished conformations, *Eur. J. Biochem.* **225**, (1994).
- [114] Hoffmann S, Rist B, Videnov G, Jung G, Beck-Sickinger AG, Structure-Affinity studies of C-terminally modified analogs of neuropeptide Y led to a novel class of peptidic Y₁ receptor antagonists, *Reg. Peptides* **65**, (1996).
- [115] Cabrele C, Beck-Sickinger AG, Molecular Characterization of the Ligand-Receptor Interaction of the Neuropeptide Y Family, *J. Peptide Sci.* **6**, (2000).
- [116] Piehler J, Brecht A, Geckeler KE, Gauglitz G, Surface modification for direct immunoprobes, *Biosen. & Bioelectron.* **11 (6/7)**, (1996).
- [117] Weller M, Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden, Dissertation TU München (1992).
- [118] Schmitt H-M, Brecht A, Piehler J, Gauglitz G, An integrated system for optical biomolecular interaction analysis **12**, (1997).
- [119] <http://www.biacore.com>.
- [120] <http://www.affinity-sensors.com>.
- [121] Brandenburg A, Differential refractometry by an intergrated optical Younginterferometer, *Sensors & Actuators B* **38-39**, (1997).
- [122] Piehler J, Thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit direkten optischen Transducern, Dissertation, Tübingen (1998).
- [123] Länge K, Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse in markierungsfreien Bindungsassays, Dissertation, (2000).

-
- [124] Hänel C, Vergleichende Charakterisierung eines Prototypen zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Tübingen (1999).
- [125] Persönliche Mitteilungen von Herrn Andreas Brecht.
- [126] Birkert O, Entwicklung und Charakterisierung von Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung biotinylierter Liganden für die Affinitätsanalytik, Diplomarbeit, Tübingen (1998).
- [127] Cussler EL, Diffusion: mass transfer in fluid systems, Cambridge University Press, UK, (1984).
- [128] Internet (2002): <http://www.biacore.com/biomol/pdfs/506.pdf>.
- [129] Affinity Sensors, IAsys Methods Guide **2nd** edn, Affinity Sensors, Cambridge, UK (1996).
- [130] Reichl D, Krage R, Krummel C, Gauglitz G, Sensing of Volatile Organic Compounds Using a Simplified Reflectometric Interference Spectroscopy Setup, Appl. Spectroscopy **54**, (2000).
- [131] Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.), Bioanalytik, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, (1998).
- [132] Schütz A, Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening, Dissertation, Tübingen (2001).