

**Markierungsfreie Untersuchung biochemischer
Erkennung und die Charakterisierung der
Adhäsionseigenschaften von Zellen im
Flusssystem**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Bernd Peter Möhrle

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Januar 2006

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, dieses in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können. Des Weiteren möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen, die andauernde Unterstützung und die stetige Förderung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates und für die gute Zusammenarbeit im Praktikum Physikalische Chemie für Biochemiker bedanken.

Bei Karsten Köhler und Dr. Roland Brock möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Daniela Werth und Dr. Olaf Heidenreich danke ich, dass Sie mir das Protein SRF in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt haben.

Bei Dr. Thomas Flad möchte ich mich für die vielen guten Gespräche, die guten Ideen und die gute Zusammenarbeit bedanken und bedauere es, dass den gemeinsamen Projekten wenig Erfolg beschieden war.

Jörg Bauer und Prof. Dr. Günther Jung möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Projekt MF-HTS danken.

Bei Michael Kumpf, Jan Jaehrling und Rüdiger Frank möchte ich mich für die stetige Unterstützung, ausnehmend guten Diskussionen und die gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe muss großer Respekt für den Zusammenhalt, die gute Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung gezollt werden. Im Besonderen gilt mein Dank: Florian Pröll, Nina Käppel, Günther Proll, Martin Mehlmann, Kerstin Kröger, Goran Markovic, Tina Mutschler, Nikolae Leopold und Jochen Mehne.

Meiner Familie und insbesondere Anne Katrin Dieterle, die mir während meiner Zeit als Doktorand ein großer Rückhalt waren, kann ich gar nicht genug danken.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1 Motivation der Arbeit	1
1.2 Zielsetzung und Gliederung	3
2. Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Biomolekulare Wechselwirkungen	5
2.1.1 Gleichgewicht und Kinetik	6
2.2 Nukleinsäuren	7
2.2.1 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	7
2.2.2 Hybridisierung von Polynukleotid-Einzelsträngen	9
2.2.3 Locked Nucleic Acid (LNA)	9
2.3 Antikörper	10
2.4 Die Erkrankung Zöliakie	13
2.5 Serum Response Faktor (SRF) – ein Transkriptionsfaktor	15
2.6. Jurkat T-Zellen	17
2.6.1 T-Zellen	17
2.6.2 Der T-Zell-Rezeptor	19
2.6.3 T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion	20
2.6.4 Die Rolle von CD28	22
2.6.5 Antikörpervermittelte Zellausbreitung der Jurkat T-Zellen	22
2.7 MALDI-Massenspektrometrie	23
2.7.1 Ionisierungsprinzip	23
2.7.2 Time-of-Flight Massenanalysator	25
2.8 Reflektometrische Interferenzspektroskopie	27
2.8.1 Optische Grundlagen	27
2.8.2 Reflexion und Brechung	27
2.8.3 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten, Interferenz	29
2.8.4 Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)	31
3. Material und Methoden	33
3.1 Materialien	33
3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien, Lösungen und Zellkulturen	33

3.1.2 Proteine	34
3.1.3 Nukleinsäure Oligomere	34
3.1.4 Peptide	34
3.1.5 Antikörper	35
3.1.6 Blutseren	35
3.1.7 Lösungen und Puffer	36
3.1.8 Zellmedium	36
3.1.9 Zellkultur	36
3.1.10 Transducer	37
3.2 Geräte	37
3.2.1 RfS-Messapparatur	37
3.2.2 Kontaktwinkelmessung	40
3.2.3 AFM, Atomkraftmikroskopie	41
3.2.4 MALDI-Massenspektrometer	41
3.2.6 Weitere Geräte	42
3.3 Methoden	42
3.3.1 Oberflächenmodifikationen	42
3.3.2 Immobilisierung von Liganden	45
4. Ergebnisse und Diskussion	48
4.1 Bestimmung der Affinitätskonstanten von DNA, LNA und eines DNA-LNA-Mixmers	49
4.1.2 Diskussion	54
4.2 Untersuchungen auf peptidfunktionalisierten Oberflächen	56
4.2.1 RfS zur Detektion von Antikörpern in Patientenblutseren	56
4.2.2 Untersuchung der Wechselwirkung des Serum Response Faktors, SRF, als Beispiel für eine Protein-Protein-Wechselwirkung	62
4.3 Oberflächenchemie auf ITO-Transducern zur Kopplung von RfS mit der MALDI-Massenspektrometrie	66
4.3.1 Oberflächenchemie auf Indium-Zinn-Oxid	67
4.3.2 Messungen mit RfS auf funktionalisierten ITO-Transducern	70
4.3.3 Einsatz der modifizierten ITO-Transducer in der MALDI- Massenspektrometrie	71

4.3.4 Zusammenfassung	75
4.4 Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von Jurkat T-Zellen mit RIfS	76
4.4.1 Fluoreszenzmikroskopie der Zellausbreitung	76
4.4.2 Markierungsfreie und zeitaufgelöste Detektion der Zellausbreitung durch RIfS	82
4.4.2.1 RIfS-Aufbau zur Untersuchung von Suspensionszellen	82
4.4.2.2 Qualitätskontrolle der hergestellten Transducer	83
4.4.3 RIfS-Messungen der Zelladhäsion der T-Zelllinie Jurkat	85
4.4.4 Erklärung für die Änderung der optischen Schichtdicke durch die Jurkat T-Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen	90
4.4.5 Untersuchung des Verhaltens der Zelllinie JCaM 1.6 und des Einflusses des Aktinpolymerisation-Inhibitors Cytochalasin D Auf Anti-CD3-Oberflächen	92
4.4.6 Betrachtung der Anfangskinetik der Wechselwirkung der Zellen mit den verschiedenen Oberflächen	97
4.4.7 Korrelation der RIfS-Daten mit denen der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen	100
4.4.8 Zusammenfassung	103
5. Zusammenfassung und Ausblick	104
6. Literatur	107
7. Anhang	114
7.1 Abkürzungen	114
7.2 Veröffentlichungen	115
7.2.1 Publikationen	115
7.2.2 Poster	115
7.2.3 Vorträge	116
7.3 Akademische Lehrer	117
7.4 Lebenslauf	118

1. Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Der biochemischen Forschung erschließen sich immer neue Techniken und Methoden. Dabei stehen nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms [Venter 2001] die Proteine im Mittelpunkt des Interesses. Die Information eines Gens kann sich in einer Vielzahl von modifizierten Proteinen ausdrücken. Die Komplexität der Information nimmt, im Gegensatz zum Genom, auf der Ebene der Proteine um ein Vielfaches zu [Tyres 2003].

Die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle bezeichnet man als Proteom. Die Untersuchung des Proteoms wird unter dem Begriff Proteomics zusammengefasst. Von Bedeutung ist das komplexe Zusammenspiel der Proteine innerhalb der Zelle. Dabei wird nach Isoformen und posttranslationalen Modifikationen der Proteine gesucht, die Struktur der Proteine erforscht, die Zusammensetzung von Proteinkomplexen höherer Ordnung bestimmt und die Interaktionen von Proteinen betrachtet.

Um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle bzw. die Interaktion von Proteinen untereinander zu beobachten, werden unter anderen FRET-Techniken oder das GFP (green fluorescent protein) [Hailey 2002] eingesetzt. Dabei können die Eigenschaften der Proteine durch das kovalente Anknüpfen der Fluoreszenzfarbstoffe verändert werden. Um die Eigenschaften von Proteininteraktion möglichst unverfälscht zu charakterisieren, sind markierungsfreie Methoden besonders geeignet. Die gebräuchlichen markierungsfreien Methoden sind SPR (Surface Plasmon Resonance) [Nakatani 2001; Shumaker-Parry 2004] und die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) [Sauer 1999; Rothmund 1997]. Mit diesen Methoden können Interaktionen von Bindungspartnern markierungsfrei und zeitaufgelöst untersucht werden.

Die RIfS kann auch in einem Array-Format Wechselwirkungen von Bindungspartnern beobachten [Kröger 2002] und eignet sich deshalb für die pharmazeutische Forschung und die medizinische Diagnostik.

Eine Schlüsseltechnologie in der Proteomics ist die Massenspektrometrie zur Identifizierung von Proteinen [Aebersold 2003]. Die Massenspektrometrie kann allerdings keine Informationen über die Wechselwirkungen von Proteinen liefern, dennoch ist sie eines der wichtigsten Hilfsmittel in der Proteom-Forschung. Die Massenspektrometrie ist damit komplementär zur RIFS.

Zusammenfassend ist die markierungsfreie Untersuchung von Interaktionen biologisch aktiver Moleküle erforderlich, um die Moleküle in ihrer nativen Form zu charakterisieren. Ebenso sind die Untersuchungen von komplexen Reaktionen von lebenden Zellen und die Kopplung der RIFS mit der Massenspektrometrie wünschenswert.

1.2 Zielsetzung und Gliederung

Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen verschiedene biochemische Erkennungsreaktionen markierungsfrei untersucht und quantifiziert werden. Dies wird mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) erfolgen. Die Einsatzfähigkeit der markierungsfreien RIfS für die Proteinbiochemie soll anhand verschiedener Beispiele mit steigender Komplexität gezeigt werden.

Dazu sollen die Hybridisierungseigenschaften des neu entwickelten Nukleinsäurederivats LNA zu komplementärer DNA betrachtet werden.

Mit der Entwicklung eines Biosensors für die Diagnostik von Autoimmunantikörpern gegen die Erkrankung Zöliakie wird untersucht werden, ob Biosensoren basierend auf der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik geeignet sind.

Mit der Untersuchung der Wechselwirkung des Proteins SRF (Serum Response Faktor) zu einem Erkennungspeptid soll gezeigt werden, dass sich RIfS für die Untersuchung schwacher Protein-Protein-Wechselwirkungen von Signalproteinen eignet.

Basierend auf der Erkenntnis, dass sich Jurkat T-Zellen durch den Stimulus eines Anti-CD3-Antikörpers beginnen sich auf einer Oberfläche ausbreiten, soll dieses Ausbreitungsverhalten markierungsfrei in einem Flusssystem beobachtet werden. Dabei soll der Einfluss verschieden funktionalisierter Oberflächen und eines Inhibitors untersucht werden. Ebenso soll das Verhalten der Kontroll-Zelllinie JCaM 1.6 betrachtet werden.

Zum weiteren Einsatz der RIfS in der Proteomanalyse wird die Verwendung von elektrisch leitenden Transducer-Oberflächen für die Kopplung von RIfS mit der MALDI-Massenspektrometrie untersucht werden.

Gliederung

In einem einführenden Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten biologischen Systeme und Techniken erläutert werden. Der dargelegte theoretische Hintergrund ist notwendig für das Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit.

Im Kapitel Material und Methoden wird ausführlich auf die eingesetzten Materialien und Versuchsprotokolle eingegangen.

Das Kapitel Ergebnisse und Diskussion ist in vier Abschnitte unterteilt. In den beiden ersten Abschnitten werden die Ergebnisse der untersuchten biochemischen Erkennungsreaktionen durch die Reflektometrische Interferenzspektroskopie dargelegt und diskutiert. Im dritten Abschnitt wird die Etablierung einer Oberflächenchemie auf elektrisch leitenden Indium-Zinn-Oxid-(ITO)-Transducern gezeigt, und der Einsatz für eine Kopplung mit der MALDI-Massenspektrometrie diskutiert. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Beobachtung der Zelladhäsion von Jurkat T-Zellen auf funktionalisierten RfS-Transducern im Flusssystem.

Kapitel fünf fasst die Ergebnisse zusammen und gibt einen kurzen Ausblick.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Biomolekulare Wechselwirkungen

Die Funktion einer Zelle oder eines Organismus beruht auf den nicht-kovalenten Wechselwirkungen von biologisch aktiven Molekülen: Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren. Dieses biochemische Grundprinzip zieht sich durch die gesamte Natur. Die molekularen Bausteine der Biomoleküle werden durch kovalente Kräfte zusammengehalten. Die Informationen aber, die diese Makromoleküle tragen, werden durch die viel schwächeren, nicht-kovalenten Bindungen ausgedrückt. Diese schwachen Bindungen bilden sich sowohl innerhalb der Moleküle aus und bestimmen damit die dreidimensionale, aktive Struktur, als auch zwischen unterschiedlichen Makromolekülen und bestimmen damit, welche Strukturen und wie diese Strukturen miteinander wechselwirken, also welche Information übertragen wird.

Die in Biomolekülen wirksamen nicht-kovalenten Anziehungskräfte lassen sich in vier Typen einteilen - Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen, Van der Waals-Kräfte und Hydrophobe Wechselwirkungen (siehe Tabelle 2-1). Hydrophobe Wechselwirkungen stellen dabei keine direkten Anziehungskräfte dar, sondern die hydrophoben Gruppen oder Molekülregionen werden durch die dreidimensionale Struktur des Wassers zusammengezwungen.

*Tabelle 2-1: Attraktionskräfte biomolekularer Wechselwirkungen in wässrigem Milieu
[Alberts 1997]*

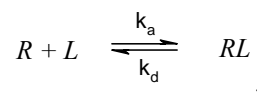
Attraktionskraft/ Bindungstyp	Länge [nm]	Abstandsabhängigkeit	Energie [kJ/mol]
Kovalent	0,15	-	380
Ionisch	0,25	r^{-2}	12,5
Wasserstoffbrücken	0,30	r^{-6}	4
Van der Waals-Kräfte	0,35	r^{-10}	0,4
Hydrophobe Wechselwirkungen	-	Keine diskreten Abhängigkeiten	-

Diese vier Typen von nicht-kovalenten Wechselwirkungen sind alle reversibel. Das heißt die Bindung kann wieder gelöst werden, ohne die Funktionstüchtigkeit der Erkennungsregion zu beeinträchtigen. Zusätzlich können die schwachen Wechselwirkungen eine sehr hohe Spezifität und Affinität aufweisen, wie bei der Erkennung eines Antigens durch den Antikörper, oder die exakte Basenpaarung in der DNA. Die Wechselwirkung zwischen dem Protein Avidin und Biotin erreicht sogar eine Bindungsenergie von 88 kJ/mol [Richards 1990] und besitzt eine sehr hohe Affinität mit einer Affinitätskonstanten $K_{Aff} = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [Livnah 1993]. Die hohe Affinität kommt durch den kumulativen Beitrag der attraktiven Kräfte über die gesamte Wechselwirkungsoberfläche zustande.

2.1.1 Gleichgewicht und Kinetik

Die biomolekularen Wechselwirkungen werden in dieser Arbeit auf einer Sensoroberfläche untersucht. Es handelt sich um eine Grenzfläche. Die Reaktionen werden also in einem heterogenen System beobachtet.

Im Folgenden wird das Bindungspaar mit Rezeptor (R) und Ligand (L) bezeichnet. Der Rezeptor bindet spezifisch an den Liganden. Für eine einfache Reaktion, bei der der Rezeptor in Lösung und der Ligand auf der Sensoroberfläche immobilisiert sind, gilt:



mit den kinetischen Konstanten, k_a Assoziationsratenkonstante und k_d Dissoziationsratenkonstante.

Die thermodynamische Stabilität des gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexes lässt sich aus dem Massenwirkungsgesetz berechnen:

$$K_{Aff} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[RL]}{[R][L]},$$

wobei [RL] die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes, [R] die Konzentration des Rezeptors und [L] die Konzentration des Liganden darstellen. Die Affinitätskonstante lässt sich dabei ebenso durch das Verhältnis der Ratenkonstanten bestimmen.

Die Geschwindigkeit dieser Wechselwirkung lässt sich beschreiben durch:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a[R][L] - k_d[RL].$$

Durch die Messungen im Fluss bleibt die Rezeptorkonzentration konstant und wir erhalten ein Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a \cdot c_R \cdot [RL]_{\text{Gleichgewicht}} - (k_a \cdot c_R + k_d)[RL],$$

mit c_R = eingesetzte Rezeptorkonzentration.

Die Lösung der Differenzialgleichung lautet:

$$[RL](t) = [RL]_{\text{Gleichgewicht}} (1 - e^{-k_s t}),$$

$$\text{mit } k_s = k_a \cdot c_R + k_d$$

$$\text{und } [RL]_{\text{Gleichgewicht}} = [RL]_{\infty} \frac{K_{\text{Aff}} \cdot c_R}{1 + K_{\text{Aff}} \cdot c_R}.$$

Eine synonyme Schreibweise ist bei Betrachtung des Sensorsignals durch die Beladung Γ gegeben [Piehler 1997]:

$$\Gamma_{\text{Gleichgewicht}} = \Gamma_{\text{max}} \frac{K_{\text{Aff}} \cdot c_R}{1 + K_{\text{Aff}} \cdot c_R}.$$

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Desoxiribonukleinsäure (DNA)

Nukleotide und Nukleinsäuren sind für die Lebensvorgänge aller bekannten Organismen von überragender Bedeutung. Nukleinsäuren, die Polymere von Nukleotiden, dienen in der Form der DNA (Deoxyribonucleic acid), als die universellen Träger genetischer Information. Die Erbinformation aller Lebewesen wird in DNA gespeichert. In Eukaryonten liegt das Erbgut in seiner Transportform als Chromosomen im Zellkern vor.

Die Identifizierung der DNA als Träger der genetischen Information begann streng genommen mit den grundlegenden Gesetzen der Vererbung durch Gregor Mendel 1866. Die Strukturaufklärung durch James Watson und Francis Crick [Watson 1953]

leitete die stürmische Entwicklung der Molekularbiologie ein, die einen ihrer Höhepunkte in der Sequenzierung des menschlichen Genoms hatte [Venter 2001].

Die Nukleotide bestehen aus Purin- oder Pyrimidin-Basen, die die Strukturelemente bilden, einer Riboseeinheit und einem Phosphatrest. Die DNA setzt sich aus zwei Purinbasen, Adenin und Guanin, und zwei Pyrimidinbasen, Cytosin und Thymin, zusammen. Die Nukleotide werden untereinander durch Phosphodiesterbindungen miteinander zwischen dem C-3'-Atom einer Riboseeinheit und dem terminalen C-5'-Atom der nächsten Riboseeinheit verknüpft [Löffler 1997].

Die DNA besteht aus zwei Polynukleotidketten. Diese sind antiparallel zueinander angeordnet und bilden den Doppelstrang. Die DNA besteht aus zwei außerordentlich langen Polynukleotidketten, die immer unverzweigt vorliegen. Durch die Basenpaarung ist die DNA zu einer rechtsgängigen Doppelhelix verknüpft. Die Basen zweier Einzelstränge gehen dabei spezifische Basenpaarungen mit ihren komplementären Basen ein. Dabei bilden sich zwischen Guanin (G) und Cytosin (C) drei Wasserstoffbrückenbindungen ($\Delta G_f^0 = -10 \frac{kJ}{mol}$) aus, zwischen dem Paar Adenin

(A) und Thymin (T) zwei Wasserstoffbrücken ($\Delta G_f^0 = -5 \frac{kJ}{mol}$), siehe Abbildung 2-1.

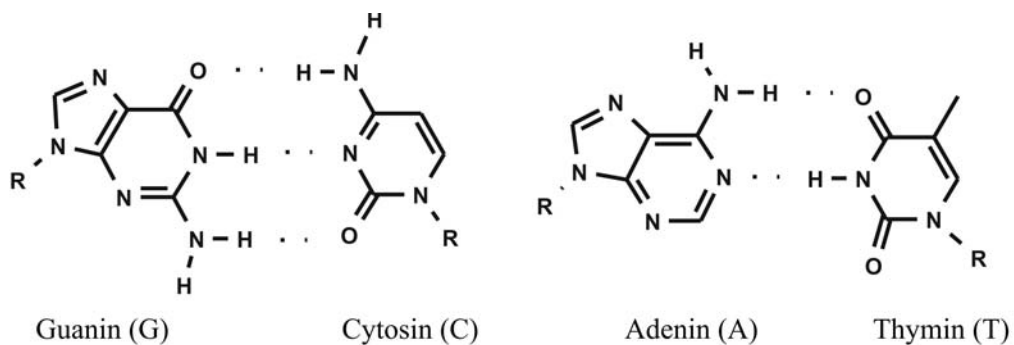


Abbildung 2-1: Basenpaarungen

Die Ausbildung dieser spezifischen Wasserstoffbrücken geben der DNA ihre definierte räumliche Struktur und ihre hohe Spezifität. Zwischen den Phosphatrückgraten bilden sich zwei unterschiedlich breite Furchen aus, eine große und eine kleine. In diese können DNA-bindende Proteine binden, wie z.B. Transkriptionsfaktoren.

2.2.2 Hybridisierung von Polynukleotid-Einzelsträngen

Die spezifische Anlagerung zweier komplementärer Polynukleotidstränge bezeichnet man als Hybridisierung, die Trennung zweier Stränge wird als Denaturierung bezeichnet.

In der Molekularbiologie wird die Bindungsstärke zweier komplementärer Einzelstränge über die Schmelztemperatur bestimmt. Der Schmelzpunkt (T_m) ist dabei diejenige Temperatur, bei der 50% des Doppelstranges aufgeschmolzen ist. Der T_m steigt mit dem Anteil von GC-Paaren an, da diese drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Der Schmelzpunkt kann näherungsweise berechnet werden:

$$T_m = \left(81,5 + \log(\text{Salzkonzentration}) - \frac{675}{\text{Anzahl_der_Basenpaare}} + 0,41 \cdot (\%GC) \right) [^{\circ}\text{C}].$$

Ein weiterer wichtiger Energiebeitrag für die Stabilität der Doppelhelix entsteht durch die Wechselwirkung der gestapelten Basenpaare, das sogenannte „Stacking“. Dies wird im Konzept des nächsten Nachbarn zur Vorhersage von Schmelzpunkten genutzt [Lipsky 2001].

2.2.3 Locked Nucleic Acid (LNA)

LNA (Locked Nucleic Acid) ist eine Nukleinsäure analoge Verbindung, die aus 2'-O, 4'-C-Methylen-β-D-Ribofuranosyl Nukleotiden aufgebaut ist. Als Strukturmerkmal

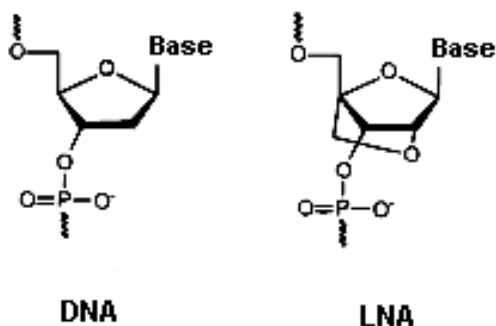


Abbildung 2-2: Struktur von DNA und LNA.

haben die LNA-Monomere eine arretierte bicyklische Furanoseeinheit, die der Ribosekonformation, wie sie in RNA (Ribonucleinsäure) vorkommt, ähnelt (siehe Abbildung 2-2) [Koshkin 1998a].

Oligomere, kurze Polynukleinsäuren, die aus LNA-Monomeren bestehen und DNA-LNA-Mixmere zeigen einen deutlich höheren Schmelzpunkt bei der

Hybridisierung mit ihren komplementären DNA-Strängen als DNA-Oligomere. Dies

bedeutet, dass Doppelhelices von Nukleinsäuren, die in ihrer Sequenz LNA-Monomere beinhalten, eine größere thermische Stabilität bei gleichbleibender Spezifität besitzen [Singh1998a; Singh 1998b]. Bei der Hybridisierung von kurzen LNA-Oligomeren miteinander wurden Schmelztemperaturen bis zu 93°C gemessen [Koshkin 1998b], Schmelztemperaturen, die DNA erst bei einer wesentlich größeren Basenzahl erreichen. Der Austausch eines DNA-Monomers gegen ein LNA-Monomer führt dabei zu einer durchschnittlichen Schmelztemperaturerhöhung von +2°C. Es konnte gezeigt werden, dass zur thermischen Stabilität des Oligomers die Pyrimidin-Basen wesentlich mehr dazu beitragen, als die Purin-Basen [McTigue 2004]. Die höhere Stabilität dieser modifizierten Nukleinsäure ist das Ergebnis eines effektiveren „Stackings“ der Basen in der Doppelhelix, wie durch NMR-Messungen gezeigt werden konnte [Nielsen 2000; Nielsen 2004].

Neben der höheren thermischen Stabilität und der damit verbundenen effektiveren Bindung an komplementäre DNA, besitzt LNA noch weitere Vorteile:

- ihr großes Potential als „antisense“ Moleküle, spezifische kurze Bindungsnukleinsäure, in vivo und in vitro [Vester 2004];
- die Eignung als Hilfsmittel für die Analyse von SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) [Ugozzoli 2004] und
- ihre Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen.

Dabei reicht der Einbau von LNA-Monomeren aus, um ein DNA-LNA-Mixmer vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen [Kurreck 2002].

2.3 Antikörper

Eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdmolekülen und Fremdorganismen spielt die humorale Immunabwehr durch Antikörper. Antikörper werden durch B-Lymphozyten produziert und sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors. Die Antikörpermoleküle, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Glykoproteine und erfüllen zwei wesentliche Funktionen im Körper. Zum einen binden sie spezifisch an den Fremdkörper, der die Immunantwort hervorgerufen hat, und zum anderen mobilisieren sie andere Zellen, den Fremdkörper zu eliminieren.

Es werden fünf verschiedene Klassen von Antikörpern unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgM und IgG, siehe Tabelle 2-2. Die einzelnen Klassen von Immunglobulinen erfüllen unterschiedliche Aufgaben im Körper. IgA bildet die erste Verteidigungslinie und schützt die Körperoberfläche gegen eindringende Mikroorganismen. IgA tritt deshalb selektiv z. B. in der Tränenflüssigkeit, Speichel, Schweiß und im Gastrointestinaltrakt auf. IgE bildet die zweite Verteidigungslinie. IgE bindet an Mastzellen und bewirkt die Ausschüttung von Histamin und chemotaktischen Faktoren, wodurch Gefäßerweiterung und lokale Entzündungen ausgelöst werden. IgE ist ebenfalls verantwortlich für allergische Reaktionen durch externe Allergene, wie Heuschnupfen und Asthma. IgM liegt als Pentamer vor und besitzt eine niedrige Bindungskonstante an das entsprechende Antigen. Diese niedrige Bindungsaffinität wird durch Mehrfachbindung ausgeglichen. IgD findet sich meist als Rezeptor auf Lymphozyten-Subpopulationen. IgG ist der Hauptantikörper der sekundären Immunreaktion im Blut und im Gewebe.

Tabelle 2-2: Übersicht über die Antikörper/Immunglobulin-Klassen [Alberts 1997]

Eigenschaften	Antikörper/Immunglobulin-Klassen				
	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
H-Kette	μ	δ	γ	α	ϵ
L-Kette	κ oder λ				
Zahl der Antikörperuntereinheiten	5	1	1	1 oder 2	1
Anteil der Ig-Klasse im Blut [%]	10	<1	75	15	<1
Molekulargewicht in kDa	950	180	150	160	190

Alle Antikörper unterliegen einem ähnlichen Bauplan. Am Beispiel von IgG sollen die strukturellen Merkmale beschrieben werden (siehe Abbildung 2-3). IgG besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten. Einer schweren Kette (heavy), H-Kette, mit einer Molekülmasse von ca. 50 kDa, und einer leichten Kette, L-Kette, mit ca. 25 kDa. Beide Ketten sind durch zwei Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbunden. Ein Antikörper-Molekül besteht aus jeweils zwei identischen Paaren von L- und H-Ketten, die wiederum durch eine Disulfid-Brücke verknüpft sind. Ein Antikörpermolekül hat damit zwei identische Antigenbindungsstellen und annähernd die Form eines Y.

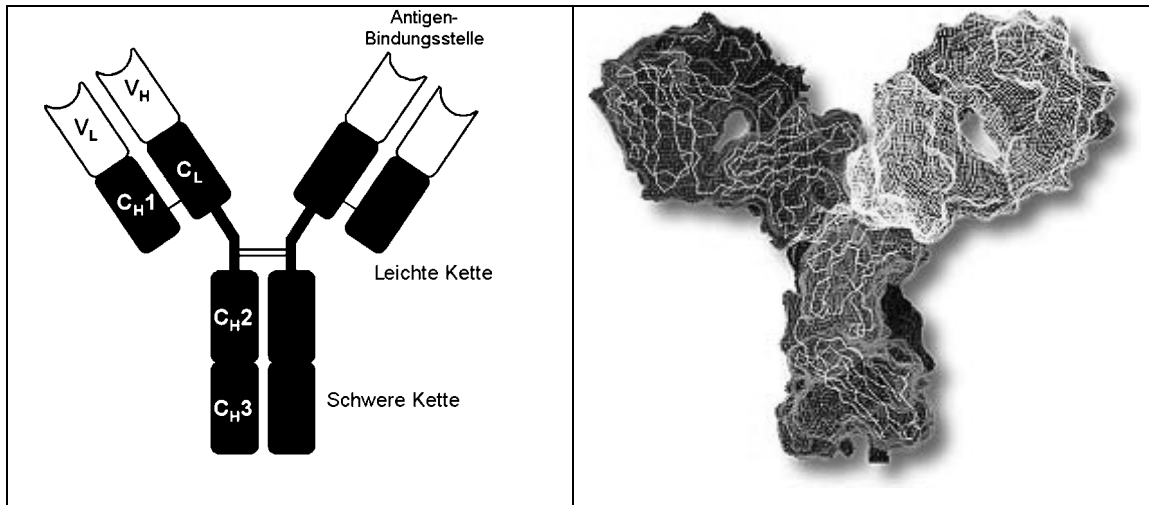


Abbildung 2-3: Links: schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers; Rechts: Proteinstruktur.

In Antikörpern gibt es zwei verschiedene L-Ketten, nämlich κ und λ , und fünf verschiedene schwere Ketten, nach denen die fünf Immunglobulin-Klassen bezeichnet sind. Die Ketten bestehen aus ähnlichen, ungefähr 110 Aminosäuren langen Proteinstrukturen, auch Proteindomänen genannt. Diese wiederkehrenden Strukturen bezeichnet man auch als Immunglobulindomänen. Proteine, die diese Proteinstruktur aufweisen, gehören zu der Familie der Immunglobuline.

Der carboxyterminale Bereich der H- und der L-Ketten, wird als konstante, C-Domäne, bezeichnet, da sie keinen Veränderungen unterliegt. Die aminoternale Region ist die variable oder V-Domäne, die den Antikörpern die Möglichkeit verleiht, eine unbeschreibliche Vielzahl von Antigenen spezifisch zu erkennen und zu binden. Die Gerüstregionen der drei hypervariablen Regionen, sowohl der H- als auch der L-Kette, die die Antigenbindungsstelle bilden, sind β -Faltblätter. Die drei hypervariablen Schleifen je Kette bestimmen die Antigen-spezifität durch eine Oberflächenstruktur, die dem Antigen komplementär ist; man nennt sie auch komplementaritätsbestimmende Regionen CDR (*complementary determining regions*). Da die CDR beider Ketten zur Ausbildung der antigenbindenden Stelle beitragen, bestimmt die Kombination der unterschiedlichen Ketten ihre Spezifität. Die Möglichkeit des Immunsystems, durch Kombination variabler Regionen von schweren und leichten Ketten Antikörper unterschiedlicher Spezifität zu erzeugen, nennt man kombinatorische Vielfalt oder

Diversität. Die unterschiedlichen variablen Ketten werden durch somatische Rekombination separater Gensegmente erzeugt.

Die Region aus den sechs CDR, durch welche das Antigen gebunden wird, bezeichnet man als Paratop, die entsprechend komplementäre Region des Antigens als Epitop [Janeway 2002].

2.4 Die Erkrankung Zöliakie

Zöliakie, auch Sprue beim Erwachsenen oder gluteninduzierte Enteropathie genannt, ist eine chronische Erkrankung des Dünndarms. Sie äußert sich in den relativ unspezifischen Symptomen wie Adynamie, Diarrhoe und Gewichtsverlust. Weitere Leitsymptome sind Anämie, Ödeme und Knochenschmerzen als Zeichen einer Kalziumstoffwechselstörung. Die Symptomatik beginnt meist zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr. Daneben besteht ein weiterer Häufigkeitsgipfel im höheren Lebensalter. Im Dünndarm ist die Zöliakie gekennzeichnet durch eine abnorme Darmzottenabflachung und Darmzottendestruktion. Dadurch bedingt ist eine schlechtere Aufnahme von Nahrungsbestandteilen aus dem Dünndarm, auch Malabsorption genannt.

Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Die Disposition in der Bevölkerung ist an genetische Faktoren geknüpft und liegt bei ca. 0,2%. Direkte Verwandte sind zu 10% betroffen. Die Histokompatibilitätsantigene HLA-B8 und HLA-DW3 sind bei Zöliakiepatienten gehäuft. Zusätzlich besteht eine Assoziation zu Diabetes mellitus (Kinder) und zu verschiedenen, meist autoimmunen Lebererkrankungen. Außerdem besteht ein stark erhöhtes Risiko für Lymphome, gastrointestinale und ösophagale Karzinome [TIM 1999].

Ursache der Zöliakie ist eine Überempfindlichkeit gegen Gluten, eine Proteinfraction im Getreide. Der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Getreide und dem Ausbruch der Erkrankung wurde 1950 hergestellt. Das Gluten lässt sich in vier Fraktionen auftrennen. Zu einem geringen Anteil sind dabei Albumin und Globuline, sowie Lipide und Kohlenhydrate enthalten. Die beiden Hauptfraktionen bilden die alkohollöslichen Gliadine und die alkoholunlöslichen Glutenine [Silano 1999]. Die Gliadine lassen sich nach ihrer Mobilität in der Gelelektrophorese noch in α , β , γ und

ω Gliadine unterscheiden. Proteolytisch abgebaute Peptide dieser Gliadine konnten als Auslöser der chronischen Entzündungsreaktionen identifiziert werden [Ciclitira 1984]. Gliadin bindet auch an das körpereigene Transmembranenzym Transglutaminase. Ein Kennzeichen der Immunreaktion auslösenden Peptide sind ihr außergewöhnlich hoher Anteil an den Aminosäuren Prolin und Glutamin. In *vitro* konnte gezeigt werden, dass durch Präsentation der Gliadin-Peptide als Epitop auf der Zelloberfläche T-Helferzellen und Makrophagen aktiviert werden, um die präsentierenden Zellen zu zerstören [Halstensen 1993]. Das Immunsystem bildet dabei nicht nur Antikörper gegen die Gliadinpeptide, sondern auch gegen die Transglutaminase [Dietrich 1997] und den Gliadin-Transglutaminase-Komplex, dessen Antikörper in der Medizin Anti-Endomysium-Antikörper genannt werden. Diese Komplexbildung und die immunologische Erkennung als „fremd“ werden als Ursache für die Zöliakie angesehen [Marsh 2000]. Dabei werden hauptsächlich Antikörper der Klasse IgA gebildet und weniger IgG [Mäki 1997]. Aufgrund des Mechanismus der Erkrankung [Sollid 2000] kann die Zöliakie / Sprue sowohl als allergische Erkrankung, durch die Getreideunverträglichkeit, als auch als Autoimmunerkrankung angesehen werden, da Antikörper gegen die körpereigene Transglutaminase gebildet werden.

Über eine glutenfreie Ernährung bessern sich die klinischen Beschwerden innerhalb von Tagen. Die Veränderungen im Dünndarm sind reversibel und normalisieren sich nach Wochen bis Monaten.

Die Zöliakie kann über einen pathologisch ausfallenden D-Xylose-Test, der die Malabsorption im Dünndarm aufzeigt, sowie über positive Antikörpertests diagnostiziert werden. Zur Identifizierung werden Antikörper gegen eine teure genetisch überexprimierte und aufgereinigte Transglutaminase gesucht. Eine sichere Diagnose ist bisher nur der biopsische Nachweis einer Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut. Beweisend ist jedoch nur die Reversibilität der histologischen Veränderungen bei einer glutenfreien Diät. Die Biopsie ist für Patienten ein komplikationsträchtiges Verfahren zur Diagnosestellung, deshalb muss das Ziel sein, über schnelle, einfache, nicht-invasive und kostengünstige Analyseverfahren eine sichere Diagnose zu stellen.

2.5 Serum Response Faktor (SRF) - ein Transkriptionsfaktor

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die notwendig sind, die Transkription, d.h. das Kopieren eines Gens von DNA in mRNA, bei Eukaryonten zu starten oder zu kontrollieren. Die mRNA ist die Transportform der Gene aus dem Kern. Im Zytosol dient die mRNA als Matrize für die Proteinbiosynthese. Zur Kontrolle der Gene binden die Transkriptionsfaktoren an die DNA und dort an spezifische palindromische Erkennungsregionen, *Responsive Elements* genannt. Diese Sequenzen befinden sich in den Promotorregionen der Gene. Sie kontrollieren damit die Genexpression.

Der Serum Response Faktor (SRF) wurde 1984 von Greenberg entdeckt [Greenberg 1984]. Die Erkennungssequenz des SRF auf der DNA lautet CCATATTAGG, das *Serum Response Element* (SRE). Aufgrund seiner Basensequenz wird das SRE auch CArG-Box genannt. Ungefähr 30 Gene wurden bisher identifiziert, die ein SRE in ihrer Promotorregion haben, und folglich von SRF kontrolliert werden; unter ihnen prominente Gene wie die Proto-Onkogene c-fos [Treisman 1986], FosB [Lazo 1992] und JunB [Perez-Albuerne 1993], aber auch neuronale Gene und muskuläre Gene [Chai 2002].

Der SRF besteht aus 508 Aminosäuren und hat drei wichtige Domänen: die SRE-DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne, eine Transaktivierungsdomäne und verschiedene Phosphorylierungsstellen. Die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne ist unter Eukaryonten hoch konserviert, sie wird deshalb auch MADS-Box genannt.

SRF ist ein wichtiger Regulator für viele Gene, die mit dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung zusammenhängen. SRF reguliert ebenfalls die Transkription, die durch die Einwirkung von Neurotransmittern, Stress, Substanzen, die den intrazellulären Kalziumspiegel erhöhen, und von viralen Aktivatoren hervorgerufen wird.

Es gibt zwei Klassen von Signalmechanismen, die in die Regulierung der SRF-Aktivität eingreifen [Johansen 1994]. Eine ist die TCF (Ternary Complex Factor) abhängige Aktivierung über die Raf-Ras-MAP-Kinase-Signalkaskade.

Der TCF enthält wie der SRF ebenfalls drei Domänen. Die DNA-Bindedomäne, die B-Box, die notwendig ist für die Interaktion des TCF mit dem SRF, und eine Carboxyterminale C-Domäne, die Phosphorylierungsstelle für die MAP-Kinase. Die

Phosphorylierung des TCF durch die MAP-Kinase bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb des Proteins, die dazu führt, dass die DNA-

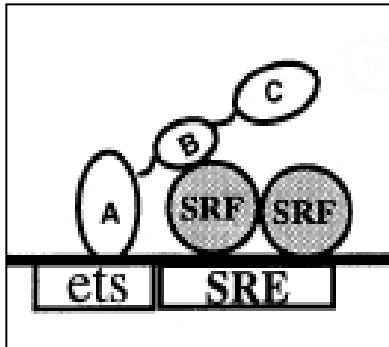


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Wechselwirkung von SRF und TCF über die B-Box [Ling 1997].

möglich [Ling 1997]. SRF, TCF und DNA bilden dabei zusammen den „Ternary Complex“. Ohne diese schwache intermolekulare Wechselwirkung ist keine Transkription der Zielgene möglich.

Bindedomäne und die B-Box freigelegt werden. Erst dies ermöglicht es dem TCF, an die DNA zu binden [Yang 1999]. Der SRF wird ebenfalls über Kinasen phosphoryliert und damit in die Lage versetzt an sein SRE zu binden, unabhängig von der TCF aktivierenden Kinase-Signalkaskade [Heidenreich

1999].

Die B-Box ist das wichtige Verbindungsglied der Proteine SRF und TCF (siehe Abbildung 2-4). Ohne die Wechselwirkung der B-Box des TCF mit dem SRF ist keine stabile Bindung beider Proteine auf der DNA

2.6 Jurkat T-Zellen

2.6.1 T-Zellen

Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Diese pluripotenten Zellen teilen sich und erzeugen so zwei spezialisierte Typen von Stammzellen: eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus der sich T- und B-Lymphozyten bilden, die für die erworbene Immunität verantwortlich sind, und eine myeloide Vorläuferzelle, aus denen die restlichen zellulären Bestandteile des Blutes hervorgehen. Die T- und B-Lymphozyten unterscheiden sich durch ihre Antigenrezeptoren und dem Ort, an dem sie ausdifferenzieren. T-Zellen reifen im Thymus, daher das T, B-Zellen im Knochenmark (bone marrow), daher das B. Gereifte T- und B-Lymphozyten zirkulieren zwischen dem Blut und dem lymphatischen Gewebe. T-Zellen differenzieren zu T-Effektorzellen mit einer Reihe verschiedener Funktionen.

Es gibt zwei wichtige Untergruppen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen. Diese Untergruppen lassen sich durch ihre Zelloberflächenproteine CD4 und CD8, bzw. durch die durch sie erkennenden MHC (Major Histocompatibility Complex)-Moleküle unterscheiden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Proteinen, Klasse I und Klasse II. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur und dem Expressionsmuster in Geweben des Körpers. CD4 Moleküle der T-Zellen binden und erkennen MHC-II-Moleküle, T-Zellen mit dem CD8 Oberflächenprotein erkennen MHC-I-Moleküle. Die Bindung dieser Oberflächenproteine ist neben der Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor notwendig für eine effiziente Reaktion der T-Zellen, man nennt sie deshalb auch Co-Rezeptoren.

Die protektive Funktion von T-Zellen beruht auf ihrer Fähigkeit, Zellen zu erkennen, die Krankheitserreger beherbergen. Die T-Zellen erkennen dabei Proteinfragmente von Proteinen des Krankheitserreger, die von den befallenen Zellen auf ihrer Oberfläche als Peptide den T-Zellen präsentiert werden. Diese Peptide werden durch MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die verschiedenen Krankheitserreger können sich in zwei unterschiedlichen Teilen der Wirtszelle vermehren, im Zytosol und angrenzendem Zellkern, und in den vesikulären Kompartimenten. Aus diesem

Grund gibt es auch zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen. Proteine von Krankheitserregern, die sich im Zytosol der Zelle vermehren, werden wie zelleigene Proteine durch das Proteasom zu Peptidfragmenten abgebaut. Diese Peptidfragmente gelangen über Transportproteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und werden dort durch das MHC-Klasse I Molekül gebunden. Von dort gelangen die mit einem Peptidfragment beladenen MHC-Molekül an die Oberfläche und können durch zirkulierende T-Zellen als fremd erkannt werden.

Mehrere Klassen von Krankheitserregern gelangen und vermehren sich in intrazellulären Vesikeln (membranumschlossene Gebilde innerhalb der Zelle) von Zellen des Immunsystems wie z. B. Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen, B-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen. Die Krankheitserreger gelangen durch Phagozytose oder über Oberflächenimmunglobuline in diese Vesikel. Die Proteine dieser Erreger können deshalb nicht durch das Proteasom im Zytosol der Zelle zu Peptidfragmenten abgebaut werden. Stattdessen werden in den Vesikeln Proteasen aktiviert, die die Proteine zu Peptidfragmenten abbauen. Die im ER synthetisierten MHC-II-Moleküle gelangen in die Vesikel und können die dortigen Peptidfragmente binden. Der Komplex aus MHC-II-Molekül und Proteinfragment gelangt dann auf die Zelloberfläche und kann den T-Zellen präsentiert werden.

Um auf die infektiösen Mikroorganismen entsprechend reagieren zu können, müssen T-Zellen die Anwesenheit dieser erkennen und unterscheiden können, aus welchem Kompartiment das fremde Material stammt. Dies gelingt durch die Verwendung der zwei Klassen von MHC-Molekülen.

T-Zellen, die den Corezeptor CD8 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, nennt man cytotoxische T-Zellen. Sie erkennen über das MHC-Klasse I-Molekül den Erregerbefall der Zelle und töten diese. T-Zellen, die den Corezeptor CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren und an MHC-Klasse II-Moleküle binden, nennt man T-Helferzellen. Diese lassen sich wieder in zwei Untergruppen unterteilen. Die T-Helferzellen 1 (T_H1) aktivieren Makrophagen und veranlassen B-Zellen dazu, Antikörper auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, es kommt zur zellvermittelten Immunantwort. T-Helferzellen 2 (T_H2) veranlassen B-Zellen dazu, Antikörper zu produzieren und zu sezernieren; es kommt zur humoralen Immunantwort [Janeway 2002].

2.6.2 Der T-Zell-Rezeptor

Beim T-Zell-Rezeptor (TCR) handelt es sich um einen Multiproteinkomplex. Er besteht aus zwei variablen antigenbindenden Ketten α und β , und den invarianten akzessorischen Ketten ϵ , γ , δ , und ζ - [Alarcon 2003] (siehe Abbildung 2-5). Das Heterodimer aus der TCR α - und TCR β -Kette ist durch eine Disulfidbrücke

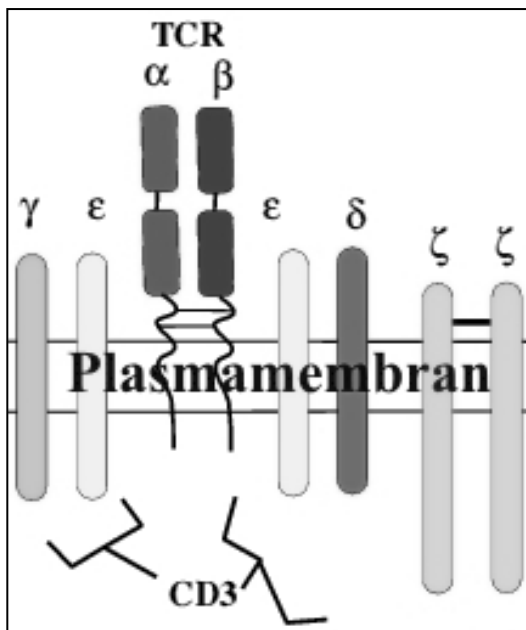


Abbildung 2-5: T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex

miteinander verbunden und der Antigenbindungsstelle eines Immunglobulins strukturell sehr ähnlich. Dieses Heterodimer ist für die Antigenerkennung verantwortlich und stellt den eigentlichen TCR dar. Das TCR-Heterodimer kann seinen Peptid-MHC-Liganden erkennen und an ihn binden, kann der Zelle allerdings nicht signalisieren, dass ein Antigen gebunden wurde. Dazu werden die invarianten Ketten ϵ , γ und δ benötigt, die als CD3-Komplex zusammengefasst werden. Zusätzlich ist der Rezeptorkomplex mit einem Homodimer von ζ -Ketten assoziiert, das nach Bindung

des Antigens Signale ins Zellinnere sendet [Alarcon 2003].

Bei der Antigenerkennung assoziieren je nach T-Zell-Typ CD4- oder CD8- Moleküle auf der T-Zelloberfläche mit dem TCR und binden an unveränderlichen Stellen auf dem MHC-Teil des Peptid-MHC-Komplexes. CD4 interagiert stark mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Lck und kann diese Tyrosinkinase mit den signalisierenden Bestandteilen des TCR nahe zusammenbringen.

2.6.3 T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion

Die Jurkat T-Zelllinie dient in der Immunologie als Modellsystem der Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Sie eignet sich auch deshalb besonders, weil sie sich in Suspensionskultur vermehren lässt. Die Jurkat Zelllinie ist eine menschliche T-Lymphom-Linie [Weiss 1984; Gillis 1980]. Ausgangspunkt für die Erforschung der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion war der Jurkat-Zellklon E6-1 von Arthur Weiss und John Stobo [Abraham 2004].

Wie bereits beschrieben, besteht der TCR aus sechs verschiedenen Polypeptidketten. Jede CD3-Kette besitzt intrazellulär sogenannte ITAM Motive (Immunorezeptor Tyrosin-basierte Motive). Diese Tyrosin-Reste werden durch eine Stimulierung des TCR von der CD4 assoziierten Lck Kinase sehr schnell phosphoryliert und leiten die intrazelluläre Signaltransduktion ein [Malissen 2003; Pitcher 2003]. Sofort nachdem alle ITAM-Tyrosine durch die Lck Kinase phosphoryliert sind wird das nächste Schlüsselprotein, ZAP-70, aus dem Zytosol rekrutiert und am TCR durch die Lck Kinase wiederum phosphoryliert und damit aktiviert [Wange 1996]. ZAP-70 aktiviert zahlreiche weitere Proteine in der Signalkaskade, unter anderem wird die Raf/Ras Signalkaskade aktiviert (siehe Abbildung 2-6).

Die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts erfolgt durch die Aktivierung von WASP über ZAP-70 nachgeschaltete Proteine. WIP wird reguliert über WASP. Eine Inaktivierung von WIP durch Cdc42 [Lee 2003] führt zur Aktivierung von Arp2/3, dem entscheidenden Komplex für die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts. Der Arp2/3 Komplex katalysiert die Bildung neuer Wachstumskeime für die Aktin-Polymerisation. Mit der Aktivierung von Arp2/3 über den TCR erhält die T-Zelle das Signal zur aktiven Umgestaltung des Zytoskeletts und kann damit ihre Form verändern.

Das zweite Ziel der Signaltransduktion durch den TCR ist, neben der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts, der Zellkern und dort die Veränderung der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, NFAT und des AP-1-Systems (c-Jun, c-Fos) [Huang 2004]. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA bewirkt unter anderem die Aktivierung des Interleukin-2-Gens (IL-2) und damit die vermehrte

Synthese von IL-2. Durch die Bildung von IL-2 wird festgelegt, ob sich eine T-Zelle vermehrt und zu einer „bewaffneten“ Effektorzelle entwickelt.

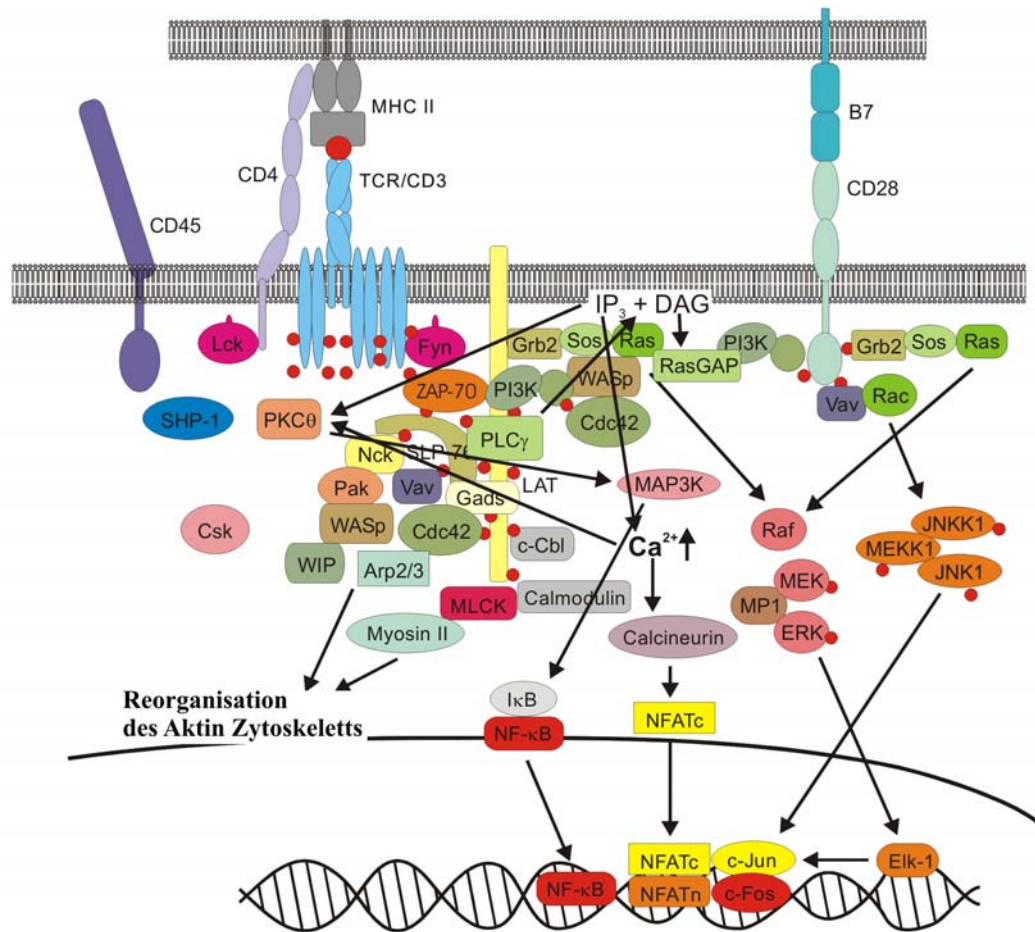


Abbildung 2-6: Schema der T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion.

Die detaillierte Erforschung der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion war möglich, da mit dem Protokoll nach Goldsmith [Goldsmith 1989] eine Methode zur Verfügung stand, mit der Jurkat-Mutanten mit Defekten in der Signaltransduktion selektiert werden konnten. Einer dieser Mutanten ist die Zelllinie JCaM 1.6 [Strauss 1992; Goldsmith 1987]. JCaM 1.6 besitzen keine funktionstüchtige Lck Kinase. Somit kann das Signal des TCR nicht mehr effektiv in die Zelle transportiert werden. Die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts ist nur noch eingeschränkt bis gar nicht mehr möglich.

2.6.4 Die Rolle von CD28

Die Bindung von TCR und den Corezeptoren CD4 oder CD8 an die MHC-Moleküle reicht noch nicht aus, um naive T-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung zu „bewaffneten“ T-Effektorzellen anzuregen. Für die antigenspezifische klonale Vermehrung naiver T-Zellen ist noch ein zweites, costimulierendes Signal erforderlich, das von derselben antigenpräsentierenden Zelle ausgesandt werden muss. Dies erfolgt über die Familie der Glykoproteine B7. Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist CD28, der ebenfalls der Immunglobulin-Superfamilie angehört. Eine Erkennung von B7 durch CD28 der T-Zelle bewirkt die Costimulation der klonalen Vermehrung naiver T-Zellen.

2.6.5 Antikörpervermittelte Zellausbreitung der Jurkat T-Zellen

Parsey und Lewis [Parsey 1993] konnten zeigen, dass Jurkat T-Zellen auf immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern Pseudopodien bilden. Dazu wurden Anti-CD3-Antikörper (OKT-3 [Van Wauwe 1980]) in Petrischalen über polyionische Wechselwirkungen immobilisiert. Sie konnten zeigen, dass die Jurkat T-Zellen innerhalb von 30 Minuten auf den immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern ihre Form verändern und beginnen, sich auf der Oberfläche auszubreiten. Ebenso konnte nach 96 Stunden eine IL-2 Produktion durch die Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden. Durch die Bindung des OKT-3 Antikörpers an den CD3-Komplex kann die Antigenerkennung durch den TCR umgangen und die Signaltransduktion der T-Zellen aktiviert werden.

2.7 MALDI-Massenspektrometrie

Unter Massenspektrometrie versteht man eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, der die Ionen nach dem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) des Ions auftrennt und einem Detektor, der die relativen Mengen der Ionen in einem Massenspektrum wiedergibt.

Die Ionisierung der Analytmoleküle erfolgt über die Aufnahme bzw. den Verlust eines Elektrons. Nach der Ionisierung werden die Ionen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes in die Gasphase überführt und in den Massenanalysator hinein beschleunigt.

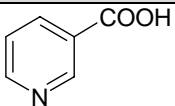
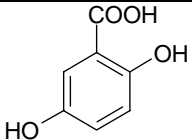
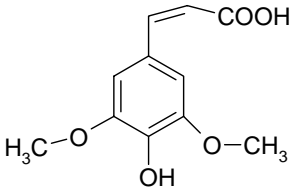
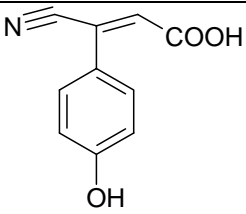
Klassische massenspektrometrische Methoden eignen sich besonders gut für die Analyse von niedermolekularen Substanzen. Sie eignen sich jedoch schlecht für die Analyse von hochmolekularen Biomolekülen, wie z.B. Proteine. Für die Ionisierung von Biomolekülen wurden neben der Elektrosprayionisation [Whitehouse 1985] verschiedene Oberflächenionisationen wie die Felddesorption [Beckey 1977], das Fast Atom Bombardment [Barber 1981], bei dem die Moleküle mit einem Strahl schneller Edelgasatome bombardiert werden, die Cf-Plasmadesorption [Macfarlane 1976] und eben die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Massenspektrometrie [Hillenkamp 1992; Karas 1989] entwickelt. Von diesen Ionisierungsmethoden ist die MALDI-Methode für Biomoleküle mit Massen von bis zu einigen hunderttausend Dalton die vielversprechendste [Hillenkamp 1991].

2.7.1 Ionisierungsprinzip

Bereits in den 70er Jahren wurde begonnen, mit Hilfe von Lasern organische Moleküle zu ionisieren und in die Gasphase zu überführen. Dazu wurden die Proben in einer dünnen Schicht auf eine Metalloberfläche aufgebracht und mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Mit den so erzeugten Massenspektren konnten allerdings nur Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Da nachgewiesen werden. Diese Methode war für die viel größeren Biomoleküle ungeeignet. Dies änderte sich erst mit Karas und Hillenkamp im Jahre 1987 [Karas 1987]. Sie untersuchten den

Wechselwirkungsprozess zwischen ultravioletter Laserstrahlung und organischen Molekülen eingebettet in sogenannte Matrixmoleküle. Ein effektiver Energietransfer des Laserlichtes kann nur durch eine resonante Absorption der Moleküle erfolgen. Die Matrixmoleküle bestehen dabei aus kleinen, stark absorbierenden Molekülen [Tanaka 1988] (siehe Tabelle 2-3), die verschiedene Aufgaben erfüllen. Die Matrix absorbiert die Energie aus dem gepulsten Laserstrahl, der mit dem π -Elektronensystem der Matrixmoleküle wechselwirkt, sie isoliert die Probenmoleküle und verhindert dadurch deren Assoziation und somit die Bildung von Molekülkomplexen, da sie bis zum 10.000fachen molaren Überschuss dazugegeben wird, und sie liefert photoangeregte Säure- und Basefunktionen für die Ionisation der Analytmoleküle [Hillenkamp 1991].

Tabelle 2-3: Typische Matrixsubstanzen für die MALDI-MS [Lottspeich 1998].

Matrix	Strukturformel	Anregungswellenlänge [nm]
Nikotinsäure		266
2,5-Dihydroxybenzoesäure		266, 337, 355
Sinapinsäure		266, 337, 355
α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure		337, 355

Die Energie des Lasers wird von der Matrix absorbiert. Die zunächst in den Matrixmolekülen gespeicherte elektronische Anregungsenergie relaxiert in extrem kurzen Zeiten in das Festkörpergitter und bewirkt dort eine starke Störung und

Ausdehnung. Es erfolgt dann weit vor Erreichen des thermischen Gleichgewichts ein Phasenübergang, der einen Teil der Festkörperoberfläche explosiv auflöst und dabei neben Matrixmolekülen auch Probenmoleküle freisetzt. Diesen Prozess überstehen die labilen Biomoleküle intakt in einem begrenzten Bereich der Bestrahlungsstärke. Die Ionisation erfolgt dann über Protonentransfer zwischen den angeregten Matrixmolekülen und den Analytmolekülen und über Kollisionen in der expandierenden Matrixwolke (siehe Abbildung 2-7) [Cotter 1997; Feneslau 197].

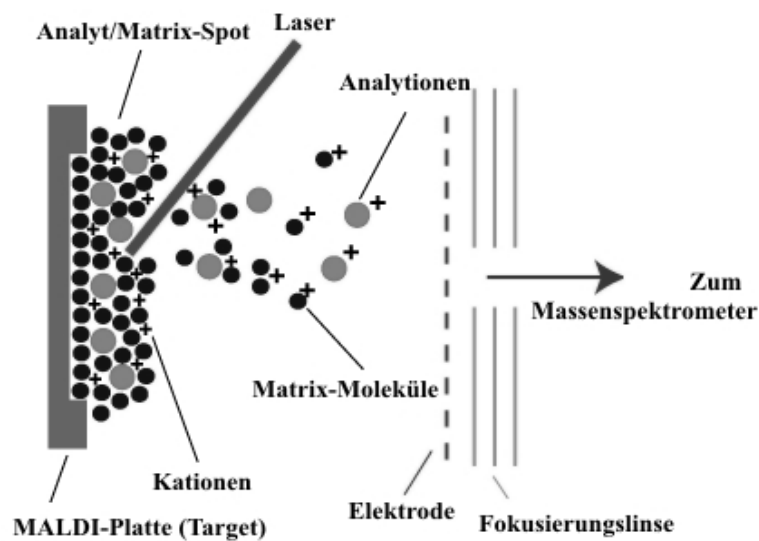


Abbildung 2-7: MALDI-Mechanismus.

2.7.1 Time-of-Flight Massenanalysator

Beim Massenanalysator für die MALDI-Methode handelt es sich um ein Time-Of-Flight-Spektrometer. Dabei werden die Ionen durch eine Beschleunigungsspannung ins Hochvakuum hinein beschleunigt und dort im feldfreien Raum nach ihrer Driftgeschwindigkeit, die vom Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) der Ionen abhängt, getrennt. Je nach ihrer Driftgeschwindigkeit kommen die einzelnen Ionen nach unterschiedlicher Zeit am Detektor an. Diese Zeiten werden genau gemessen.

Nach Beschleunigung durch die angelegte Spannung zwischen MALDI-Target, Probenträger, und Elektrode beträgt die kinetische Energie der Ionen:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

(m = Masse des Ions; v = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke; z = Ladungszahl; e = Elementarladung, U = angelegte Spannung).

Die Geschwindigkeit v ergibt sich aus der Länge der Driftstrecke L_{Drift} und der Flugzeit t bis zum Detektor:

$$v = \frac{L_{\text{Drift}}}{t} .$$

Durch Einsetzen ergibt sich:

$$\frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{L_{\text{Drift}}}{t} \right)^2 = z \cdot e \cdot U ;$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L_{\text{Drift}}^2} t^2 .$$

Das Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) des Ions ist also dem Quadrat der Flugzeit des Ions proportional. Damit lässt sich aus der gemessenen Flugzeit die Masse des entsprechenden Ions ermitteln. Die typischen Flugzeiten liegen zwischen wenigen μs bis einigen 100 μs .

Es gibt zwei Prinzipien der TOF-Massenspektrometer (siehe Abbildung 2-8). Zum einen das lineare TOF-Massenspektrometer, bei dem die Ionen eine lineare Driftstrecke bis zum Massenanalysator durchlaufen und zum anderen das Reflektor TOF-Massenspektrometer [Doroshenko 1997], bei dem die Ionen reflektiert und zum Massenanalysator geleitet werden. Dadurch erhält man eine bessere Auflösung, die Verteilungsbreite der Ionen gleicher Energie wird fokussiert. Dies führt zu einer Sensitivitätssteigerung besonders bei Ionen kleiner Masse.

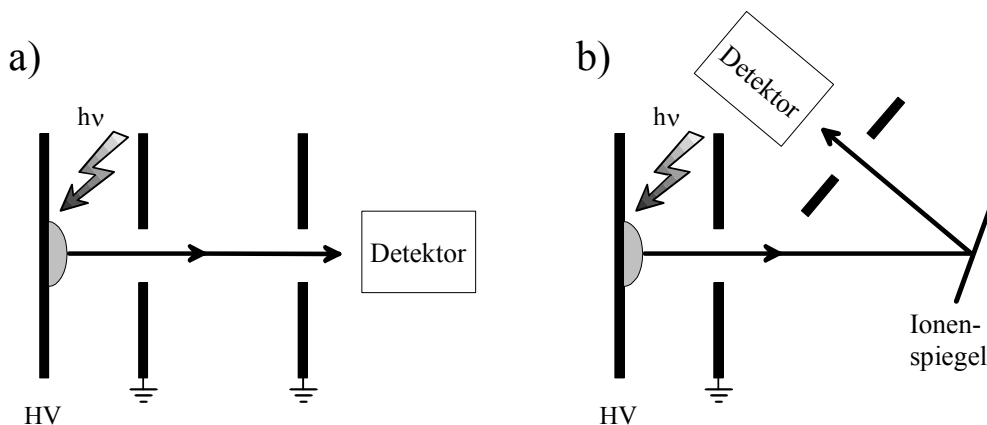


Abbildung 2-8: MALDI-TOF-Prinzip: a) Lineares TOF-Spektrometer b) Reflektor TOF-Massenspektrometer. [Mehlmann 2003]

2.8 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

2.8.1 Optische Grundlagen

Das Phänomen der Ausbreitung von Energie in Form von Wellen mit einem elektrischen und einem magnetischen Feldvektor, die senkrecht zueinander in Phase schwingen, wird mit elektromagnetischer Strahlung bezeichnet. Die Wechselwirkung dieser Strahlung mit Materie wird in der Spektroskopie zur Untersuchung von Molekülen und Festkörpern eingesetzt.

Elektromagnetische Strahlung wird charakterisiert durch die Wellenlänge λ , den Abstand zweier Wellenberge, und der Frequenz ν , die Anzahl der Schwingungen pro Zeiteinheit. Die Frequenz ν elektromagnetischer Strahlung hängt mit der Wellenlänge λ über die Ausbreitungsgeschwindigkeit c des Lichtes zusammen:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}.$$

Im Vakuum beträgt die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes: $c_0 \approx 2,997 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$,

Lichtgeschwindigkeit. Sie ist eine Naturkonstante. In allen anderen Medien breitet sich die elektromagnetische Welle langsamer aus als im Vakuum, da sie mit der Materie wechselwirkt. Die Größe, die das Verhältnis der Ausbreitungsgeschwindigkeit in Materie zu derjenigen im Vakuum beschreibt, nennt man Brechungsindex n . Er ist definiert als:

$$n = \frac{c_{\text{Vakuum}}}{c_{\text{Materie}}}.$$

Der Brechungsindex n ist deshalb immer größer als 1. Ein Medium wird optisch dichter (dünner) genannt, wenn sein Brechungsindex größer (kleiner) ist als das andere [Bergmann 1993].

2.8.2 Reflexion und Brechung

Fällt ein Lichtstrahl auf die Grenzfläche zweier unterschiedlicher Medien, so wird ein Teil der Strahlung reflektiert und verbleibt damit im ersten Medium, die übrige

Strahlung dringt in das zweite Medium ein. Der eindringende, transmittierende Lichtstrahl wird abgelenkt. Er erfährt eine Richtungsänderung. Diesen Vorgang bezeichnet man als Brechung.

Für den reflektierten Teilstrahl gilt das Reflexionsgesetz:

$$\Theta_i = \Theta_r.$$

Der Teilstrahl wird nach dem Prinzip „Einfallswinkel = Ausfallswinkel“ reflektiert.

Der gebrochene Teilstrahl verhält sich nach dem von W. Snellius 1620 gefundenem Brechungsgesetz. An der Grenzfläche zwischen zwei Medien gilt für den transmittierten Lichtstrahl:

$$\frac{\sin \Theta_i}{\sin \Theta_t} = \frac{n_t}{n_i}.$$

Mit Hilfe der Fresnelschen Gleichungen [Hecht 2002], die aus den Maxwell'schen Gleichungen abgeleitet sind, lässt sich die Intensität der Teilstrahlen für Reflexion und Transmission an Grenzflächen für linear polarisiertes, monochromatisches Licht beschreiben. Für einen senkrecht zur Einfallsebene polarisierten Strahl gilt, wenn keine Absorption auftritt:

$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{\perp,r}}{E_{\perp,i}} \right) = \frac{n_i \cos(\Theta_i) - n_t \cos(\Theta_t)}{n_i \cos(\Theta_i) + n_t \cos(\Theta_t)}.$$

Für einen parallel zur Einfallsebene polarisierten Strahl gilt:

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{\parallel,r}}{E_{\parallel,i}} \right) = \frac{n_t \cos(\Theta_i) - n_i \cos(\Theta_t)}{n_i \cos(\Theta_i) + n_t \cos(\Theta_t)}.$$

Die Reflexionskoeffizienten r geben das Verhältnis der relativen Amplitude des E-Feldes des reflektierten Teilstrahls zur Amplitude des E-Feldes des einfallenden Teilstrahls, jeweils senkrecht und parallel der Einfallsebene, wieder.

Der Reflexionsgrad ist damit:

$$R_{\perp} = r_{\perp}^2;$$

$$R_{\parallel} = r_{\parallel}^2.$$

Die Reflexion ist damit abhängig vom Einfallswinkel und den Brechungsindizes der Medien.

2.8.3 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten, Interferenz

Interferenzeffekte reflektierter Teilstrahlen treten dann auf, wenn die Schichtdicken planparalleler Schichten im Bereich der Kohärenzlänge des eingestrahnten Lichtes liegen oder kleiner sind. Aufgrund der sehr kleinen Kohärenzlänge von Weißlicht können Interferenzeffekte nur dann auftreten, wenn die Schichtdicke einige μm nicht überschreitet [Gauglitz 1996].

Wenn bei senkrechtem Lichteinfall gemessen wird, so entspricht der Gangunterschied der beiden reflektierten Teilstrahlen, im Einschichtsystem, der zweifachen Wellenlänge. Die Intensität des reflektierten Lichtstrahls bei Interferenz in einem Einschichtsystem lässt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$I_{\text{Reflexion}} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 \cdot I_2} \cos\left(\frac{4\pi(nd)}{\lambda}\right),$$

mit I_1 und I_2 = Intensität der reflektierten Teilstrahlen.

Damit ist die Intensität des reflektierten Lichtes abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes [Bergmann 1993].

Ein Extremum in der Intensität des reflektierten Lichtes tritt immer bei folgenden Bedingungen auf:

$$m_{\text{max}} = \frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda} = 1, 2, 3, \dots \quad \text{bzw.} \quad m_{\text{min}} = \frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots$$

Über die Lage zweier Extrema kann die Ordnung m über $m_i = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)}$ ermittelt

werden. Ist die Ordnung bekannt, kann mit Hilfe des Reflexionsspektrums die optische Schichtdicke berechnet werden [Krauss 1992].

Betrachtet man die Transmission und Reflexion von Mehrschichtsystemen, ist eine Untersuchung anhand der Fresnelschen Gleichungen nicht mehr zweckmäßig. Man verwendet dazu die Eigenschaft, dass die elektrischen und magnetischen Felder stetig sind. Für den Fall, dass das Licht senkrecht einfällt, lässt sich die Abhängigkeit des

Reflexionskoeffizienten r vom Transmissionskoeffizienten $t = \frac{E_t}{E_i}$ wie folgt

beschreiben:

$$\begin{bmatrix} 1 \\ n_i \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -n_i \end{bmatrix} r = M \begin{bmatrix} 1 \\ n_t \end{bmatrix} t.$$

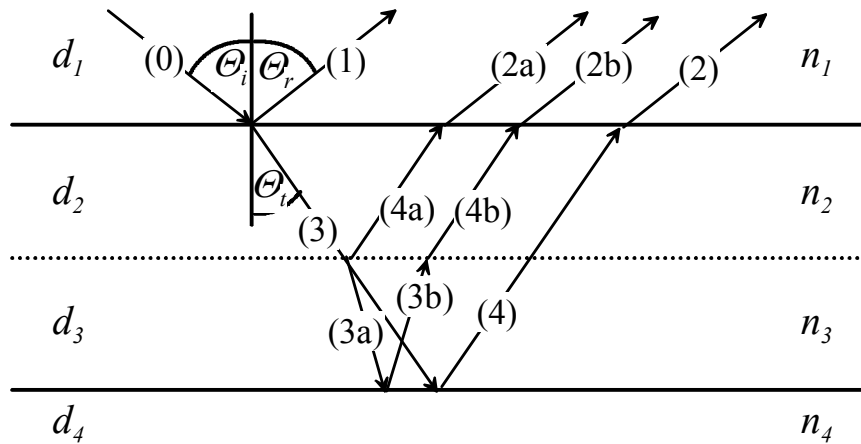


Abbildung 2-9: Mehrfachreflexion an dünnen Schichten der Schichtdicke d_j und des Brechungsindex n_j . Nach Reflexion (1) und Brechung (3) des einfallenden Lichtstrahls (0) an der ersten Phasengrenze gelten für den weiteren Verlauf der Teilstrahlen die durchgezogenen Linien für $n_2 = n_3$ (Einschichtsystem) und die gestrichelten Linien für $n_2 < n_3$ (Zweischichtsystem).

M ist dabei die sogenannte Transfermatrix:

$$M = \begin{bmatrix} \cos \frac{2\pi}{\lambda} d & -\frac{i}{n_1} \sin \frac{2\pi}{\lambda} d \\ -in_1 \sin \frac{2\pi}{\lambda} d & \cos \frac{2\pi}{\lambda} d \end{bmatrix}.$$

Angenommen, man hat N verschiedene Schichten mit N unterschiedlichen Brechungsindizes n_j und Schichtdicken d_j , besitzt das System auch N verschiedene Transfermatrizes M_j . Die Gesamttransfermatrix ist dann das Produkt der einzelnen Transfermatrizes. Daraus lässt sich der Reflektionskoeffizient r und über $R = |r|^2$ der Reflexionsgrad des Gesamtsystems errechnen [Fowles 1989].

2.8.4 Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) wird Weißlicht über eine optische Faser von der Rückseite auf einen transparenten Transducer, meist Glas mit einer eingearbeiteten hochbrechenden Schicht, eingestrahlt. Die an jeder Phasengrenze reflektierten Teilstrahlen des Multischichtsystems interferieren. Man erhält ein charakteristisches Interferenzspektrum (siehe Abbildung 2-10).

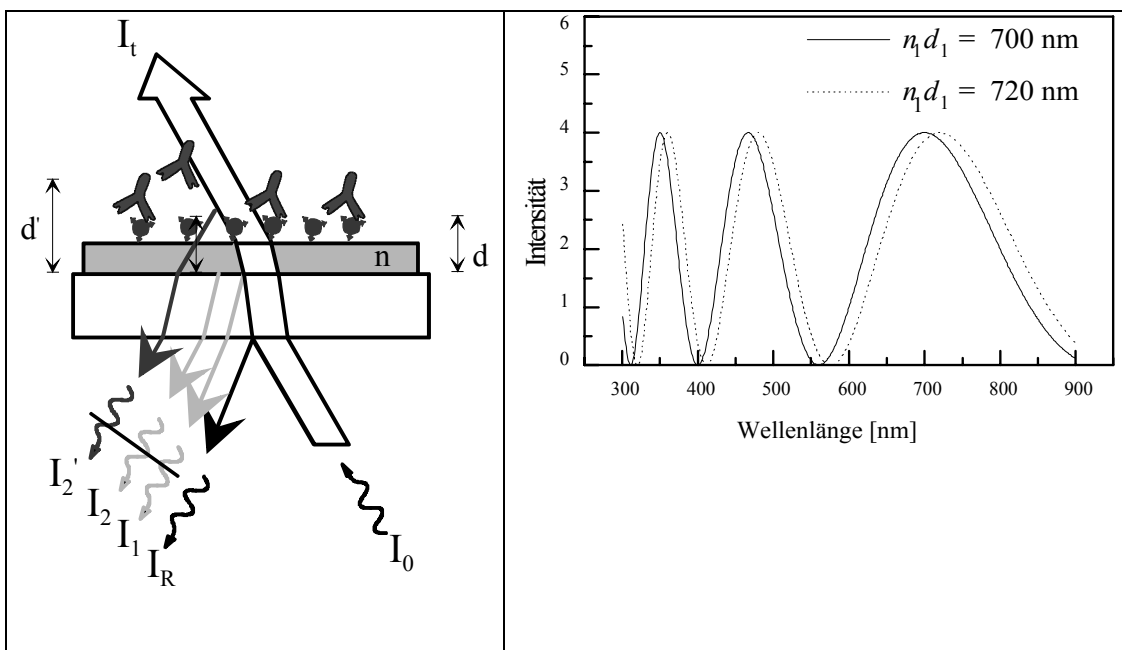


Abbildung 2-10: Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Links: Strahlengang und Reflexionen im RIfS-Transducer. Rechts: Resultierendes Interferenzspektrum bei zwei verschiedenen Schichtdicken der äußersten Schicht.

Durch Veränderungen der äußersten Schicht, z.B. durch die Bindung eines Antikörpers an eine funktionalisierte Oberfläche, physikalisch begründet in der Änderung der physikalischen Schichtdicke d und des Brechungsindex n , verschiebt sich das Interferenzspektrum zu höheren Wellenlängen. Beobachtet man ein Extremum dieses Spektrums, kann man Wechselwirkungen von Molekülen mit der Oberflächen zeitaufgelöst beobachten. Aus dieser Verschiebung können Informationen über den Bindungsvorgang gewonnen werden [Brecht 1992]. Die Verschiebung des Extremums führt zu einer Änderung der optischen Schichtdicke, dem Produkt aus der Änderung der physikalischen Schichtdicke und der mittleren Änderung des Brechungsindex.

Die RfS ist damit eine markierungsfreie, direkt optische Detektionsmethode, mit der man Wechselwirkungen mit der Oberfläche zeitaufgelöst beobachten kann, die auf der Mehrfachreflexion an dünnen Schichten beruht [Gauglitz 1991]. Die RfS dient deshalb zur Beobachtung von Wechselwirkungen an Sensoroberflächen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien, Lösungen und Zellkulturen

(3-Glycidyloxypropyl)trimethylsiloxan, GOPTS, purum	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Aceton, getrocknet, max. 0,01 % Wasser	Merck KDaA, Darmstadt, Deutschland
Aminodextran, Antex™, MW 170kD	Helix Research Co., Springfield, USA
Diisocarbodiimid (DIC)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Aldrich, Milwaukee, USA
Glycerin, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ , puriss	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 99%	Sigma-Aldich, Steinheim, Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF), absolut	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid, NaCl, puriss	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
N-Hydroxysuccinimid (NHS), purum	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
N-Succinimidyl 6-maleimidocapronsäure, EMCS, HPLC	Aldich, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure, 96%	Chemisches Zentralinstitut, Universität Tübingen
Tri(hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)	US Biochemical, Cleveland, USA
Wasserstoffperoxid, 30%, purum	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldich, Steinheim, Deutschland

3.1.2 Proteine

Tryptischer Verdau von Rinderserumalbumin (BSA)	Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
Hühnereialbumin (OVA)	Sigma, St. Louis, USA

3.1.3 Nukleinsäure Oligomere

Alle Nukleinsäuren wurden von der Firma IBA GmbH, Göttingen, Deutschland, erworben.

Nukleinsäureart	Name	Sequenz
DNA	POIA 3 antisense	ATG TAG GTT GTA GCG
DNA	POIA 3	(C6NH ₂)CGC TAC AAC CTA CAT
LNA	POIA 3	(C6NH ₂)CGC TAC AAC CTA CAT
DNA und LNA	DNA/L3NA POIA 3	(C6NH ₂)CGC <u>T</u> AC AAC C <u>T</u> A C <u>A</u> T
(unterstrichene Nukleinsäuren sind LNA)		

3.1.4 Peptide

B-Box Peptid	C-Aca-RNEYMRSGLYSTFTIQSLQ-NH ₂	EMC Microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Epitop γ -Gliadin	H-C-Aca-LPFPEQPQQPFPQPQQ-OH	Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Jung, Universität Tübingen

3.1.5 Antikörper

Name	Gerichtet gegen:	Bezogen von:
Anti-IgA	IgA Antikörper des Menschen	Abcam, Cambridge, GB
Anti-IgG	IgG Antikörper der Maus, biotinyliert	Upstate, Lake Placid, USA
OKT 3, Anti-CD 3	CD 3	G. Jung, Institut für Zellbiologie, Tübingen, Deutschland
Anti-CD 28, Klon 9.3	CD 28	G. Jung, Institut für Zellbiologie, Tübingen, Deutschland

3.1.6 Blutseren

Die Blutseren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. E. A. Lundin aus dem Rikshospital in Oslo, Norwegen, zur Verfügung gestellt.

Auf Zöliakie positiv getestete Blutseren:	Kontrollblutseren:
GII 150554	TG 070752
EF 110554	DOG 031072
KOL 100865	ACBJ 160375
HL 190629	EJ 021287
KMM 160251	

3.1.7 Lösungen und Puffer

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline) 150 mM NaCl und 10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Tris/HCL-Puffer für Blutmessungen	100 mM TRIS/HCl, 0,9% NaCl, 0,1 % EDTA, pH 7,4
Gel-Shift-Puffer modifiziert für SRF	10 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM DTT
Piranha-Lösung	60 %, Volumen, konzentrierte Schwefelsäure und 40 %,Volumen, 30 % iges Wasserstoffperoxid
Regenerationslösung	HCL-Lösung, pH 1,5

3.1.8 Zellmedium

RPMI 1640 Medium	mit L-Glutamin und 2,0 g/L NaHCO ₃	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
------------------	-----------------------------------------------	------------------------------------------

3.1.9 Zellkultur

Humane T Zell Leukämie Zelllinie Jurkat [Gillis 1980; Weiss 1984] und die Lck-Kinase defiziente Zelline JCaM 1.6 [Strauss 1992] wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Expression der Oberflächenantigene CD3 und CD28 wurde im Flußzytometer überprüft. Dazu wurden die Zellen mit Anti-CD3 bzw. Anti-CD28 Antikörper inkubiert und über einen sekundären Anti-Maus Antikörper, der mit dem Farbstoff Alexa 488 markiert war, detektiert. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

3.1.10 Transducer

Interferenzglas:

D263 Glas, beschichtet mit 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂, Schott, Mainz. Zugeschnitten auf eine Größe von 1,2 x 1,2 cm².

Ito-Glas:

Soda Lime Glas, Dicke: 0,7 mm, beschichtet mit 200 nm Indium-Zinn-Oxid, Flächenwiderstand unter 10 Ω / mm², Merck KGaA, Darmstadt. Zugeschnitten auf eine Größe von 1,2 x 1,2 cm².

3.2 Geräte

3.2.1 RfS-Messapparatur

Geräte:

- Spektrometer:
 - Spekol 110, Analytik Jena, Jena, modifiziert nach Schmitt et al. 1997 mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von microParts GmbH, Dortmund, und 5 V / 10 W Halogenlampe mit integriertem Reflektor, Oshino Lamps, Nürnberg.
 - Diodenzeilenspektrometer MCS 410 der Firma Zeiss, Jena. Y-Quarzlichtleiter HCP, Durchmesser 600 µm; als Lichtquelle wurde eine 6 V / 20 W Halogenlichtlampe verwendet.
- Fluß-Injektions-Analyse-(FIA)-Anlage: ASIA, Ismatec GmbH, Weilheim. Fixpumpe mit 50 Umdrehungen pro Minute und Variopumpe mit maximal 50 Umdrehungen pro Minute. Es wurden Schläuche mit Innendurchmesser von 0,25 mm (Variopumpe) und 0,95 mm (Fixpumpe) verwendet.
- Spritzenpumpen: Hamilton Dilutor Microlab 541C und Ventilsteuerung MVP mit 8-Wege-Ventil von Hamilton, Darmstadt.
- Flusszellen: Anfertigung aus Plexiglas mit einem 0,05 mm tiefen Flusskanal und Bohrungen für den Ein- und Auslass.

Aufbau:

Ein schematischer Aufbau einer RfS-Anlage ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Licht der Halogenlampe wird über Faseroptik senkrecht von unten auf den Transducer geführt. Das reflektierte Licht wird in der gleichen Faser gesammelt und in einem Diodenzeilenspektrometer detektiert.

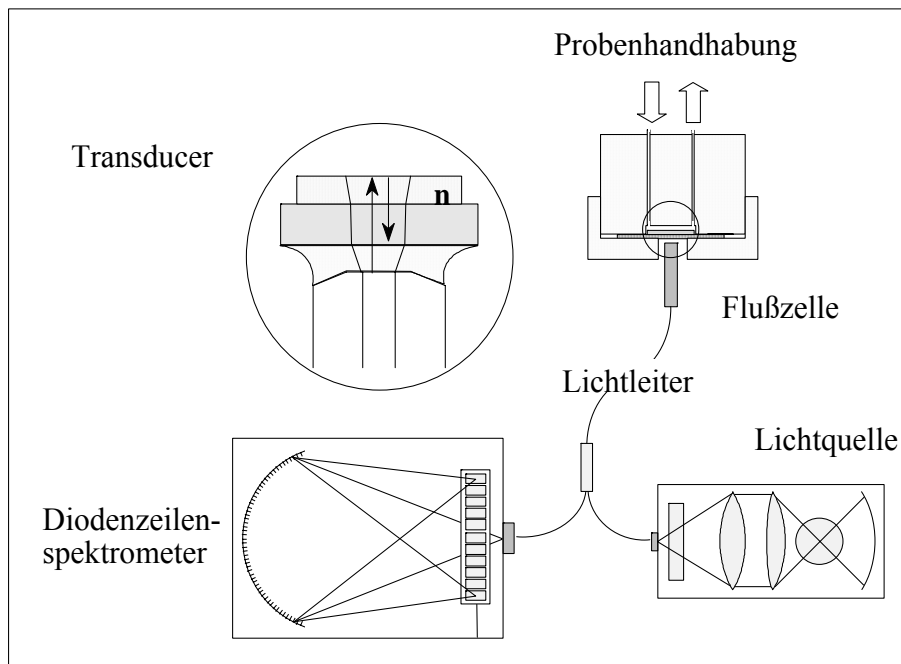


Abbildung 3-1: Schematischer RfS-Aufbau.

Messung:

Die Spektrene Erfassung und die Steuerung der Fluidikanlagen sowie der Spektrometer erfolgten über das Programm „MEASURE“ von G. Kraus. „MEASURE“ liefert alle 5 Sekunden einen Messpunkt.

Auswertung:

Aus den Reflexionsspektren $I_{Referenz}(\lambda)$ wurden durch Korrektur mit dem Nullsignal $I_{Null}(\lambda)$ und dem Referenzsignal $I_{Referenz}(\lambda)$ die Interferenzspektren $I(\lambda)$ ermittelt:

$$I(\lambda) = \frac{I_{Reflexion}(\lambda) - I_{Null}(\lambda)}{I_{Referenz}(\lambda) - I_{Null}(\lambda)}$$

Das Programm „IFZ“ von A. Brecht und G. Kraus wertet die korrigierten Spektren aus. Dieses Programm passt eine Parabel an ein ausgewähltes Extremum an und misst die Verschiebung der Parabel. Die Verschiebung der Parabel wird in die Änderung der optischen Schichtdicke umgerechnet. Damit kann die Veränderung der optischen Schichtdicke zeitaufgelöst verfolgt werden.

Messprogramm:

Als erstes wurde durch Spülen mit Puffer eine Basislinie aufgenommen. Anschließend wird in der Assoziationsphase die Probe injiziert und über den Transducer gepumpt. Danach wird in der Dissoziationsphase Puffer über den Transducer gepumpt. Daran anschließend wird Regenerationslösung injiziert und damit die Oberfläche gereinigt. Je nach Bedarf wurde der Regenerationsschritt mehrmals wiederholt. Schließlich wurde nochmals eine Basislinie aufgenommen. Die einzelnen Schritte wurden hinsichtlich ihrer Dauer und der jeweiligen Fließgeschwindigkeit je nach Versuchsziel variiert.

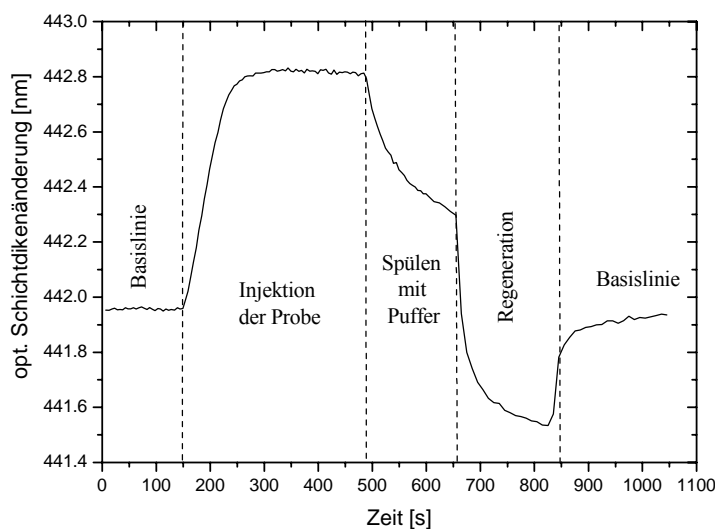


Abbildung 3-2: Programmablauf einer RfS-Messung.

3.2.2 Kontaktwinkelmessung

Kontaktwinkel bilden sich im Dreiphasensystem fest / flüssig / gasförmig aus und sind Ausdruck für die Benetzbarkeit des Festkörpers durch die aufliegende Flüssigkeit (siehe Abbildung 3-3).

Die Methode zur Bestimmung des Kontaktwinkels beruht auf der geometrischen Vermessung der Form des auf der Festkörperoberfläche aufliegenden Flüssigkeitstropfens.

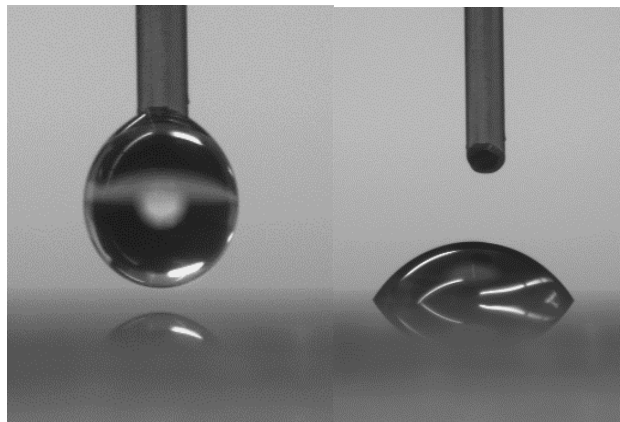


Abbildung 3-3: Bild eines hängenden und eines auf der Festkörperoberfläche aufliegenden Flüssigkeitstropfen.

Durch die Messung des Kontaktwinkels lässt sich die Änderung der freien Oberflächenenergie eines Festkörpers bestimmen, somit kann die Oberfläche des Festkörpers charakterisiert werden. Der Kontaktwinkel Θ ist der von den Oberflächenspannungsvektoren σ_{lg} und σ_{sl} eingeschlossene Winkel (siehe Abbildung 3-4).

Aus dem Kräfteparallelogramm ergibt sich die Young-Gleichung:

$$\sigma_{sg} - \sigma_{sl} = \sigma_{lg} \cos \Theta .$$

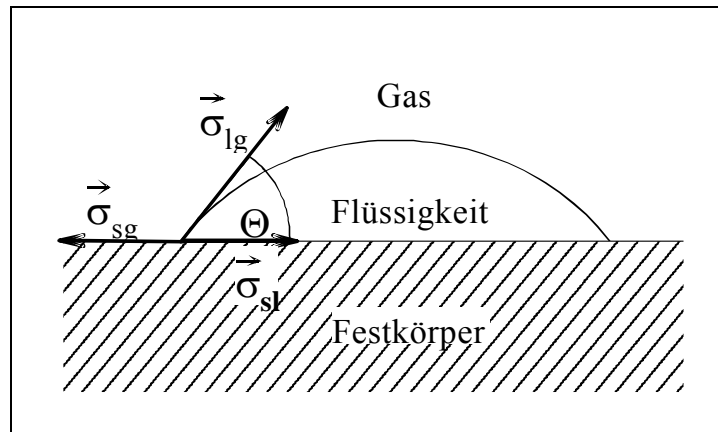


Abbildung 3-4: Dreiphasenkontakt eines auf der Festkörperoberfläche aufliegenden Flüssigkeitstropfen.

Da die Grenz- und Oberflächenspannungen σ_{sg} und σ_{sl} einzeln nicht messbar sind, wird stattdessen ihre Differenz, die Benetzungsspannung, angegeben:

$$\sigma_b = \sigma_{lg} \cos \Theta .$$

Mit der Bestimmung des Kontaktwinkels kann die Oberfläche hinsichtlich Ihrer hydrophilen Eigenschaften bei der Benetzung mit Wasser charakterisiert werden.

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit dem Kontaktwinkelmessgerät CAM 200 der Firma KSV Instruments, Helsinki, Finnland, durchgeführt.

3.2.3 AFM, Atomkraftmikroskopie

Für die AFM-Abbildungen wurde ein Multimode™ SPM-Gerät der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, USA, verwendet.

Die AFM-Bilder wurden über optische Detektion mit Lichtzeiger im Tapping Mode aufgenommen.

3.2.4 MALDI-Massenspektrometer

Die MALDI-TOF-Messungen wurden mit einem Bruker Reflex III-Gerät, Bruker Daltonics, Billerica, USA, durchgeführt. Die Messungen des Standard-BSA-Verdaus wurden im Reflection Mode durchgeführt.

3.2.6 Weitere Geräte

- Flußzytometer BD FACSCalibur, Becton Dickson, Heidelberg, Deutschland.
- Konfokales Laser-Scanning Mikroskop mit einer Plan-Neofluar 40 x 0,75 NA Linse und C-Apochromat 63 x 1,3 NA Immersionsöl, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland.
- Plasmaverascher 100-E Plasma System, TePla TechnicsPlasma GmbH, Kirchheim bei München, Deutschland.
- Waage, Sartorius micro, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

3.3 Methoden

3.3.1 Oberflächenmodifikationen

Für alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Komponenten kovalent an die Transduceroberfläche immobilisiert. Die beschriebenen Methoden beziehen sich im Wesentlichen auf die Modifizierung von SiO₂-Oberflächen. Alle Abweichungen von diesem Protokoll werden im Kapitel Ergebnisse ausführlich beschrieben.

Reinigung und Aktivierung von Glas Transducer

Die Transducer wurden vor ihrer Verwendung mit einem fusselfreien Papiertuch vorgereinigt. Anschließend wurden sie ca. 1 Minute lang in 6 N NaOH-Lösung eingelegt und danach mit bidestilliertem Wasser ab gespült. Die Aktivierung der SiOH-Gruppen fand in einer frisch hergestellten Piranha-Lösung statt. Die Transducer wurden 30 Minuten lang in der Piranha-Lösung im Ultraschallbad belassen. Danach wurden die Transducer mit bidestilliertem Wasser ab gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Nach dieser Behandlung musste die Oberfläche eine vollständige Benetzung mit Wasser zeigen, ansonsten wurde die Prozedur wiederholt.

Die Transducer wurden nach der Aktivierung sofort weiterverarbeitet.

Silanisierung

Zur Silanisierung der Oberfläche wurde (3-Glycidyloxypropyl)trimethylsiloxan, GOPTS, verwendet. Die Transducer wurden paarweise verarbeitet. Auf einen gereinigten und getrockneten Transducer wurden 15 μL GOPTS gegeben und mit dem zweiten Transducer bedeckt. Das Paar wurde eine Stunde lang in einer trockenen, verschlossenen Reaktionskammer belassen. Danach wurden die Transducer mit wasserfreiem Aceton abgespült und unverzüglich unter Stickstoff getrocknet.

Durch die Silanisierung werden reaktive Epoxygruppen auf der Oberfläche erzeugt. Um eine Deaktivierung zu vermeiden, mussten die Transducer sofort weiterverarbeitet werden.

Umsetzung der Epoxygruppen mit Aminodextran

Das auf die Oberfläche immobilisierte Aminodextran schirmt die Glasoberfläche gegenüber dem Puffersystem ab und verhindert die unspezifische Bindung von Molekülen und Proteinen. Ein weiterer Vorteil des AMD ist die Oberflächenvergrößerung durch seine dreidimensionale Struktur.

Für die Kopplung des Aminodextrans an die silanisierte Transduceroberfläche wurde eine hoch konzentrierte wässrige Lösung verwendet. Die Konzentration wurde dabei so gewählt, dass man die viskose Lösung noch pipettiert konnte. Dies war bei einer Verdünnung von 1:8, Masse/Volumen, in bidestilliertem Wasser der Fall.

Die Transducer wurden wiederum paarweise verarbeitet. Auf einen Transducer wurden 10 μL der Aminodextran-Lösung gegeben und mit dem Zweiten bedeckt. Das Paar wurde über Nacht in einer mit Wasser gefüllten Reaktionskammer inkubiert, um eine Austrocknung der AMD-Lösung und damit ein Verkleben der Transducer zu vermeiden. Danach wurden sie gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Die so erzeugten Transducer waren über mehrere Monate im Kühlschrank lager- und haltbar.

An die erhaltenen Aminogruppen auf der Oberfläche der Transducer konnten nun Liganden immobilisiert werden.

Umsetzung von Aminogruppen zu Carboxylgruppen

Um Liganden mit Aminogruppen an die Oberfläche zu immobilisieren, war es notwendig, die Aminogruppen des AMD zu Carboxylgruppen umzufunktionalisieren. Dazu wurde auf einen Transducer 10 μ L einer 1M Lösung von Glutarsäurealdehyd in DMF gegeben und mit dem Zweiten bedeckt. Das Paar wurde mindestens sechs Stunden lang in einer mit DMF-Dampf gesättigten Reaktionskammer inkubiert. Danach wurden die Transducer mit DMF gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Aktivierung der Carboxylgruppen zur Kopplung von Liganden mit Aminogruppen

Die Carboxylgruppen wurden mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktiviert. Der so erzeugte Aktivester stellt die reaktive Gruppe zur Kopplung mit den Aminogruppen der Liganden dar.

Von der 1 molaren NHS- und 1,5 molaren DCC-Lösung in DMF wurden 10 μ L auf einen Transducer pipettiert und mit einem Zweiten bedeckt. Die Transducer wurden mindestens vier Stunden in einer mit DMF-Dampf gesättigten Reaktionskammer inkubiert. Die Transducer wurden einzeln mit wasserfreiem DMF gespült und mussten unverzüglich weiterverarbeitet werden, um eine Deaktivierung des Aktivesters zu vermeiden. Konnte nur ein Transducer unmittelbar weiterverarbeitet werden, wurde der Zweite in der Reaktionskammer belassen und erst bei Bedarf gespült und weiterverwendet.

3.3.2 Immobilisierung von Liganden

Kopplung von Atrazincapronsäure (ACA)

Als funktionelle Kopplungsgruppe des Atrazinderivats diente eine Carboxylgruppe. Aus diesem Grund konnte die Kopplung direkt an die AMD-Transducer erfolgen.

1 mg Atrazincapronsäure wurden in 10 μL wasserfreiem DMF gelöst und 1,5 μL Diisocarbodiimid dazugegeben. Die Lösung wurde kräftig gevortext, auf einen AMD-Transducer gegeben und mit einem Zweiten bedeckt. Die Transducer wurden mindestens sechs Stunden lang mit der ACA-Lösung in einer mit DMF-Dampf gesättigten Reaktionskammer inkubiert, danach mit DMF und bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Kopplung von Peptiden

Alle verwendeten Peptide wurden, um eine selektive Anbindung an die Oberfläche zu gewährleisten, an ihrem N-terminalen Ende mit einem Cystein- C_6 -Spacer versehen. Diese Modifikation ermöglichte über eine Michael Addition die selektive Reaktion der freien Thiolgruppe des Cysteins mit der Aminogruppe des AMD (siehe Abbildung 3-5). Da die verwendeten Peptidsequenzen kein Cystein aufwiesen, wurde die Aktivität der Peptide nicht beeinträchtigt.

Zur Kopplung der Peptide wurde die AMD-Oberfläche mit 1,5 molarer N-Succinimidyl 6-maleimidocapronsäure (EMCS) Lösung in wasserfreiem DMF aktiviert. Dazu wurden 10 μL der EMCS-Lösung auf einen Transducer gegeben und mit einem Zweiten bedeckt. Die Transducer wurden mindestens zwölf Stunden mit der Lösung in einer mit DMF-Dampf gesättigten Reaktionskammer inkubiert. Danach wurden die Transducer mit wasserfreiem DMF gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. 1 mg des N-Cysteinyl-Peptids wurde in 10 μL wasserfreiem DMF gelöst und unmittelbar nach dem Spülen der Transducer auf diese gegeben und mindestens zwölf Stunden lang in einer mit DMF-Dampf gesättigten Reaktionskammer belassen. Danach wurden die Transducer mit wasserfreiem DMF und bidestilliertem Wasser gespült und unter dem Stickstoffstrom getrocknet.

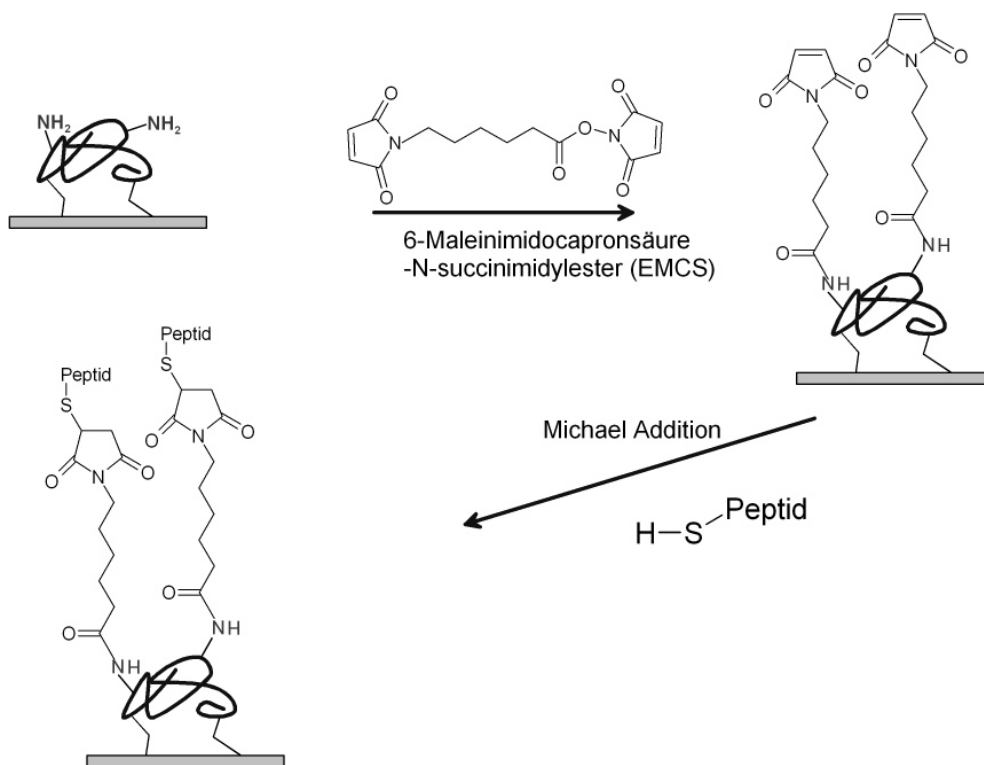


Abbildung 3-5: Selektive Ankopplung von Cystein modifizierten Peptiden über eine Michael Addition.

Kopplung von Nukleinsäuren

Zum Zwecke der Immobilisierung von Nukleinsäuren wurden diese an ihrem 3'-terminalen Ende mit einem $\text{}_2\text{HN-C}_6$ -Spacer versehen. Die Aminogruppe der Nukleinsäure ist somit in der Lage mit dem zu Carboxylgruppen umgesetzten AMD zu reagieren.

Die wässrige Nukleinsäure-Lösung wurde über ein Mikrodosiersystem, Microdrop, auf die Transducer mit aktivierten Carboxylgruppen getropft. Dabei wurden die Tropfen so nebeneinander getropft, dass sich das in Abbildung 3-6 gezeigte Muster ergab. Es wurde in zwei Schichten übereinander getropft, um eine homogene Beladung zu erzielen. Während des Tropfens wurde der Transducer auf 40°C beheizt, um eine schnelle Verdampfung des Lösungsmittels zu gewährleisten. Damit wurde eine örtliche Konzentrierung bewirkt und ein Ineinanderfließen der Tropfen verhindert. Der Spot hatte einen Durchmesser von ca. 2 mm. Nach dem Tropfen wurde der Spot markiert und mit bidestilliertem Wasser gespült.

Mit dem Tropfen der Nukleinsäure erhält man homogene Oberflächen mit hoher Beladung [Stemmler 1999].

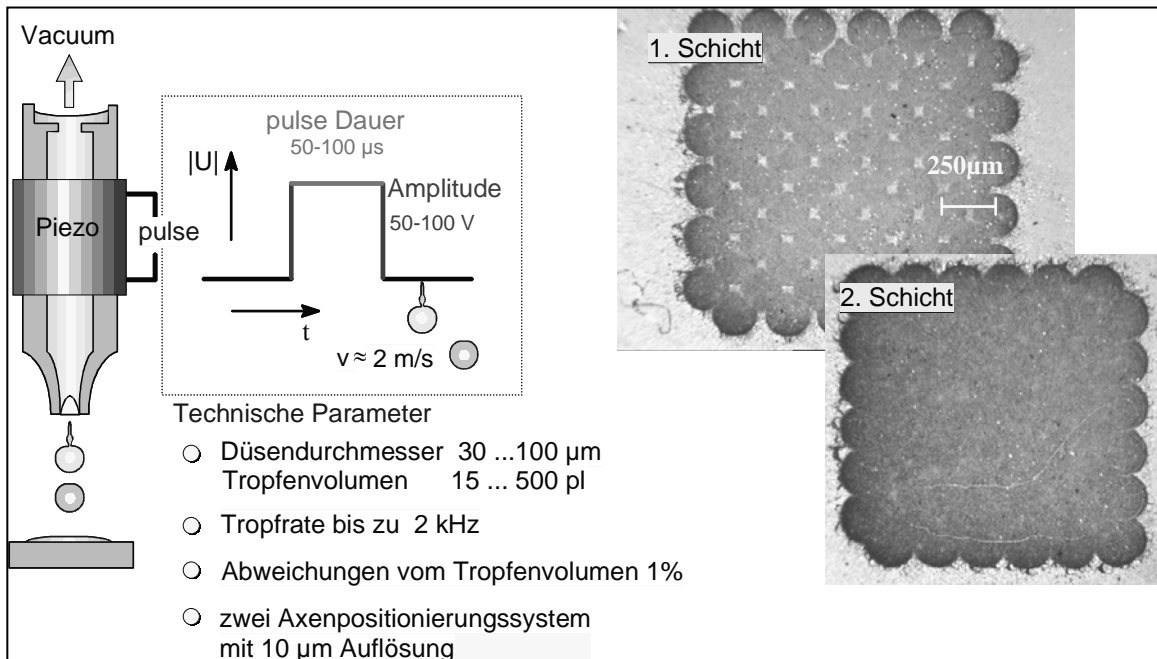


Abbildung 3-6: Kopplung von Nukleinsäuren auf aktivierte AMD-Transducer. Links: Schematische Darstellung des Mikrosystems, Rechts: Oberfläche nach dem ersten und nach dem zweiten Tropfvorgang [Jung 2001].

Immobilisierung von Antikörpern

Die Antikörper wurden auf eine vergleichsweise einfache Art und Weise auf die Transduceroberfläche immobilisiert.

Dazu wurden die Antikörper in einer Konzentration von 20 μ g / mL auf die silanisierten Oberflächen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Oberflächen äußerst vorsichtig mit bidestilliertem Wasser gespült und ebenso vorsichtig unter N₂ getrocknet. Die Transducer mussten dann sofort in die Flusszelle eingebaut und mit Puffer oder Medium umspült werden.

Diese Art der Immobilisierung ermöglicht keine gerichtete Ankopplung der Antikörper an die Oberfläche. Dennoch sind noch genügend aktive Bindungsstellen vorhanden [Kusnezow 2003].

4. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Arbeit präsentiert und diskutiert. Dieses Kapitel ist in vier Abschnitte unterteilt.

Die ersten beiden Abschnitte beschäftigen sich mit grundlegenden biomolekularen Erkennungsreaktionen. Im ersten Abschnitt werden die thermodynamischen Charakteristika bei der Hybridisierung von neu entwickelten Nukleinsäure-Monomeren, LNA, betrachtet. Mit der Erkennung von Antikörpern direkt in der komplexen Matrix Blut auf peptidfunktionalisierten Oberflächen beschäftigt sich der erste Teil des zweiten Abschnitts. Im zweiten Teil wird die Affinität eines Transkriptionsfaktors, SRF, an die Erkennungsregion eines anderen Proteines bestimmt.

Im dritten Abschnitt geht es um die technische Weiterentwicklung einer Kopplung zwischen den beiden Methoden RfS und der MALDI-Massenspektrometrie. Dazu wurde eine Oberflächenchemie auf elektrisch leitenden ITO-Oberflächen entwickelt, um die Sensitivität der Massenspektrometrie auf RfS kompatiblen Oberflächen zu verbessern.

Der vierte Abschnitt beschäftigt sich mit der direkten Detektion der Adhäsionseigenschaften lebender Zellen in einem Flusssystem. Grundlage dafür ist ein komplexer Signaltransduktionsmechanismus innerhalb der Zellen, ausgelöst durch ein extrazelluläres Signal.

Die zum Verständnis dieser Arbeiten notwendige Basis und die technischen Ausführungen sind in den beiden vorherigen Kapiteln 2. Theoretischer Hintergrund und 3. Material und Methoden beschrieben.

4.1 Bestimmung der Affinitätskonstanten von DNA, LNA und eines DNA-LNA-Mixmers

Der Einsatz von Oligonukleotiden zu diagnostischen und zu Forschungszwecken wächst stetig. Entwicklungen von Nukleinsäurederivaten mit veränderten Eigenschaften haben daher große Auswirkungen, wie z.B. für den Einsatz auf DNA-Chips. Fokussiert wird dabei auf eine Verbesserung der Affinität zu den komplementären Nukleinsäuresträngen und eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen. Beispiele für neu entwickelte Nukleinsäurederivate sind Hexitol Nukleinsäuren (HNA) [Hendrix 1997], Peptid Nukleinsäuren (PNA) [Larson 1999] und Locked Nukleinsäuren (LNA) [Koshkin 1998]. LNA ist von den genannten das vielversprechendste Analogon, da die Monomere ebenso wie DNA-Monomere gehandhabt werden können, beispielsweise beim Einsatz im DNA-Synthesiser. Ein Doppelstrang aus LNA und DNA besitzt eine höhere thermische Stabilität und eine höhere Resistenz gegenüber Nukleasen [Vester 2004]. Deshalb wurden die Affinitäten von LNA mit denen von DNA und einem Mixmer aus DNA- und LNA-Monomeren verglichen.

Dazu wurden die Affinitätskonstanten von DNA, eines DNA-LNA Mixmer, im folgenden L-DNA genannt, und der LNA über einen Bindungshemmtest [Piehler 1997] bestimmt.

Bei diesem Testformat wurden an die Oberfläche des Transducers über die in Kapitel 3.3.2 beschriebene Methode die Nukleinsäuren in sehr hoher Dichte immobilisiert. Eine konstante Konzentration an komplementärer DNA wurde in homogener Phase mit verschiedenen Konzentrationen der drei Nukleinsäuren inkubiert. Zwischen der freien komplementären DNA, den freien Nukleinsäuren und dem hybridisierten Doppelstrang stellte sich ein Gleichgewicht ein. Ein Teil der komplementären DNA hybridisierte mit den drei Nukleinsäuren, und stand somit zur Hybridisierung an der Oberfläche nicht mehr zur Verfügung. In den folgenden Schritten wurde die Probenlösung über die Transduceroberfläche geleitet. Die Probe wurde hierbei so schnell transportiert, dass das Gleichgewicht in der homogenen Phase nicht gestört wurde.

Wenn die komplementäre DNA eine ausreichend hohe Affinität zur entsprechenden Nukleinsäure besitzt, und die Anzahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche des Transducers sehr viel höher als die eingesetzte Konzentration an komplementärer DNA ist, werden sämtliche freien komplementären DNA Stränge, die die Oberfläche erreichen, hybridisiert. Unter diesen Bedingungen ist das RIfS-Signal nur von der Diffusion der Moleküle zur Sensoroberfläche, gemäß dem 1. Fickschen Gesetz, abhängig:

$$J_D = -D \cdot \frac{dc}{dx} = -D \cdot \frac{c}{\delta}$$

(J_D = Diffusionsfluss; D = Diffusionskonstante; c = Konzentration in Lösung; δ = Dicke der Diffusionsschicht; abhängig von der Flussgeschwindigkeit und der Geometrie der Flusszelle). Im allgemeinen führt dies zu einer massentransportlimitierten, d. h. diffusionskontrollierten Bindung an die Oberfläche. Deshalb ist die Steigung des RIfS-Signals proportional zur Konzentration der nicht hybridisierten komplementären DNA.

Die Konzentration der komplementären DNA wurde so eingestellt, dass die Steigung des Signals 1 pm / s betrug. Diese Konzentration an komplementärer DNA wurde mit den zu untersuchenden Nukleinsäuren in einem Konzentrationsbereich von $2,25 \cdot 10^{-10}$ M bis $9 \cdot 10^{-6}$ M titriert. Bei einer Konzentration vom $9 \cdot 10^{-6}$ M wurde die gesamte komplementäre DNA hybridisiert und die Steigung des Signals betrug dementsprechend 0. In Abbildung 4-1 ist die Titration für fünf exemplarische Konzentrationen dargestellt.

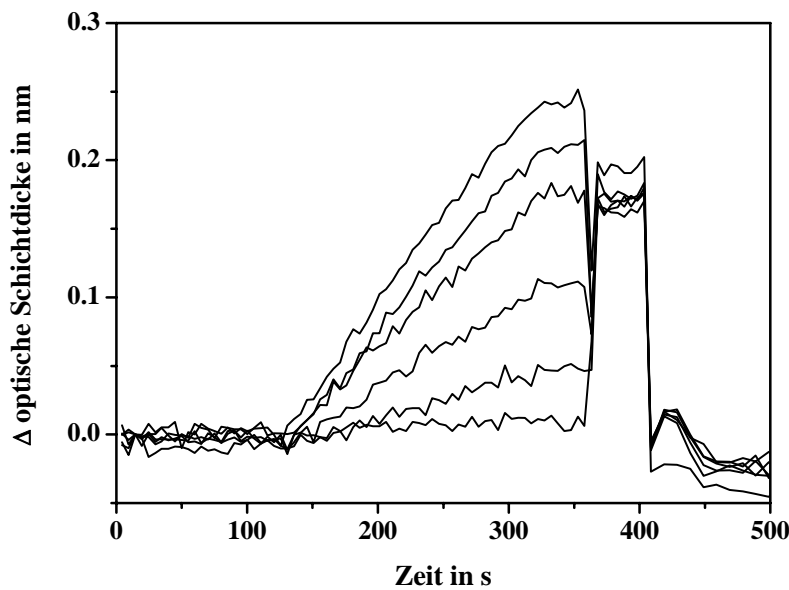


Abbildung 4-1: Messkurven der Titration einer Nukleinsäure gegen die komplementäre DNA, exemplarisch für 5 Konzentrationen der Nukleinsäure und der komplementäre DNA-Strang alleine (Gerade mit der größten Steigung).

Aus diesen Messkurven ließen sich die Steigungen als ein Maß für die Konzentration der freien komplementären DNA bestimmen.

Die Affinitätskonstanten für die jeweilige Nukleinsäure ergeben sich aus den gewonnenen Daten.

Grundlage für die Berechnung der Affinitätskonstanten liefert folgende Gleichung:

$$K_{Aff} = \frac{c_{DS}}{c_{SS} \cdot c_{ASnI}} = \frac{c_{DS}}{(c_{SS,0} - c_{DS}) \cdot (c_{ASnI,0})}$$

(c_{DS} = Konzentration der hybridisierten DNA, c_{SS} und $c_{SS,0}$ = Konzentration der komplementären Einzelstrang-DNA nach und vor der Inkubation, c_{ASnI} und $c_{ASnI,0}$ = Konzentration des Nukleinsäure-Einzelstrangs nach und vor der Inkubation).

Demnach ist die Konzentration der hybridisierten Doppelstrang DNA:

$$c_{DS} = \frac{c_{SS,0} + c_{ASnI,0} + K_{Aff}^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{SS,0} + c_{ASnI,0} + K_{Aff}^{-1})^2}{4} - c_{SS,0} \cdot c_{ASnI,0}}$$

Die Konzentration der freien Einzelstrang DNA:

$$c_{SS} = c_{SS,0} - c_{DS} = c_{SS,0} - \frac{c_{SS,0} + c_{ASnl,0} + K_{Aff}^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{SS,0} + c_{ASnl,0} + K_{Aff}^{-1})^2}{4} - c_{SS,0} \cdot c_{ASnl,0}}$$

Die Beziehung zur relativen Konzentration der freien komplementären DNA $c_{relativ}$:

$$c_{relativ} = 1 - \frac{c_{DS}}{c_{SS,0}}$$

Zur Herleitung der Beziehungen vergleiche M. Kumpf [Kumpf 2005]

Damit ist die relative Konzentration an freier komplementärer DNA eine Funktion der Anfangskonzentration der komplementären DNA, der Konzentration der Nukleinsäuren und der Affinitätskonstanten, die mittels des Levenberg-Marquart Algorithmus berechnet werden kann [Moore 1997]. Die gemessenen relativen Konzentrationen und die mittels MATHEMATICA[®] angepassten Fitfunktionen sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

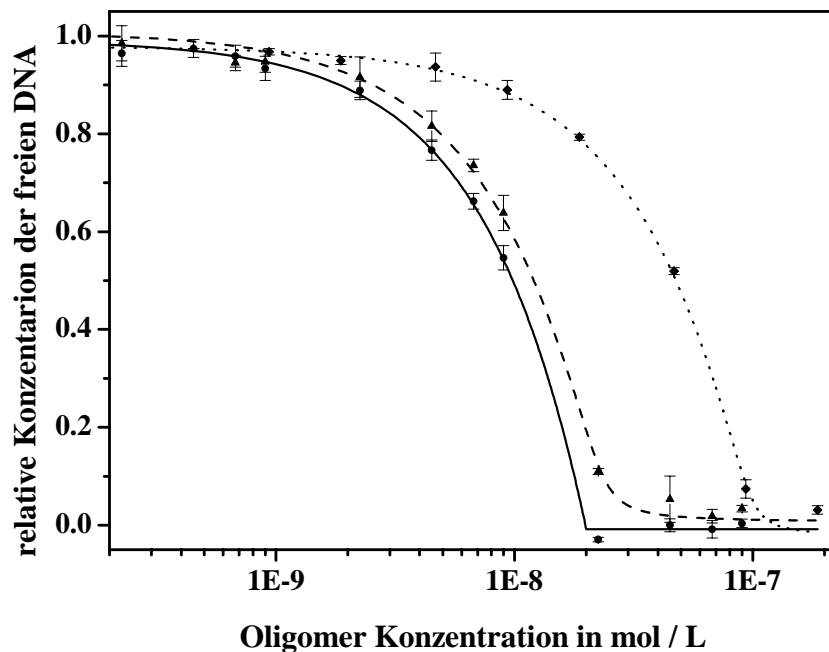


Abbildung 4-2: Titration einer komplementärer DNA zu \blacklozenge DNA, \blacktriangle L-DNA, und \bullet LNA und die durch das Programm MATHEMATICA[®] gefitteten Kurven; DNA, gepunktet; L-DNA gestrichelt. Für die LNA, durchgezogene Line, ist eine Anpassung mit der Affinitätskonstanten von 10^{12} L / mol gezeigt.

Die errechneten Affinitätskonstanten aus der Kurvenanpassung und die zugehörigen berechneten Schmelztemperaturen über ein Schmelzpunktvorhersageprogramm auf www.exiqon.com sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Affinitätskonstanten der Nukleinsäuren und berechnete Schmelzpunkte, für 160 nM Salzkonzentration und 0,1 μ M Oligomerkonzentration entsprechend des Schmelzpunktvorhersageprogramms auf www.exiqon.com [SantaLucia 1998].

Nukleinsäure	Affinitätskonstante in L / mol	Berechnete T_m [°C]
DNA	$1.5 \pm 0.7 \cdot 10^9$	48
L-DNA	$4.0 \pm 1.5 \cdot 10^9$	54
LNA	$> 10^{12}$	83

Die Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung des komplementären DNA-Stranges mit der DNA und des DNA-LNA-Mixmers, in der jede Thyminbase durch ein LNA-Nukleotid ersetzt wurde, konnte über die Fitfunktion angenähert werden. Unter den gleichen Assaybedingungen, die während der Bestimmung der Affinitätskonstanten für die DNA und die L-DNA herrschten, konnte die Affinitätskonstante für das Oligomer, das vollständig aus LNA-Bausteinen aufgebaut war, nicht exakt bestimmt werden. Den Grund dafür veranschaulicht Abbildung 4-3, in der die simulierten Affinitäten in einem Bereich von $1 \cdot 10^9$ bis $1 \cdot 10^{13}$ L / mol dargestellt sind.

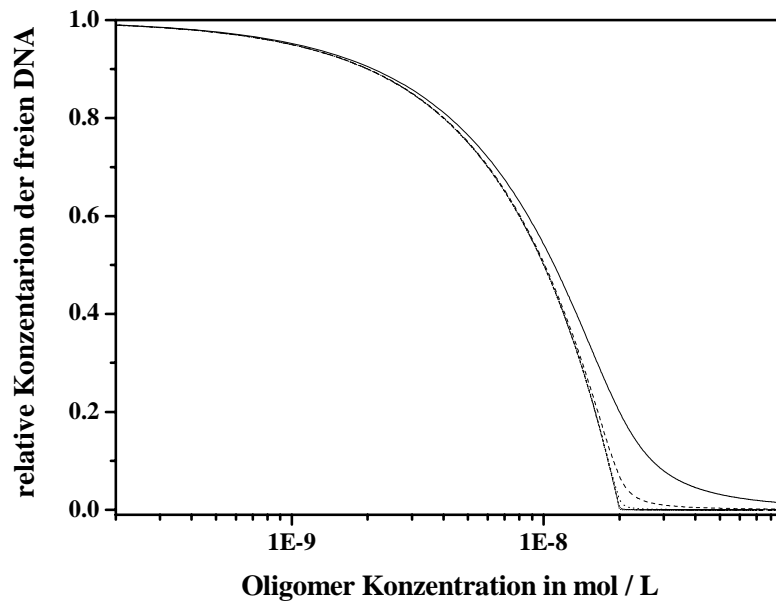


Abbildung 4-3: Fünf simulierte Titrationskurven mit Affinitätskonstanten von 10^9 L / mol, —, 10^{10} L / mol, - - , 10^{11} L / mol, ·····, 10^{12} L / mol, — · und 10^{13} L / mol, - · · ·.

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass es sehr schwierig war, die Affinitätskonstante anzunähern, da die Unterschiede zwischen den verschiedenen Affinitäten sehr klein wurden. Nebenbei wird deutlich, dass es beinahe unmöglich wird, Affinitäten größer als 10^{12} L / mol ohne Änderungen der Assaybedingungen zu bestimmen.

Beim Vergleich der gemessenen Werte für die Titration der L-DNA mit denen der LNA in Abbildung 4-2, muss die Affinitätskonstante der Duplexbildung zwischen der LNA mit der komplementären DNA über 10^{12} L / mol sein. Dies ist ein enorm hoher Wert für die Duplexbildung eines relativ kleinen Oligonukleotids mit 15 Basen und deckt sich mit der Vorhersage des sehr hohen Schmelzpunktes, siehe Tabelle 4-1.

4.1.2 Diskussion

Wie erwartet [Christensen 2001; McTigue 2004] nahm die Affinität der DNA/Oligomer-Duplexbildung mit dem Anteil an LNA-Nukleotiden zu. Der Anstieg

der berechneten Schmelztemperatur von $\Delta T_m = 6 \text{ }^\circ\text{C}$ [SantaLucia 1998] von der DNA zur L-LNA, in der jede Thyminbase durch ein LNA-Nukleotid ersetzt wurde, stimmt gut mit der relativ kleinen Zunahme der Affinitätskonstanten um den Faktor 3 überein. Der enorme Anstieg des Schmelzpunktes um $\Delta T_m = 39 \text{ }^\circ\text{C}$ von der DNA- zur LNA-Duplexbildung mit ihrer komplementären DNA, welcher fast einer Verdopplung des Schmelzpunktes gleich kam, stimmte ebenso gut mit der mehr als 100 mal so großen Affinitätskonstanten überein.

Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst kleine LNA Oligomere wegen ihrer hohen Affinitäten und der daraus resultierenden hohen Schmelztemperaturen für die Anwendung in der SNP-Analyse und für PCR-Applikationen ungeeignet sind. Einmal hybridisierte LNA könnte nicht mehr von der komplementären DNA abgeschmolzen werden, was aber Voraussetzung für diese Techniken ist. Trotzdem ist es sinnvoll, einzelne Nukleotide in der Oligomersequenz durch LNA-Bausteine zu ersetzen, um Mixmere wegen ihrer erhöhten Affinität und ihrer Stabilität gegenüber Nukleasen einzusetzen. Für die Anwendung von LNA für PCR-Applikationen und DNA-Chips sind deshalb Mixmere die beste Wahl.

LNA Oligomere hingegen eignen sich für den Einsatz in der Sensortechnik als Oberflächenmodifikation für die Detektion von Basenfehlstellen [Pröll 2005].

Zusammenfassung

Die Bestimmung von Affinitätskonstanten der Oligomer-Duplexbildung ist wichtig für das Verständnis der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Die Entwicklung der LNA-Nukleotide erlaubt es, Oligomere mit hoher Affinität und Resistenz gegen Nukleaseabbau für spezielle Anforderungen anzupassen.

Mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie steht eine geeignete Methode zur Verfügung, markierungsfrei und zeitaufgelöst Schmelztemperaturen [Pröll 2005] und Affinitätskonstanten der Duplexbildung von verschiedenen Oligomeren zu bestimmen.

4.2 Untersuchungen auf peptidfunktionalisierten Oberflächen

4.2.1 RIFs zur Detektion von Antikörpern in Patientenblutseren

Eine eindeutige Diagnosestellung für Zöliakie-Patienten kann nur über die komplikationsträchtige Biopsie des Dünndarms erreicht werden. Um die Diagnosestellung bei Zöliakiepatienten zu erleichtern, sind kostengünstige und zuverlässige Tests erforderlich, die die Autoimmunantikörper möglichst im leicht verfügbaren Blutserum der Patienten detektieren. Bei ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern im Blutserum wird das Enzym Transglutaminase als Ganzes auf der Oberfläche immobilisiert [Hill 2004]. Die Transglutaminase muss allerdings kostenintensiv exprimiert, isoliert, aufgereinigt und quantifiziert werden. Eine kostengünstige Variante wäre, die Autoimmunantikörper über synthetische Peptide im Blut nachzuweisen.

Im Folgenden wird gezeigt, wie über ein spezielles Peptid die Autoimmunantikörper in der für Biosensoren komplexen Matrix Blut mittels RIFs nachgewiesen werden können.

Zur Detektion humaner Zöliakie-Antikörper in Patientenblutserum wurde auf ein Peptid, das gegen Antikörper von Zöliakie-Patienten Spezifität aufweist, zurückgegriffen [Mülbe 2001].

Mülbe identifizierte ein Epitop aus dem γ -Gliadin (Aminosäuren 85-100) mit der Sequenz LPFPQQPQQPFPQQQ und einer Molmasse von 1903.9 Da als Substrat für die handelsübliche Meerschweinchen-Gewebs-Transglutaminase (gp-tTGase).

Es konnte eine gezielte enzymaktivierte Deamidierung durch gp-tTGase des Glutamins zu Glutamat an Position 5 im Peptid LPFPQQPQQPFPQQQ zum Peptid LPFPEQPQQPFPQQQ ermittelt werden.

Molberg et al. konnten in ihrer Arbeit das neue Phänomen beschreiben, dass ein Enzym die Primärstruktur eines Peptides verändert und so wichtige T-Zell-Epitope generiert werden, die in der Pathogenese der Zöliakieerkrankung eine Rolle spielen [Molberg 1998]. Dieser Befund wurde in neueren Arbeiten mehrfach erhärtet [Arentz-Hansen 2002; Fleckenstein 2002]

Das oben genannte Peptid wurde mit einem Cystein-Linker mit der Sequenz H-C-Aca-LPFPEQPQQPFQPQQ-OH synthetisiert. Über die in 3.3.2 beschriebene Methode wurde das Peptid an die Oberfläche selektiv über den Cystein-Schwefel an die Sensoroberfläche immobilisiert. Es wurde aufgrund der beträchtlichen unspezifischen Bindung von Blutserum auf der Transduceroberfläche [Kröger 2003] ein Sandwich-Assay ähnlich einem ELISA mit 2 Waschschritten gewählt, um störende unspezifisch gebundene Blutbestandteile von der Oberfläche zu entfernen. Da das Immunsystem in der Mehrzahl IgA Antikörper gegen die Transglutaminase bildet, konnte mit dem Anti-IgA-Antikörper die spezifische Bindung der körpereigenen Transglutaminase-Antikörper an das immobilisierte Peptid verifiziert werden.

Testformat:

1. 1:10 Verdünnung Blutserum in Tris/HCl-Puffer pH 7,0 [Kröger 2003]
2. Waschschrift 1: 1ml deionisiertes Wasser
3. Waschschrift 2: 1ml 1mol/l NaCl-Lösung in Tris/HCl-Puffer pH 7,0
4. Anti-IgA-Antikörper 5µg/ml.

In Abbildung 4-4 sind exemplarisch die Messkurven der Blutseren KMM, eines Patienten, der durch Biopsie positiv auf Zöliakie getestet wurde, und DOG, eines Patienten, der durch Biopsie negativ auf Zöliakie getestet wurde, gezeigt.

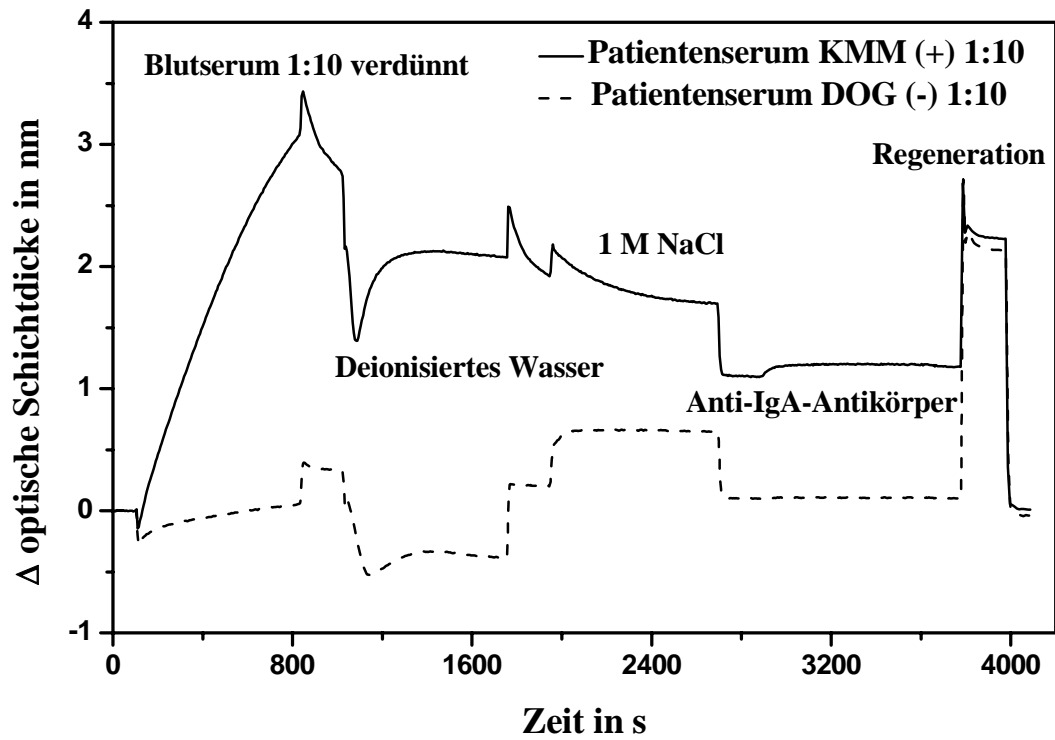


Abbildung 4-4: Messung der Patientenblutseren im Sandwich-Format.

Alle Blutseren wurden hintereinander auf einem Sensorschip gemessen. Die Transduceroberfläche konnte ohne Probleme regeneriert werden, wie aus Abbildung 4-4 ersichtlich ist.

Zur Auswertung wurde die Bindung des Anti-IgA-Antikörpers herangezogen, siehe Abbildung 4-5.

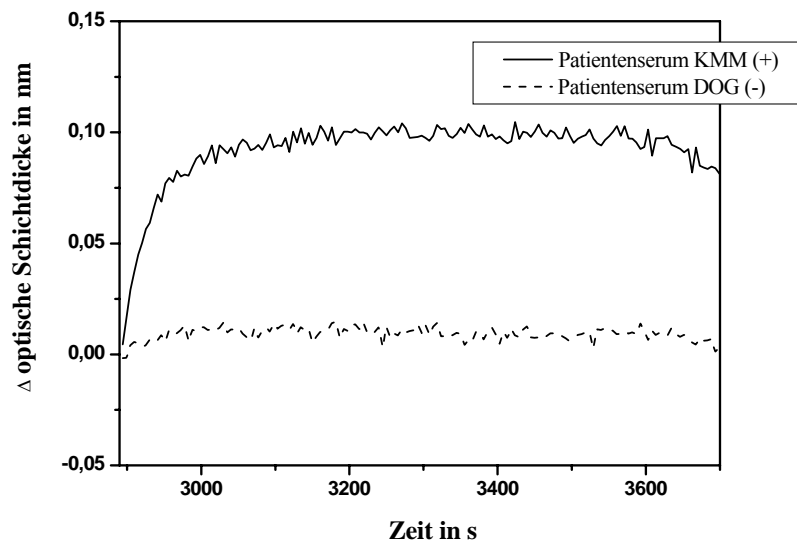


Abbildung 4-5: Vergrößerung der Bindung des sekundären Anti-IgA-Antikörpers an den humanen Transglutaminase-IgA-Antikörper.

Die Auswertung der sieben vorhandenen Patientenblutseren ist in Abbildung 4-6 gezeigt.

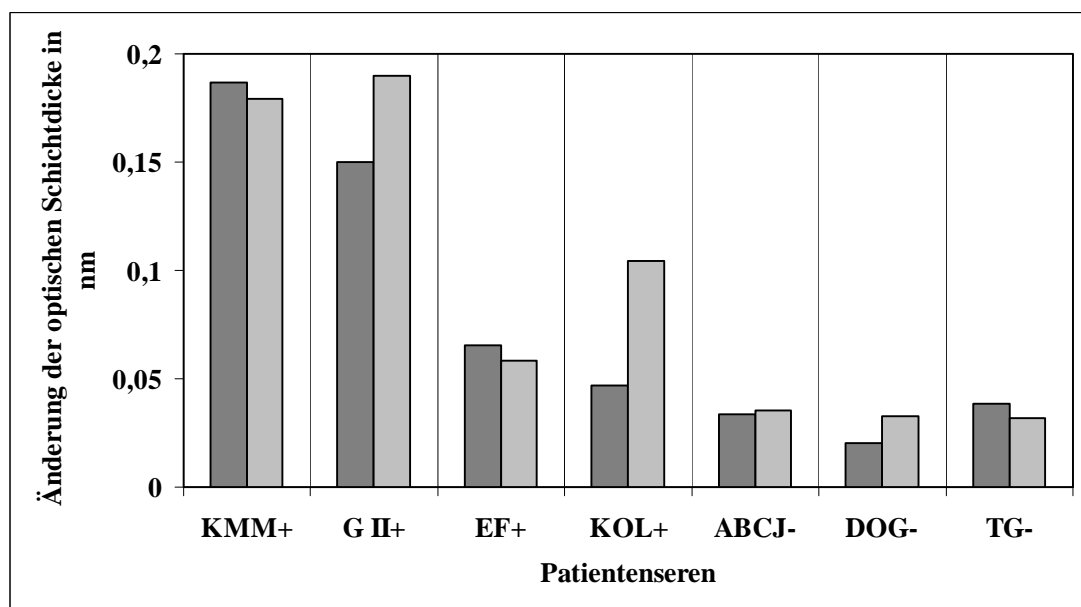


Abbildung 4-6: Änderung der optischen Schichtdicke bei Bindung der Anti-IgA-Antikörper an den Autoimmunantikörper aus dem Blutserum. (-) durch Biopsie Zöliakie negativ; (+) durch Biopsie Zöliakie positiv diagnostiziert. Messungen jeweils auf zwei verschiedenen Transducern.

Die Messergebnisse wurden auf zwei verschiedenen gleich präparierten Transducern erzielt.

Bei den Patienten wurde in der Klinik in Oslo über eine Biopsie die Zöliakie diagnostiziert. Es konnten lediglich Zweifachmessungen mit dem RIfS Biosensor durchgeführt werden, aufgrund der Knappheit der Patientenseren, da es sich in der Mehrzahl der Patienten um Kinder handelte.

Die Blutserumproben KMM und GII konnten in beiden Messungen über den RIfS Biosensor eindeutig als positiv detektiert werden. Die positiven Patientenblutseren EF und KOL dagegen nicht. Beide Proben befinden sich im gleichen Bereich wie die Negativkontrollen DOG, ABCJ und TG.

Es wurden jedoch keine falsch positiven Ergebnisse erzielt. Alle negativen Blutseren zeigen nur eine geringe Änderung der optischen Schichtdicke. Die Blutproben konnten dabei hintereinander gemessen werden, da sich die Oberfläche regenerieren ließ. Das Ergebnis war zudem reproduzierbar über die Messung auf zwei verschiedenen Transducern.

Da das Immunsystem Antikörper gegen verschiedene Epitope der Transglutaminase bildet, ist es nicht weiter verwunderlich, dass nur zwei der vier positiven Blutserumproben als positiv identifiziert werden konnten. Mit der Umstellung auf ein Array-Format [Kröger 2002] mit mehreren Peptiden, die Epitope der Autoimmunantikörper gegen die Transglutaminase darstellen, könnte man die Diagnosestellung erleichtern und die Kosten gegenüber herkömmlichen ELISA-Tests, die das teure aufgereinigte Enzym verwenden, senken.

Zusammenfassung

Mit RIFs kann man direkt aus dem Blutserum Antikörper der Autoimmunerkrankung Zöliakie detektieren. Die Sensoroberfläche ist regenerierbar und die Messergebnisse im Rahmen der Möglichkeiten reproduzierbar.

Die RIFs Technologie könnte sich deshalb besonders im Arrayformat als kostengünstige und robuste Alternative in der klinischen Medizin eignen.

Selbst wenn der neue Testansatz mit RIFs nur einen Teil der Patienten richtig diagnostiziert, stellt das für diese Patienten eine wesentliche Erleichterung gegenüber der Biopsie dar.

4.2.2 Untersuchung der Wechselwirkungen des Serum Response Faktors, SRF, als Beispiel für eine Protein-Protein-Wechselwirkung

Als Beispiel für die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit RIFs wurde das SRF-Modellsystem benutzt. Der Serum-Response-Faktor, SRF, ist ein Transkriptionsfaktor und bindet zur Signalübertragung aus dem Zytosol an ein spezifisches Erkennungselement auf der DNA, um das Ablesen bestimmter Zielgene zu ermöglichen. Zur Signalübertragung dimerisieren zwei identische SRF Proteine und lagern sich an das Serum Response Element, SRE, auf der DNA an. Damit die Transkription der Gene erfolgen kann, benötigt der SRF ein weiteres Kontrollprotein. Dieses Protein, unter anderem ETS oder SAP-1, ist aus der Familie der Ternary Complex Faktoren, TCF. Auch dieses Protein bindet an die DNA. TCF bindet nur dann stabil an die DNA, wenn es über einen Proteindomäne, genannt B-Box, an SRF bindet und damit erkennt, dass dieser auf der DNA sitzt. Wenn die B-Box an den SRF bindet, ergibt sich ein stabiler Komplex aus SRF, TCF und DNA. Letztendlich ermöglicht erst dieser stabile Komplex, dass die Zielgene abgelesen werden können. In Abbildung 4-7 ist der Komplex aus SRF, dem TCF und der DNA dargestellt [Hassler 2001]. Sehr gut kann man die Anlagerung der B-Box an den SRF_B erkennen.



Abbildung 4-7: Struktur des SAP-1-SRF-DNA-Komplexes [Hassler 2001]

Zur Untersuchung der Wechselwirkung der B-Box, als Teil des Proteins TCF, und dem SRF, wurde die B-Box synthetisiert und nach der in 3.3.2 beschriebenen Methode auf eine mit AMD modifizierte Transduceroberfläche kovalent angebunden. Die immobilisierte B-Box bestand aus einer Sequenz von 20 Aminosäuren [Ling 1997]. Da die Aufreinigung des Serum-Response Faktors sehr aufwendig und mühsam war, musste mit so wenig Protein wie möglich gearbeitet werden. Deshalb wurden drei verschiedene Konzentrationen ($0,75\mu\text{M}$, $0,37\mu\text{M}$ und $0,15\mu\text{M}$) des SRF in modifizierten Gel-Shift-Puffer über die Transduceroberfläche gepumpt. Es war wegen der geringen Probenmenge nur eine Doppelbestimmung möglich.

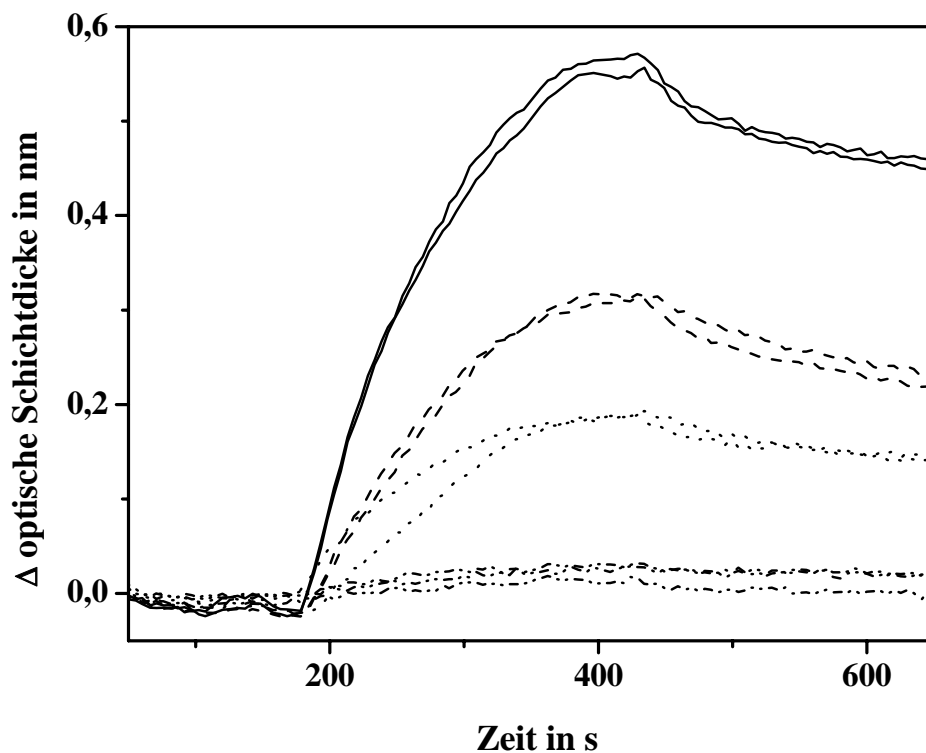


Abbildung 4-8: SRF in den Konzentrationen von $0,75\mu\text{M}$, $0,37\mu\text{M}$ und $0,15\mu\text{M}$, in der Grafik absteigend, auf einer mit dem B-Box-Peptid funktionalisierten Oberfläche.

Der SRF bindet in Abhängigkeit der Konzentration unterschiedlich stark an die mit dem B-Box-Peptid funktionalisierte Oberfläche (siehe Abbildung 4-8).

Da im Durchfluss die Konzentration c_{SRF} im Volumen konstant bleibt, kann man die Graphen an eine Kinetik pseudo-erster Ordnung anpassen:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{\text{Gleichgewicht}} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t}),$$

und so die Gleichgewichtsbeladung ermitteln.

Die Affinitätskonstante der Wechselwirkung zwischen dem SRF und dem B-Box-Peptid, kann über eine nicht-lineare Anpassung über die Gleichgewichtsbeladung berechnet werden:

$$\Gamma_{\text{Gleichgewicht}} = \Gamma_{\text{Max}} \frac{K_{\text{Aff}} \cdot c}{1 + K_{\text{Aff}} \cdot c}.$$

In Abbildung 4-7 ist die Langmuir-Isotherme für die SRF Wechselwirkung mit dem B-Box-Peptid dargestellt.

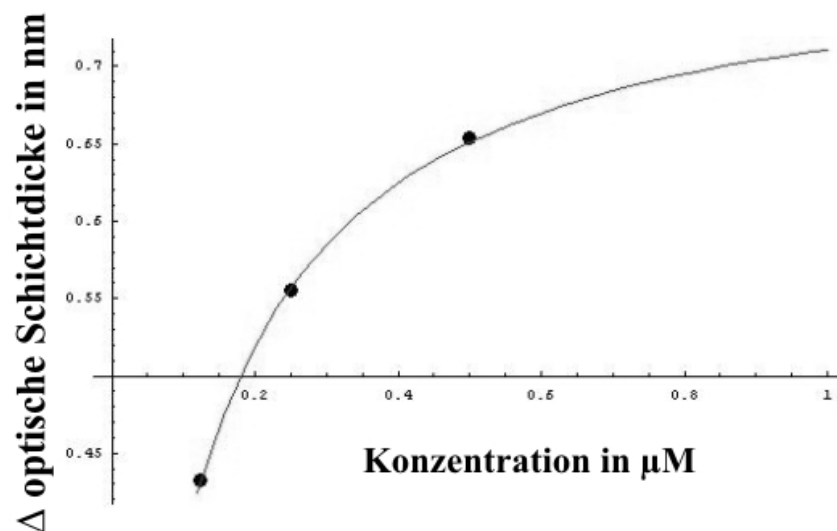


Abbildung 4-7: Langmuir-Isotherme für die Bestimmung der Affinitätskonstanten des SRF an das B-Box-Peptid.

Aus der nicht-linearen Anpassung errechnet sich für die Affinitätskonstante:

$$K_{\text{Aff}} = 1,28 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}.$$

Die Affinitäten für Wechselwirkungen zwischen Proteinen liegen in einem Bereich zwischen $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [Ingham 2004] und $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ [Edelstein 1988], die stärksten

Wechselwirkungen können Affinitätskonstanten bis zu $1 \cdot 10^{16} M^{-1}$ erreichen [Kühlmann 1999].

Die Wechselwirkung zwischen dem B-Box-Peptid und dem SRF gehört sicher zu den niedrigaffinen. Die Sequenz der immobilisierten B-Box beträgt immerhin nur 20 Aminosäuren. Die Affinität liegt aber in dem für Protein-Protein-Interaktionen üblichen Bereich.

Zusammenfassung

Mit RIfS war es möglich, die niedrig affine Wechselwirkung zwischen dem Serum Response Faktor (SRF) und dem B-Box-Peptid zu charakterisieren. Die Sequenz der B-Box bestand lediglich aus 20 Aminosäuren.

Mit RIfS können also Wechselwirkungsprozesse charakterisiert werden, die zum Verständnis von komplexen Signaltransduktionsprozesse beitragen, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden.

4.3 Oberflächenchemie auf ITO-Transducern zur Kopplung von RfS mit der MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie spielt eine große Rolle in der Biochemie zur Analyse des Proteoms. Sowohl Proteine als strukturelle Einheit, als auch der gezielte Verdau von Proteinen durch Proteasen können so identifiziert und mögliche posttranslationale Modifikationen untersucht werden [Lane 2005]. Was die Massenspektrometrie nicht leisten kann, ist Informationen über Wechselwirkungen von Proteinen untereinander zu liefern. Dies ermöglicht aber die Biomolekulare Interaktionsanalyse durch RfS. So ist die Kopplung dieser zwei Methoden ein erstrebenswertes Ziel, da sie sich ergänzen und ohne Markierung arbeiten.

Die Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation (MALDI) Massenspektrometrie nutzt eine Spannung zwischen der Messplatte, auf der die Probe aufgetragen wird, und einer Elektrode dazu, die durch den Laser ionisierten Moleküle aus der Matrix, in die diese Moleküle eingebettet sind, heraus zu beschleunigen und dem Detektor zuzuführen. Dabei werden die Proben direkt auf das Edelstahl aufgetragen, so dass die Beschleunigungsspannung direkt unter der Probe anliegt.

Mehlman et al. konnten [Mehlmann 2003; Mehlmann 2005] zeigen, dass die Kopplung von RfS mit der MALDI-Massenspektrometrie grundsätzlich möglich ist, obwohl RfS nicht leitende Glastransducer verwendet.

Indium-Zinn-Oxid (ITO) ist eine elektrisch leitende Verbindung, die vornehmlich für Touch-Screens verwendet wird. Sie kann direkt auf einen Glasgrundträger aufgedampft werden und bietet den Vorteil, dass sie transparent ist. Dies eröffnet die Möglichkeit, ITO bedampfte Glsträger für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie und als elektrisch leitende Oberfläche für die MALDI-Massenspektrometrie einzusetzen. Eine erfolgreiche Integration der Mikroskop gestützten Histologie und der MALDI-Massenspektrometrie von Geweben konnte auf ITO bedampften Glsträgern bereits realisiert werden [Chaurand 2004]. Dabei wurden die Gewebeschnitte direkt auf die ITO-Glsträger aufgebracht.

In diesem Kapitel soll die Realisierung einer Oberflächenchemie auf Indium-Zinn-Oxid, die Verwendung dieser Transducer für RfS und die grundsätzlich Sensitivitätssteigerung der Massenspektrometrie auf ITO-Transducern gezeigt werden.

4.3.1 Oberflächenchemie auf Indium-Zinn-Oxid

Die herkömmliche Aktivierung von ITO-Transducern, wie in Kapitel 3.3.1 für Glastransducer beschrieben, zum Aufbau einer Oberflächenchemie schlägt fehl, da die ITO-Schicht säurelabil und dadurch von der aggressiven Piranha-Lösung abgeätzt wird.

Deshalb war für die Etablierung einer Oberflächenchemie auf ITO eine andere Strategie zur Aktivierung der Oberfläche erforderlich. Um auf der ITO-Oberfläche aktive Sauerstoffgruppen für die Anbindung an GOPTS zu schaffen, wurde die schonende Aktivierung über ein Sauerstoffplasma gewählt.

Um die Dauer der Plasmabehandlung zu ermitteln, wurden bei den ITO-Transducer nach der jeweiligen Einwirkzeit der Kontaktwinkel für Wasser ermittelt. Je niedriger dieser Winkel war desto größer war die Hydrophilie der Oberfläche. Dies galt als Maß für die erzeugten aktiven Sauerstoffgruppen auf den Oberflächen.

Tabelle 4-2: Bestimmung des Kontaktwinkels von Wasser auf mit Sauerstoffplasma aktivierte ITO-Transducer.

Behandlung der ITO-Oberflächen mit Sauerstoffplasma	Kontaktwinkel Φ für Wasser
0 s	71°
338 s	9,71°
600s	nicht bestimmbar

Bereits nach 5 Minuten Sauerstoffplasmabehandlung zeigten die ITO-Transducer einen deutlich erniedrigten Kontaktwinkel im Vergleich zu den unbehandelten ITO-Transducern (siehe Tabelle 4-2). Nach 10 Minuten konnte kein Kontaktwinkel für die behandelten ITO-Transducer mehr bestimmt werden, d.h. die maximale Hydrophilie ist gegeben und eine längere Behandlungszeit somit unnötig. Die ITO-Transducer wurden für die folgenden Oberflächenchemie-Schritte 10 Minuten mit dem Sauerstoffplasma behandelt.

Ob die Leitfähigkeit der Oberflächen durch die Sauerstoffplasmabehandlung beeinträchtigt wurde, konnte über die Ermittlung des Widerstands zweier Elektroden

im Abstand von 1 cm, durch Messung der Spannung bei vorgegebener Stromstärke, für die behandelten ITO-Transducer bestimmt werden.

Tabelle 4-3: Bestimmung des Widerstandes der mit Sauerstoffplasma behandelten ITO-Transducern

Sauerstoffplasmabehandlung in s	Stromstärke in mA	Gemessene Spannung in mV	Berechneter Widerstand in Ω
0	1	1,7	1,70
	2	3,5	1,75
	3	5,2	1,73
338	1	1,75	1,75
	2	3,55	1,78
	3	5,35	1,78
600	1	1,7	1,70
	2	3,5	1,75
	3	5,2	1,73

Tabelle 4-3 zeigt, dass der Widerstand durch die Sauerstoffplasmabehandlung nicht beeinflusst wird. Die Leitfähigkeit der Oberfläche blieb erhalten. Diese Beobachtungen werden auch durch die Arbeiten von Hyungsik et. al. [Hyungsik 2002] unterstützt.

Nach einer Sauerstoffplasmabehandlung von 10 Minuten wurde die Oberfläche mit GOPTS behandelt und anschließend Aminodextran immobilisiert. Diese Modifizierungsschritte konnten ohne Änderungen nach der in 3.3.1 beschriebenen Methode durchgeführt werden. Nach der Immobilisierung von AMD erhielt man den gegen unspezifische Wechselwirkungen abgeschirmten Transducer zur weiteren Funktionalisierung.

Die Kontrolle der erfolgreichen Immobilisierung des AMD erfolgte über AFM-Aufnahmen der ITO-Transducer vor und nach der Immobilisierung, wie in Abbildung 4-8 dargestellt ist.

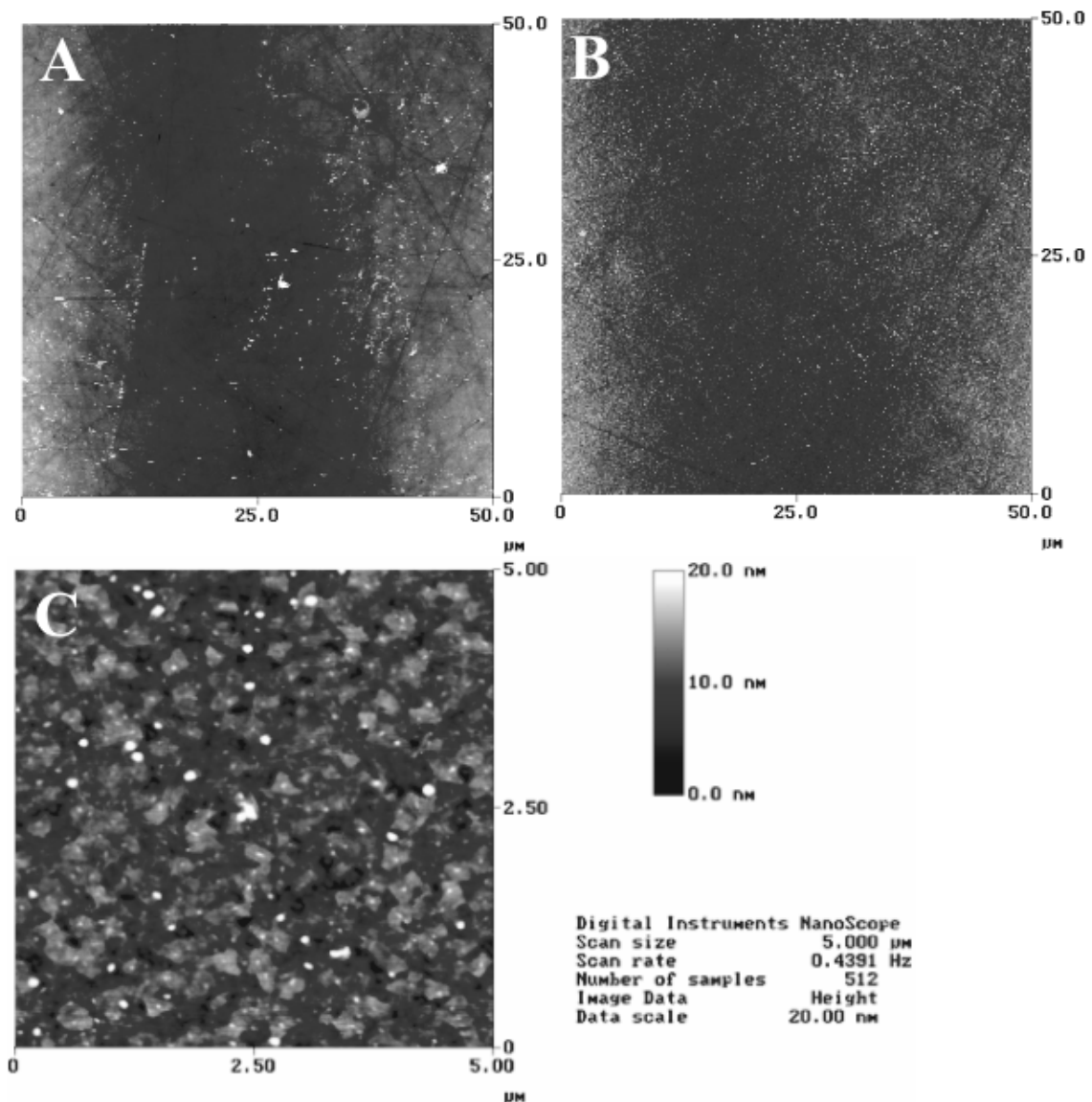


Abbildung 4-8: Atomkraftmikroskop-Aufnahmen der Indium-Zinn-Oxid (ITO) Schichten. **A** ITO-Transducer unmodifiziert; **B** ITO-Transducer nach Immobilisierung von AMD; **C** Zehnfache Vergrößerung aus B.

Aus Abbildung 4-8 wird der Unterschied vor (A) und nach (B) der Immobilisierung von AMD deutlich. Die zehnfache Vergrößerung aus B (C) zeigte die „wolkige“ Struktur des AMD, wie bei Aufnahmen von AMD auf herkömmlichen RfS-Transducern [Mutschler 2004] und unterstützte die Tatsache, dass die Oberflächenchemie bis zur Immobilisierung von AMD erfolgreich verlaufen war.

4.3.2 Messungen mit RIfS auf funktionalisierten ITO-Transducern

Um zu zeigen, dass die modifizierten ITO-Transducer für RIfS-Messungen geeignet waren, wurde die AMD modifizierten ITO-Transducer mit einem Atrazinderivat funktionalisiert und die kinetischen und thermodynamischen Konstanten eines Anti-Atrazin-Antikörpers über die Bindungskinetik bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen bestimmt. Als Referenz-Transducer wurde ein Transducer verwendet, bei dem die ITO-Schicht abgeätzt war.

In Abbildung 4-9 sind die Bindungskurven bei Antikörperkonzentrationen von 33 nM bis 7 nM wiedergegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen Wechselwirkung der Oberfläche mit Proteinen, wurde Ovalbumin in einer Konzentration von 1 mg / mL über die Oberfläche gepumpt.

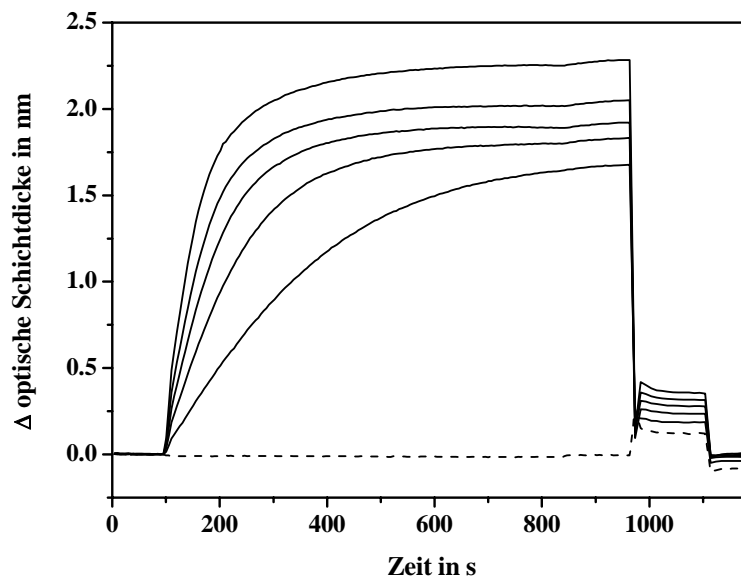


Abbildung 4-9: RIfS-Messungen auf funktionalisierten ITO-Transducern. Anti-Atrazin-Antikörper auf immobilisiertem Atrazinderivat in den Konzentrationen: 33 nM, 27 nM, 20 nM, 13 nM und 7 nM, durchgezogene Linien absteigend; Ovalbumin gestrichelte Linie.

Die funktionalisierte ITO-Oberfläche zeigte keine unspezifische Wechselwirkung mit Ovalbumin. Für die Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätskonstante konnten folgende Werte ermittelt werden:

- $k_a = 1,36 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $k_d = 5,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
- $K_{Aff} = 2,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Die erhaltenen Konstanten stimmen gut mit denen überein, die mit RfS auf Interferenzglas erhalten wurden [Piehler 1997]. Dies zeigte, dass die modifizierten ITO-Transducer sowohl für qualitative als auch für quantitative Messungen mit RfS eingesetzt werden konnten.

4.3.3 Einsatz der modifizierten ITO-Transducer in der MALDI-Massenspektrometrie

Es galt nun zu klären, ob sich der Aufwand, eine Oberflächenchemie auf ITO zu etablieren, lohnte und ITO-Transducer zu einer niedrigeren Nachweisgrenze in der Massenspektrometrie führten.

Dazu musste ein Bruker MALDI-Target speziell für die ITO-RfS-Transducer angefertigt werden (siehe Abbildung 4-10). Aus der Edelstahlplatte wurden Platzhalter in den Maßen der Transducer eingefräst. Die Platzhalter durften nur so tief sein wie die Höhe der Transducer, da ansonsten die Detektion der Massen im Time-of-Flight-Detektor des Massenspektrometers fehlerhaft sein würden. Die Transducer konnten dann in diese Platzhalter eingeklebt und über Leitsilber elektrisch leitend mit der Edelstahloberfläche der MALDI-Platte verbunden werden. Die Verbindung wurde vor der Messung von jedem ITO-Transducer mit einem Leitfähigkeitsmessgerät überprüft.

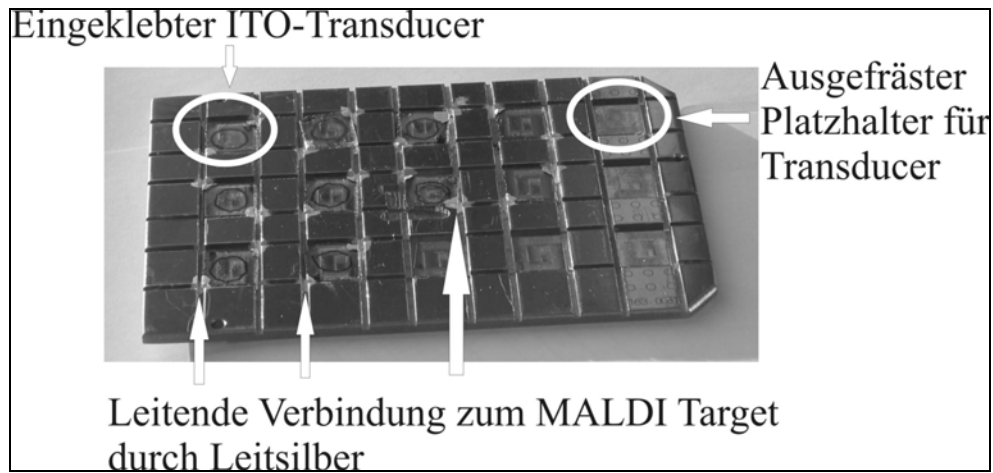


Abbildung 4-10: Modifiziertes Bruker MALDI Target. Eingeklebte ITO-Transducer in den ausgefrästen Platzhalter und mit Leitsilber elektrisch leitend mit der Edelstahloberfläche verbunden. Eingesetzt für die Messungen im MALDI-Massenspektrometer.

Im Folgenden wurden die Messungen im MALDI-Massenspektrometer auf den mit AMD modifizierten ITO-Oberflächen durchgeführt, da die AMD-Oberflächen als Grundlage für die weitere Funktionalisierung der Oberflächen verwendet werden. Ein tryptischer BSA Verdau von Bruker wurde als Massenstandard für die Messungen im Massenspektrometer verwendet. Da das BSA-Protein durch die Protease Trypsin selektiv in bestimmte Peptidfragmente geschnitten wird, waren die zu detektierenden Massen der Peptide bekannt. Vor jeder Messung wurde mittels einer Standardlösung auf der Transduceroberfläche das Gerät kalibriert, um mögliche Höhenunterschiede des Transducers gegenüber der Edelstahloberfläche auszugleichen.

Um den Einfluss der elektrisch leitenden Oberfläche der ITO-Transducer gegenüber den nicht leitenden RfS-Transducern zu bestimmen, wurde der Massenstandard immer auf einem ITO- und einem Glas-Transducer gemessen.

Vor der Auftragung des Massenstandards wurde die 0,5 μL Matrix, bestehend aus Nitrozellulose in α -Cyanozimtsäure, auf die Oberfläche gegeben. Anschließend wurden 0,5 μL von verschiedenen Verdünnungen des BSA-Massenstandards in Trifluoressigsäure auf die Matrix pipettiert und im Vakuum getrocknet.

In der Proteinbiochemie werden solche tryptische Verdauungen von Proteinen verwendet, um sie anhand ihrer Peptidfragmente zu identifizieren. Dies macht man, da die Massenspektrometrie bei kleinen Massen wesentlich empfindlicher und genauer ist. Man nennt diese Methode zur Proteinbestimmung „Peptide Mass Fingerprint“ (PMF). Die im Massenspektrometer erhaltenen Peptidfragmente, werden anhand der gefundenen Massen in der frei verfügbaren Datenbank Mascot von Matrix Science Inc. (<http://www.matrixscience.com>) identifiziert.

Die Messungen wurden bei gleicher Laserdämpfung und Signalintegration auf beiden Substraten durchgeführt. In Abbildung 4-11 sind die Massenspektren des BSA-Massenstandards auf Glas und ITO dargestellt. Bis ca. 900 m / z ist in beiden Spektren ein Hintergrundrauschen zu erkennen. Dieses „Gartenzaunmuster“ stammte vom Aminodextran, das auf der Oberfläche immobilisiert wurde. Auf beide Transducer wurde eine Konzentration von 50 fmol / mm² des Massenstandards aufgebracht.

Auf ITO waren die Massen des Protein-Verdaus noch klar, auf Glas nur noch der Peak bei 1640 m / z erkennbar. In der PMF-Analyse mit Mascot konnten die Massenpeaks des Standards auf dem ITO-Transducer mit hoher Genauigkeit (Score: 183) dem BSA zugeordnet werden. Zur Identifizierung des Proteins über die Peptidmassen benötigte man auf den Glastransducern eine fünf Mal höhere Konzentration des Massenstandards.

Durch die elektrisch leitenden und mit der Edelstahloberfläche verbundenen ITO Transducer konnte die Sensitivität der MALDI-Messungen im Vergleich zu den Glastransducern um den Faktor 5 verbessert werden.

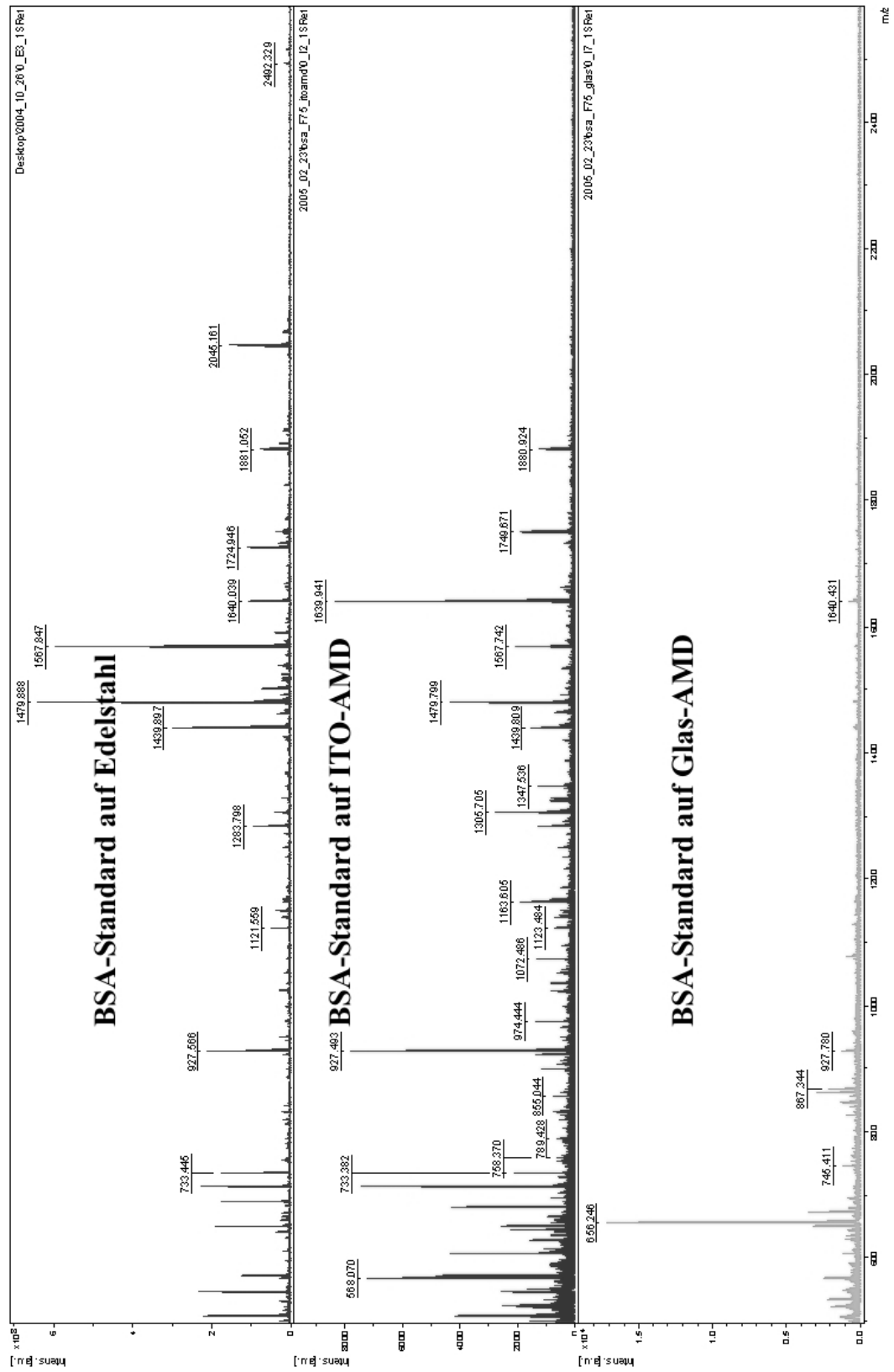


Abbildung 4-11: Massenspektren eines tryptischen Standard BSA-Verdau auf Edelmetall, ITO-Transducer und Glas-Transducer.

4.3.4 Zusammenfassung

Die mit Indium-Zinn-Oxid bedampften Glaträger ließen sich ohne Verlust ihrer Leitfähigkeit mit AMD modifizieren. Durch den gewählten Aktivierungsschritt über die Sauerstoffplasmabehandlung konnte über eine Oberflächenchemie die Transducer funktionalisiert werden. Mit den funktionalisierten ITO-Transducern konnte man mit RfS die zeitliche Änderung der optischen Schichtdicke einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung markierungsfrei beobachten und durch Auswertung der kinetisch kontrollierten Anbindung des Antikörpers an die Oberfläche die Assoziations- und Dissoziationskonstante, sowie die Affinitätskonstante dieser Wechselwirkung bestimmen. Diese Konstanten stimmten sehr gut mit denen überein, die auf Interferenzglas erhalten wurden. Die Messungen eines Massenstandards in der MALDI-Massenspektrometrie ergaben eine um den Faktor 5 gesteigerte Nachweisgrenze auf mit AMD modifizierten ITO-Transducern im Vergleich zu den Glastransducern bei gleicher Laserintensität und Signalintegrationszeit.

Mit der Etablierung einer Oberflächenchemie auf ITO-Transducer hat man eine elektrisch leitende Oberfläche für die Messungen mit RfS zur Verfügung. Die modifizierten ITO-Transducer versprechen gleichzeitig eine effektivere Kopplung der RfS mit der MALDI-Massenspektrometrie.

4.4 Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von Jurkat T-Zellen mit RIFs

T-Zellen sind die „Polizei“ des Körpers. Sie zirkulieren im Blut und im Gewebe und durchsuchen unseren Körper nach Eindringlingen. T-Zellen können über einen aktiven Prozess aus dem Blutgefäß ins umliegende Gewebe migrieren. Auch bei der Zerstörung befallener Zellen verändern sie ihre Form.

Jurkat T-Zellen dienen in der Immunologie als Modellsystem für die T-Zell-vermittelte Signaltransduktion. Es ist bekannt, dass Jurkat Zellen durch einen extrazellulären Stimulus beginnen, sich auf einer Oberfläche auszubreiten [Parsey 1993]. Diese aktive Veränderung der Zellmorphologie erfolgt über die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Es bilden sich über die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion neue Polymerisationskeime des Aktins aus, so dass die Zelle ihre Form gezielt verändern kann.

Im Folgenden soll betrachtet werden, ob die Ausbreitung der T-Zellen aufgrund eines extrazellulären Stimulus direkt optisch mit RIFs auf speziell funktionalisierten Oberflächen detektiert werden kann. Diese Ausbreitung der T-Zellen soll zudem in einem Flusssystem betrachtet werden.

4.4.1 Fluoreszenzmikroskopie der Zellausbreitung

Als Referenzarbeiten für die Untersuchung der Zellausbreitung mit RIFs wurde über Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen die Ausbreitung der Zelllinien Jurkat und JCaM 1.6 auf funktionalisierten Deckgläsern charakterisiert.

Dazu wurden auf den Deckgläsern, nach der in 3.3.2 beschriebenen Methode [Kusnezow 2003], die entsprechenden Antikörper immobilisiert. In einer Petrischale wurden die Deckgläser mit einer Zellsuspension, die eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen / mL in RPMI Medium aufwies, überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Zellen mit 3,7 %igem Paraformaldehyd in PBS auf der Oberfläche fixiert, zuerst 10 Minuten bei 4 °C und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Ausbreitung auf der funktionalisierten Oberfläche sichtbar zu machen, wurde die Fläche, die von den Zellen nicht bedeckt war, über einen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa546 markierten sekundären Anti-Maus Antikörper, der

gegen die immobilisierten Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper gerichtet war, visualisiert. Die funktionalisierten Deckgläser mit den fixierten Zellen wurden 30 min lang bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Saponin Puffer gewaschen. Das Aktinzytoskelett der Zelle wurde über Cy5-markiertes Phalloidin in Saponin Puffer sichtbar gemacht. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben nochmals mit Paraformaldehyd-Lösung 20 Minuten lang fixiert und anschließend in das Harz MOWIOL [Osborn 1982] eingebettet.

In Abbildung 4-12 sind die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen für die Zelllinie Jurkat auf den mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern funktionalisierten Oberflächen dargestellt.

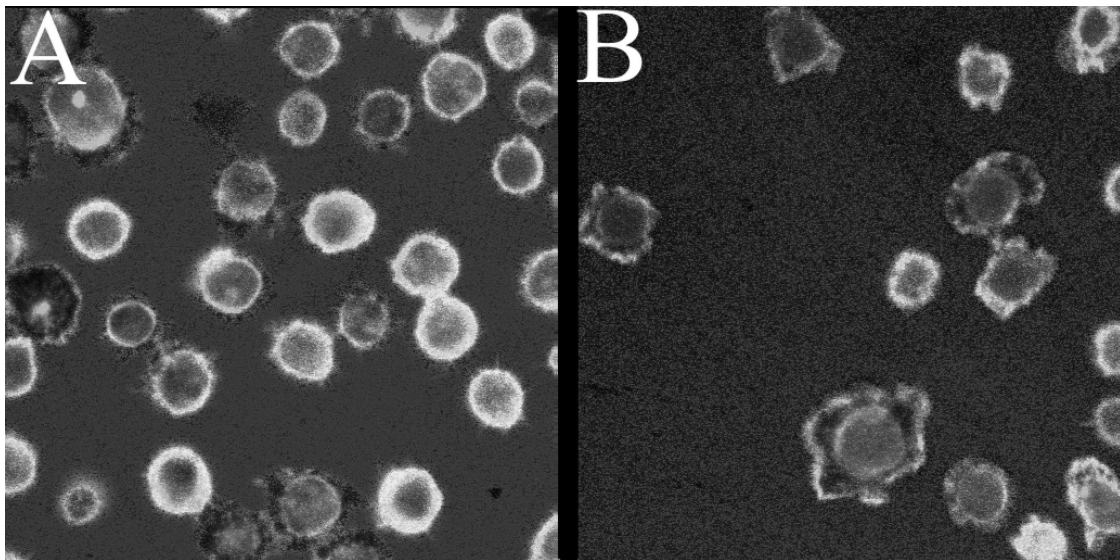


Abbildung 4-12: Übersichtsaufnahmen der Zelllinie Jurkat auf funktionalisierten Deckgläsern.

A auf immobilisierten Anti-CD28-Antikörpern, *B* auf immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern.

Man sah auf den Aufnahmen, dass die Zellen sich auf den Anti-CD28 Oberflächen absetzten und nur vereinzelt kleine Mikropili bildeten (Abbildung 4-12 A). In Abbildung 4-12 B hingegen erkannte man die Ausbreitung der Jurkat-Zellen auf den Anti-CD3 Oberflächen. Man konnte also die Stimulus abhängige Ausbreitung der Zellen über den Anti-CD3-Antikörper auf den funktionalisierten Oberflächen erkennen.

Um den Einfluss verschiedener Oberflächen und den Einfluss eines Inhibitors auf die Stimulus abhängige Ausbreitung der Jurkat Zellen zu beobachten, wurde nachfolgendes Versuchsprotokoll durchgeführt und die Ausbreitung der Zellen über Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert.

Die Ausbreitung der Zelllinie Jurkat wurde auf 3 verschiedenen Oberflächen beobachtet:

- Anti-CD3-Oberfläche,
- Anti-CD28-Oberfläche,
- BSA-Oberfläche

Um den Einfluss des Aktin-Inhibitors Cytochalasin D [Brenner 1980, Casella 1981] auf die Ausbreitung der Zellen zu beobachten, wurde die Zelllinie Jurkat zusammen mit dem Inhibitor über die Anti-CD3-Oberfläche gepumpt.

Als Referenz wurde das Verhalten der Lck-defizienten Zelllinie JCaM 1.6 beobachtet. JCaM 1.6 unterscheidet sich von der Zelllinie Jurkat lediglich durch die unterbrochene Signaltransduktion. Damit kann die Aktin vermittelte Ausbreitung der Zellen nicht stattfinden.

In Abbildung 4-13 sind die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen für die oben genannten Versuche dargestellt. In rot ist wiederum die Anfärbung mit dem sekundären Antikörper und in grün die Aktin-Anfärbung dargestellt.

In Abbildung 4-13 sind zusätzlich noch die Querschnitte oben und rechts neben dem Aufsichtsbild abgebildet. Die farbliche Kennung ist gleich. Man sieht an den Querschnittsbildern die Verteilung des Aktin-Zytoskeletts (grün) in den Zellen.

Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (Abbildung 4-13) zeigten die Ausbreitung der Zelllinie Jurkat auf der mit Anti-CD3-Antikörpern funktionalisierten Oberfläche nach 20 Minuten (A). Durch den Stimulus der Anti-CD3-Antikörper breiteten sich die Zellen auf dem Untergrund aus. Dies wurde auch in der Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts sichtbar. Das Aktin war hier an den Rändern, der Bereich der aktiven Ausbreitung, konzentriert. Auf der Anti-CD28 Oberfläche (B) und auf der Oberfläche, auf der BSA immobilisiert wurde (E), zeigten die Zellen keine Ausbreitung. Beide Aufnahmen zeigten allerdings eine Absetzung der Zellen auf der Oberfläche. Auf der

Anti-CD28 Oberfläche kann durch die spezifische Erkennung des Oberflächenantigens CD28 auf der Zelloberfläche die Absetzung der Jurkat Zellen erklärt werden. Auf der BSA Kontrolloberfläche sieht man eine unspezifische Absetzung der Zellen.

Der Einfluss des Aktin Inhibitors Cytochalasin D wird in Abbildung 4-13 D deutlich. Trotz Anti-CD3 Oberfläche, d.h. die Zelle erhält den Stimulus zur Ausbreitung, konnte die Aktin vermittelte Ausbreitung nicht erfolgen.

Die Lck-defiziente Zelllinie JCaM 1.6 zeigte auf der Anti-CD3 Oberfläche (C), ähnlich wie durch den Einsatz des Inhibitors (D), keine Ausbreitung. Hier konnte das Signal zur Aktinausbreitung nicht weitergeleitet werden.

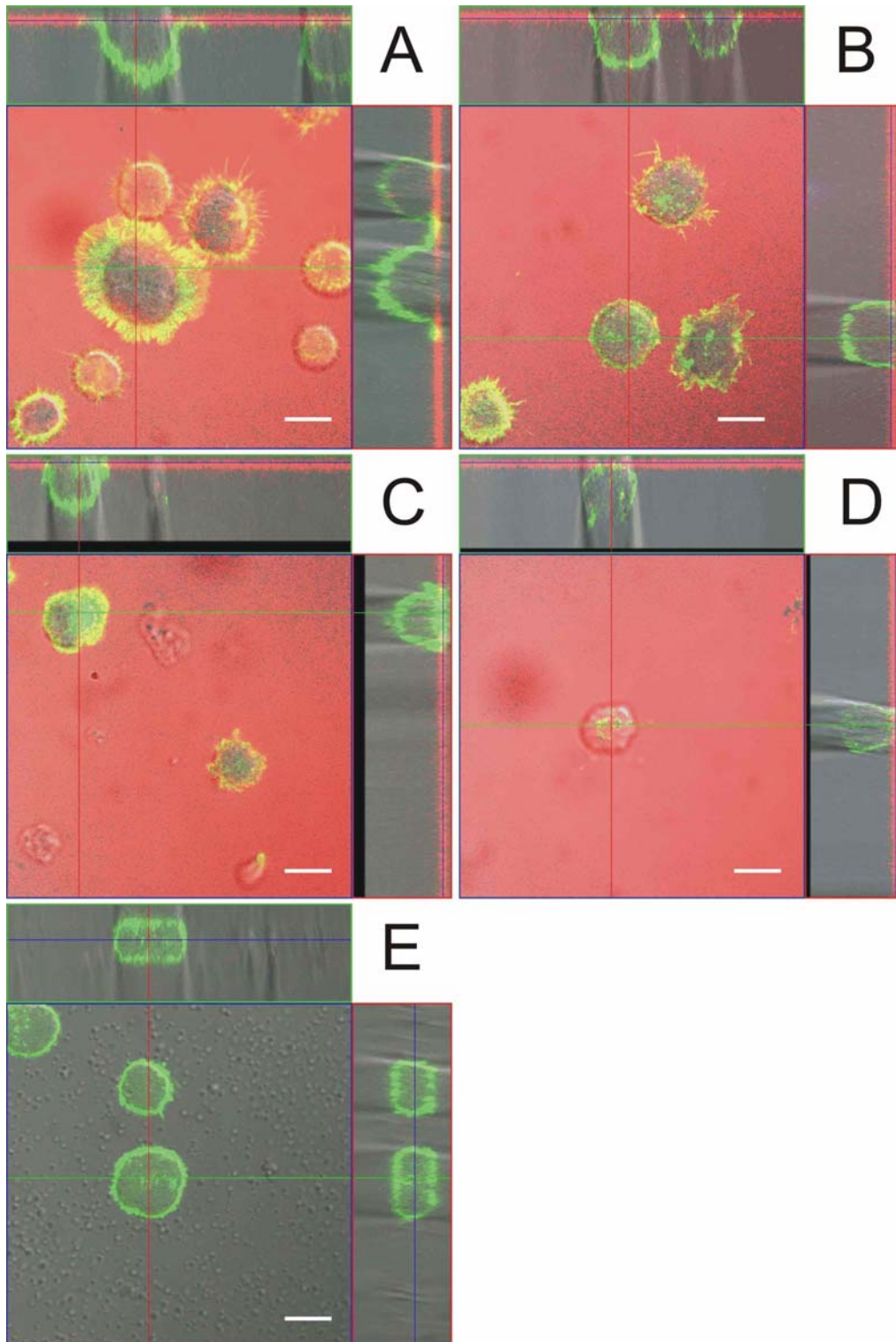


Abbildung 4-13: Verhalten der Zellen auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen. Oben und seitlich, Schnitt durch die Zelle. In rot: Oberflächenantikörperanfärbung; grün: Aktinanfärbung. **A** Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberfläche; **B** Jurkat Zellen auf Anti-CD28-Oberfläche; **C** JCaM 1.6 Zellen auf Anti-CD3-Oberfläche; **D** Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberfläche unter Einfluß des Inhibitors Cytochalasin D; **E** Jurkat Zellen auf BSA-Oberfläche.

Jede Oberfläche zeigte ein unterschiedliches Muster im Ausbreitungsverhalten der Zellen und in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts.

Der Anteil der Oberfläche, der durch die Zelle abgeschirmt war und daher nicht über den sekundären Antikörper markiert werden konnte, und die Fläche, die die Zellen über ihr Aktin-Zytoskelett einnehmen, wurde über die Software ImageProPlus (Media Cybernetics, Silver Springs, USA) quantifiziert. Aus diesen Daten ließ sich die durchschnittliche Flächenausbreitung der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen berechnen.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Zellausbreitung sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4: Durchschnittliche Flächenausbreitung in μm^2 der Zellen ($n=30$) auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Zelllinie	Jurkat				JCaM 1.6
Oberfläche	Anti-CD3	Anti-CD28	BSA	Anti-CD 3 + Inhibitor Cytochalasin D	Anti-CD3
Durchschnittliche Flächenausbreitung der Zellen in μm^2	139 ± 15	79 ± 39	0	5 ± 2	51 ± 5

Die Zahlenwerte machen nochmals deutlich, dass sich die Jurkat Zellen auf der mit Anti-CD3-Antikörpern immobilisierten Oberfläche am stärksten ausbreiten. Auf der gleichen Oberfläche lässt sich in diesen Messungen die Ausbreitung durch den Inhibitor fast vollständig unterdrücken.

Gegenüber der Ausbreitung auf der Anti-CD3-Oberfläche zeigte die Jurkat Zelllinie auf der Anti-CD28 Oberflächen eine um 42 % reduzierte Ausbreitung, JCaM 1.6 Zellen eine Reduktion um 63 %.

Da sich die Zelllinie Jurkat auf der speziell funktionalisierten Oberfläche aktiv ausbreitete, bildete die Grundlage für die Beobachtung der Zellausbreitung mit RfS.

4.4.2 Markierungsfreie und zeitaufgelöste Detektion der Zelladhäsion durch RIFs

Da Oberflächen mit RIFs markierungsfrei und zeitaufgelöst beobachtet werden können, sollte es möglich sein, die Stimulus-abhängige Ausbreitung der Zelllinie Jurkat auf speziell funktionalisierten Transducern beobachten zu können. Der RIFs Aufbau bietet zusätzlich die Möglichkeit, die Adhäsion der T-Zellen im Fluss zu charakterisieren. Da T-Zellen normalerweise im Blut „patrouillieren“, kann die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens im künstlichen Flusssystem möglicherweise als Modell für das Verhalten dieser Zellen im Blutstrom dienen.

4.4.2.1 RIFs-Aufbau zur Untersuchung von Suspensionszellen

Bei der Untersuchung der Zelladhäsion von Suspensionszellen wurde ein „offener“ Versuchsaufbau gewählt, um die Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften der Zellen im Fluss zu verwirklichen. Die Zellen wurden direkt aus der Suspension mittels einer Peristaltikpumpe über die Flusszelle gepumpt. Es wurde kein Druckbehälter verwendet und das Zellmedium konnte auch nicht über eine Vakuumpumpe entgast werden, da die Zellen den Sauerstoff benötigen, um ihre Aktivität nicht zu verlieren bzw. weil die Zellen sonst absterben würden. Dies hatte zur Folge, dass ein hohes Risiko zur Luftblasenbildung gegeben war. Bei Luftblasenbildung über dem Transducer war, durch den großen Brechungsindexsprung bedingt, eine Messung nicht mehr möglich. Der Transducer wurde waagrecht in die Flusszelle, mit der funktionalisierten Seite dem Zellmedium zugewandt, eingebaut.

Alle Arbeitsschritte, wie Mediumwechsel und Blocken der Oberfläche mit BSA, mussten manuell ausgeführt werden.

In Abbildung 4-14 ist der Versuchsaufbau graphisch dargestellt.

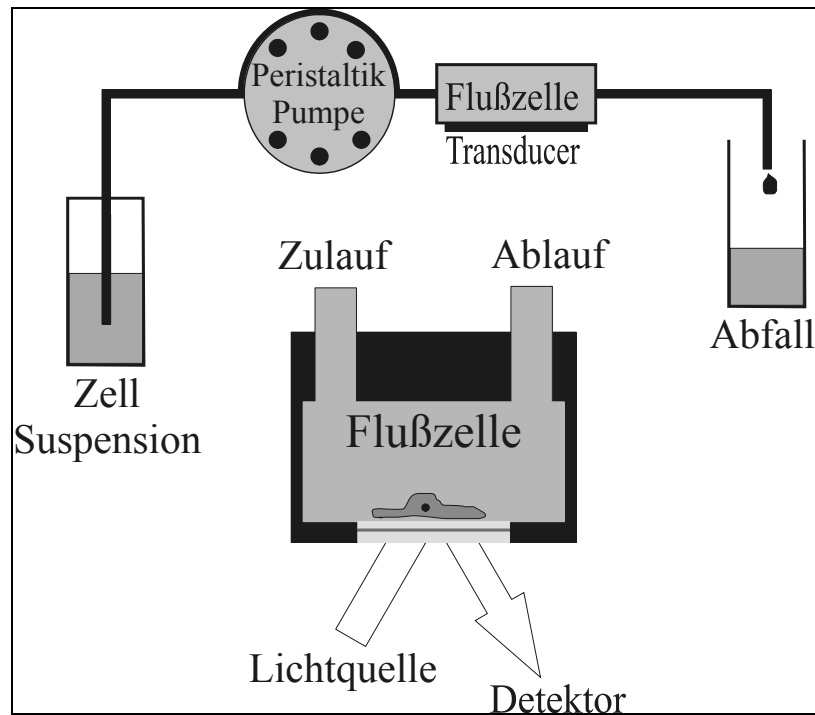


Abbildung 4-14: Schema des RfS-Aufbaus zur Untersuchung von Suspensionszellen

4.4.2.2 Qualitätskontrolle der hergestellten Transducer

Die Antikörper wurden in der in 3.3.2 beschriebenen Methode direkt, ohne AMD Abschirmung, auf die Transduceroberfläche immobilisiert [Kuszezow 2003]. Vor dem Einsatz der Transducer zur Untersuchung der Zelladhäsion wurde ein Transducer jeder Charge über einen sekundären Antikörper, der gegen den Anti-CD3-Antikörper gerichtet war, die erfolgreiche Immobilisierung mit RfS überprüft. Abbildung 4-15 zeigt durch das Anwachsen der optischen Schichtdicke die spezifische Erkennung des Anti-CD3-Antikörpers durch den sekundären Antikörper an. Der Schichtdickenzuwachs betrug ca. 2 nm.

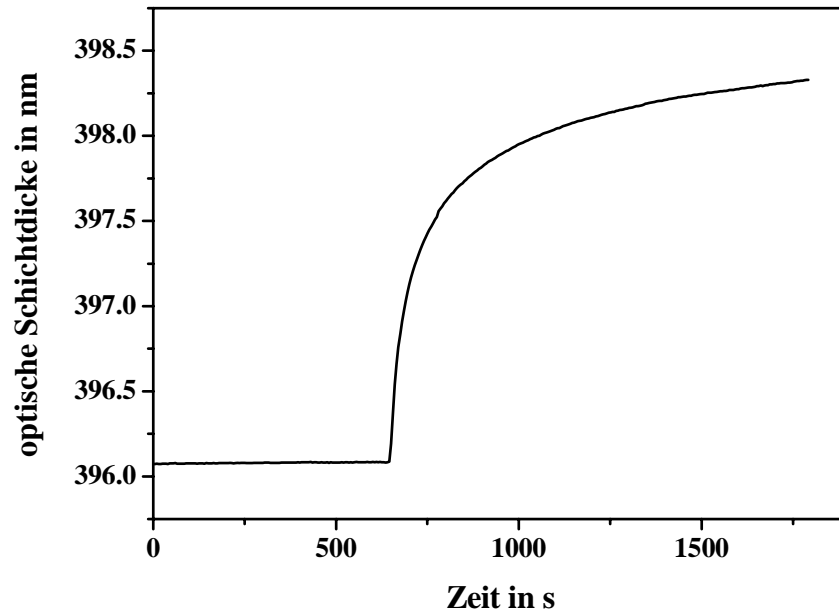


Abbildung 4-15: Erkennung des immobilisierten Anti-CD3-Antikörpers durch einen sekundären Antikörper auf der Transduceroberfläche.

Vor der Messung der Zelladhäsion wurden mit einer BSA-Lösung der Konzentration 1 mg / mL die Unspezifität der Oberfläche überprüft und gleichzeitig Fehlstellen der Oberfläche durch BSA geblockt. Abbildung 4-16 zeigt die unspezifische Wechselwirkung von BSA mit der Anti-CD3 Oberfläche. Die unspezifische Bindung ist sehr gering, wenn man bedenkt, dass bei der Oberflächenchemie auf eine Verwendung eines abschirmenden Polymers verzichtet wurde. Bei der Immobilisierung von Antikörpern über GOPTS kann offensichtlich auf eine Polymerschicht verzichtet werden. Die Schichtdickenänderung der unspezifischen Bindung von BSA betrug 0,1 nm. Nach Beendigung der Exposition mit der BSA-Lösung ging der Wert für die optische Schichtdicke fast wieder auf den Ausgangswert zurück.

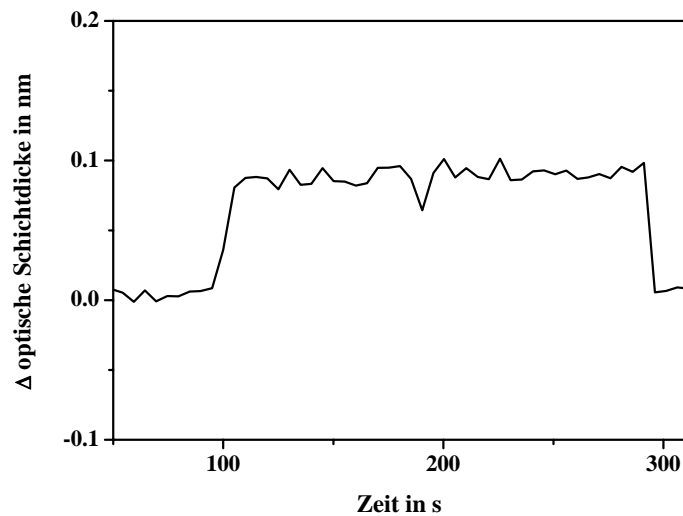


Abbildung 4-16: unspezifische Wechselwirkung von BSA mit Anti-CD3-Antikörpern funktionalisierten Transducern.

4.4.3 RfS-Messungen der Zelladhäsion der T-Zelllinie Jurkat

Die Messung der Zelladhäsion sollte möglichst vergleichbar mit denen der Stopp-flow Messungen der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen sein. Deshalb wurde folgendes Messprotokoll gewählt:

1. Vor jeder Messung wurde der Transducer mit RPMI-Medium gespült, bis das Signal keinen Drift mehr zeigte,
2. die Oberfläche mit einer 1 mg / mL BSA-Lösung in RPMI Medium geblockt.
3. 2 Minuten Basislinie mit RPMI-Medium,
4. 30 Minuten Exposition der Transduceroberfläche mit einer Suspension von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro mL RPMI-Medium,
5. 4 Minuten Spülen mit RPMI-Medium.

Die Pumpgeschwindigkeit betrug 20 μL / min.

Die Messungen des Adhäsionsverhaltens der Zellen auf den verschiedenen modifizierten Oberflächen mussten sequenziell erfolgen. Deshalb wurden die verwendeten

Transducer eines Messtages am Tag zuvor hergestellt. Die Transducer konnten nicht, wie normalerweise üblich, durch Regeneration der Oberfläche für die nächste Messung wieder verwendet werden, da durch die Regenerationslösung die Antikörper teilweise denaturieren und damit ihre Aktivität verlieren würden. Deshalb musste nach jeder Messung der jeweilige Transducer aus der Flusszelle ausgebaut, ein neuer Transducer eingebaut und das oben genannte Messprotokoll von neuem abgearbeitet werden.

Zu Beginn der Charakterisierung der Zelladhäsion der Jurkat Zelllinie wurde das Verhalten der Suspensionszelllinie auf drei verschiedenen Oberflächen untersucht:

1. Transducer, auf denen BSA immobilisiert waren:

Beobachtung der unspezifischen Wechselwirkungen der Zellen mit einer nicht funktionellen Oberfläche.

2. Transducer, auf denen Anti-CD3-Antikörper immobilisiert waren:

Beobachtung der durch den Anti-CD3-Antikörper ausgelösten Stimulation der aktiven Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche.

3. Transducer, auf denen Anti-CD28-Antikörper immobilisiert waren:

Beobachtung der Erkennung des Oberflächenantigens CD28 der Zellen durch den immobilisierten Antikörper, aber keine Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche. Kontrollmessung für die Diskriminierung der Zellausbreitung durch den Anti-CD3-Antikörper.

Die Messungen wurden sequenziell durchgeführt, aber die Reihenfolge der verschiedenen Oberflächen an den einzelnen Messtagen variiert. Vor jeder Messung wurde eine frisch bereitete Zellsuspension verwendet.

Jede einzelne Messung dauerte aufgrund des aufwendigen Protokolls 2 Stunden.

In Abbildung 4-17 sind die Ergebnisse der Messungen der T-Zelllinie Jurkat auf den verschiedenen funktionalisierten Oberflächen durch Reflektometrische Interferenzspektroskopie dargestellt.

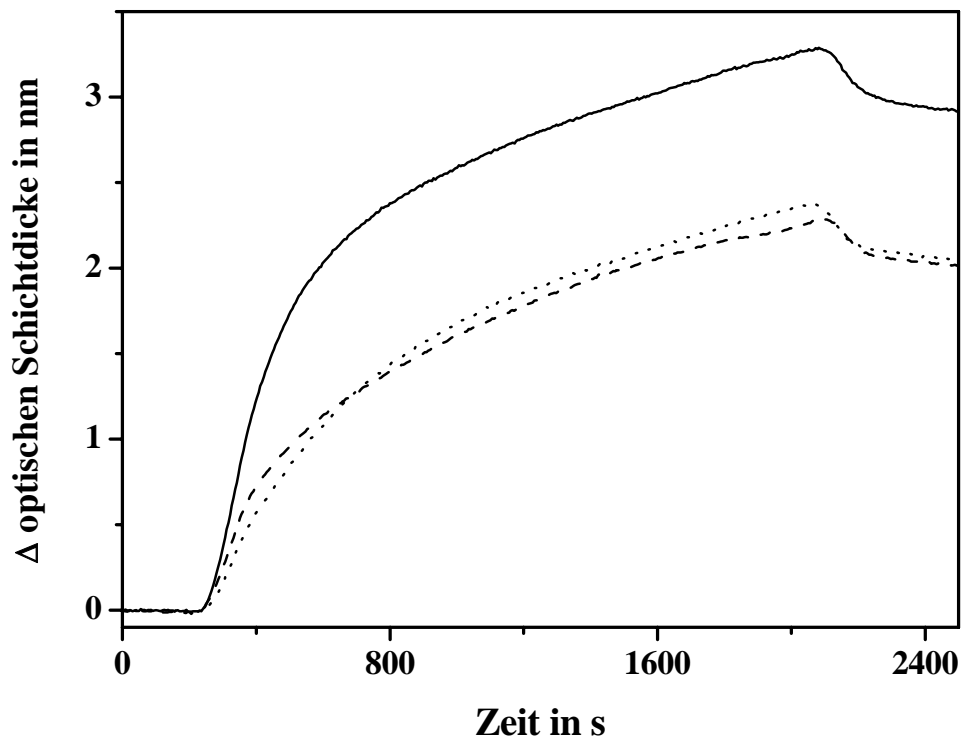


Abbildung 4-17: RIfS-Messungen der Zelladhäsion von Jurkat T-Zellen auf verschiedenen funktionalisierten Oberflächen. $5 \cdot 10^5$ Jurkat Zellen / mL wurden über den Transducer gepumpt. Dargestellt sind die zeitabhängigen Änderungen der optischen Schichtdicke der Jurkat Zell-Wechselwirkungen auf einer Anti-CD3-Oberfläche (durchgezogene Linie, —), auf einer Anti-CD28-Oberfläche (gestrichelte Linie, ----) und auf einer Oberfläche mit immobilisierten BSA (gepunktete Linie,).

Wie man aus Abbildung 4-17 deutlich erkennt, kann man das RIfS-Signal der Jurkat Zellen auf der Oberfläche, auf der die Anti-CD3-Antikörper immobilisiert waren, deutlich von den Signalen auf den Oberflächen mit immobilisierten Anti-CD28-Antikörpern und immobilisierten BSA unterscheiden. Die Änderung der optischen Schichtdicke ist deutlich größer auf der Oberfläche, die den Stimulus zur aktiven Ausbreitung der Zellen gibt, als auf den beiden Kontrolloberflächen.

Die Änderungen der optischen Schichtdicken für die beiden Kontrolloberflächen mit den immobilisierten Anti-CD28-Antikörpern und dem immobilisierten BSA sind sehr ähnlich. Auf beiden Oberflächen sollte keine aktive Ausbreitung der Jurkat Zellen

stattfinden. Hingegen sollten die Jurkat Zellen, die das Oberflächenantigen CD28 tragen, von dem immobilisierten Antikörper erkannt werden. Auf BSA-Oberflächen kann eine solche spezifische Erkennung nicht stattfinden. Es kann sich daher nur um eine unspezifische Wechselwirkung bzw. ein schwerkraftbedingtes Absetzen der Zellen auf dieser Oberfläche handeln. Offensichtlich reichte die Pumpgeschwindigkeit nicht aus, das unspezifische Absetzen der Zellen auf den horizontal in die Flusszelle eingebauten Transducern zu verhindern. Es musste davon ausgegangen werden, dass die Zellen auf allen Oberflächen gravitationsbedingte Absetzung zeigen.

Da für alle Messungen die gleiche Zelldichte, nämlich $5 \cdot 10^5$ Zellen pro mL Medium, verwendet wurde, konnte die stärkere Änderung der optischen Schichtdicke auf den Anti-CD3 Oberflächen nur von der durch den Anti-CD3-Antikörper induzierten aktiven Ausbreitung der Zellen verursacht werden.

Zieht man die Änderung der optischen Schichtdicke des Signals auf der BSA Oberfläche, die von dem unspezifischen, schwerkraftbedingten Absetzen der Zellen kam, von den Signalen auf den beiden anderen Oberflächen ab, erhält man die in Abbildung 4-18 dargestellten Differenzspektren.

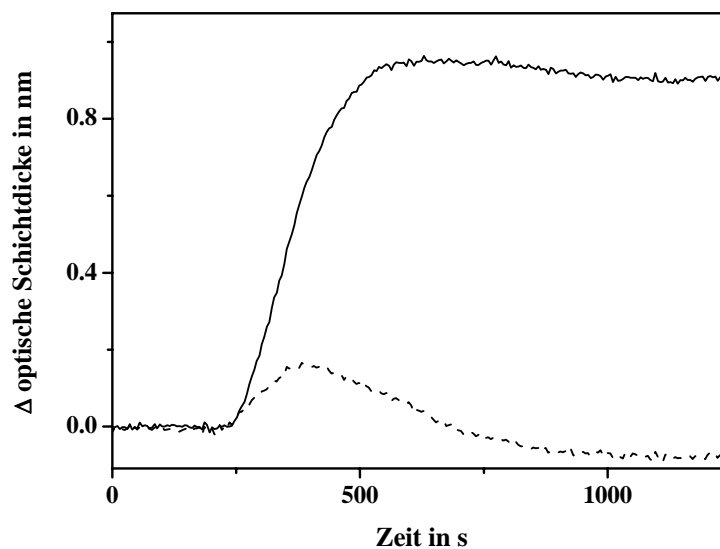


Abbildung 4-18: Differenzspektren des Adhäsionsverhalten der Zelllinie Jurkat auf einer Anti-CD3-Oberfläche (durchgezogene Linie) und einer Anti-CD28-Oberfläche (gestrichelte Linie).

Im Differenzspektrum, also nach Abzug des BSA-Signals, sah man, dass sich der Unterschied zwischen den beiden Oberflächen in den ersten 5 Minuten manifestiert. Danach gehen beide Kurven in eine stationäre Phase über.

Der Unterschied in der optischen Schichtdicke der beiden verschiedenen Oberflächen betrug 0,9 nm.

Man konnte das Adhäsionsverhalten der Jurkat Zellen auf der Anti-CD3- und auf der Anti-CD28-Oberfläche durch die Reflektometrische Interferenzspektroskopie unterscheiden.

Die Änderungen der optischen Schichtdicken auf den jeweiligen funktionalisierten Oberflächen waren an den einzelnen Messtagen unterschiedlich. Die Reduktion des Signals auf den Anti-CD28-Oberflächen war hingegen immer sehr ähnlich gegenüber der optischen Schichtdickenänderung auf den Anti-CD3-Oberflächen. Der Vergleich der Mittelwerte der Änderungen der optischen Schichtdicken, referenziert gegen das BSA Signal, ergab einen signifikanten Unterschied der Änderung der optischen Schichtdicke zwischen der Anti-CD3- und der Anti-CD28-Oberfläche (t-Test, $P < 0,05$; $n(\text{CD } 3)=4$, $n(\text{CD } 28) = 3$) (vergleiche Abbildung 4-19).

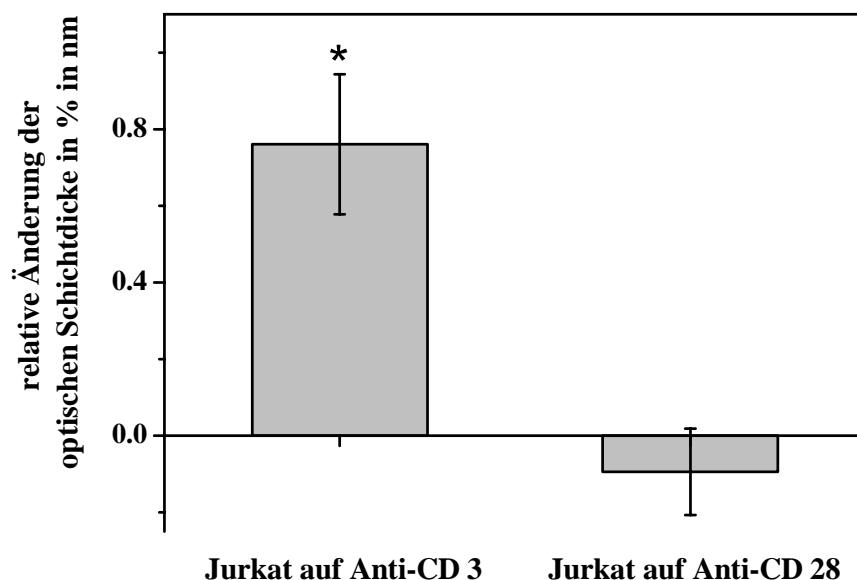


Abbildung 4-19: Relative Änderung der optischen Schichtdicke der Zelllinie Jurkat, referenziert gegen die Änderung auf der BSA Oberfläche, auf Anti-CD3-Oberflächen ($n=4$) und Anti-CD28-Oberflächen ($n=3$). Der Unterschied der Mittelwerte ist signifikant (*) (t-Test, $P < 0,05$).

Das heißt, mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie war es möglich, das unterschiedliche Verhalten der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen zu unterscheiden.

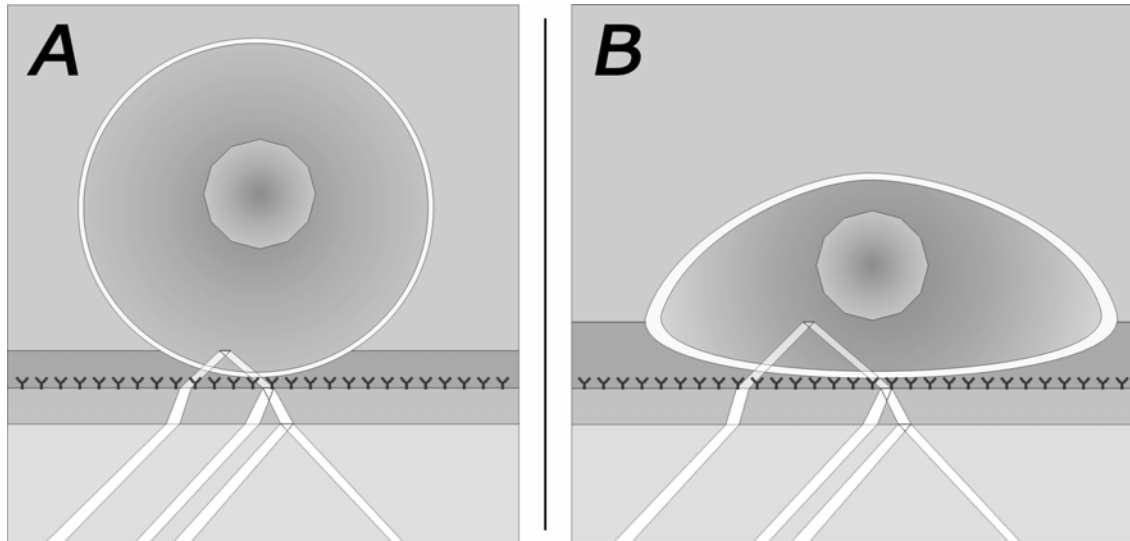
4.4.4 Erklärung für die Änderung der optischen Schichtdicke durch die Jurkat T-Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen

Die Zellen erhalten durch den immobilisierten Anti-CD3-Antikörper das extrazelluläre Signal, sich auszubreiten, wie die Voruntersuchungen in der Stopp-Flow-Versuchsanordnung durch die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen gezeigt haben. Das erhaltene Signal führt intrazellulär dazu, dass sich das Aktin-Zytoskelett reorganisiert. Dadurch kann sich die Zelle an den apikalen Enden entlang der Oberfläche ausbreiten. Die Zelle verändert also auf der Oberfläche ihre Morphologie, so dass sie nach Ende der Ausbreitung einem „Spiegelei“ ähnlich sehen (siehe Abbildung 4-13 A).

Diese Ausbreitung führt dazu, dass die Kontaktfläche der Zelle mit der Oberfläche wächst. Da das RfS-Signal über die Veränderungen gerade dieser Kontaktfläche, bzw. Veränderungen an der Grenzfläche Transducer-Medium, integriert, muss durch den Flächenzuwachs der Zellen eine größere Verschiebung des Spektrums erfolgen. Zusätzlich steigt die Proteindichte, durch die Aktinpolymerisation, an den Ausbreitungszonen. Da eine Polymerisation von Aktin mit der Lokalisierung und damit Aufkonzentrierung dieses Proteins an der Kontaktfläche einhergeht, steigt der Brechungsindex ebenfalls. Beide Effekte führen zu einer Erhöhung der optischen Schichtdicke.

Abbildung 4-20 zeigt schematisch das Verhalten und den Effekt der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen. Auf den Anti-CD28-Oberflächen (A) werden die Zellen über die Antikörper-Oberflächenantigen-Wechselwirkungen erkannt und bleiben auf der Oberfläche haften. Sie behalten aber annähernd ihre runde Morphologie bei und können sich nicht ausbreiten. Dieser Kontakt mit der Oberfläche ist über RfS detektierbar und wird durch die Erhöhung der optischen Schichtdicke wiedergegeben. Dies führt zu einer Änderung der optischen Schichtdicke.

Auf den Anti-CD3-Oberflächen (**B**) werden die Zellen ebenfalls durch die spezifischen Antikörper-Oberflächenantigen-Wechselwirkungen erkannt. Zusätzlich erhalten die Zellen das Signal, sich auf der Oberfläche auszubreiten. Dadurch wird die Kontaktfläche vergrößert. Die optische Schichtdicke muss sich bei gleicher Anzahl an Zellen auf der Oberfläche stärker verändern.



*Abbildung 4-20: A: Jurkat Zelle auf Transducer mit immobilisierten Anti-CD28-Antikörpern; Zelle wird durch Antikörper erkannt, aber kleine Kontaktfläche.
B: Jurkat Zelle auf Transducer mit immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern; Zelle wird durch Antikörper erkannt und erhält durch den Antikörper das Signal zur aktiven Ausbreitung, die Kontaktflächenvergrößerung resultiert in einer stärkeren Änderung der optischen Schichtdicke.*

Mit diesen Überlegungen konnte man davon ausgehen, dass die deutlich stärkere Änderung der optischen Schichtdicke auf den Anti-CD3-Oberflächen, auf die Stimulus abhängige Ausbreitung der Zellen zurückzuführen war.

Damit war es zum ersten Mal möglich, die aktive Ausbreitung der Zellen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie markierungsfrei zu beobachten.

Hinzu kommt, dass der detektierte Unterschied der Änderung der optischen Schichtdicke reproduzierbar und signifikant unterschiedlich war.

4.4.5 Untersuchung des Verhaltens der Zelllinie JCaM 1.6 und des Einflusses des Aktinpolymerisation-Inhibitors Cytochalasin D auf Anti-CD3-Oberflächen

Zur weiteren Charakterisierung des Systems wurde das Verhalten der Lck-defizienten Zelllinie JCaM 1.6 und der Einfluss des Aktinpolymerisation-Inhibitors Cytochalasin D [Brenner 1980; Casella 1981] auf die Adhäsionseigenschaften von Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen untersucht.

Die Zelllinie JCaM 1.6 ist ein modifizierter Klon der Jurkat Zelllinie. In ihr ist der Signaltransduktionsweg zur aktiven Ausbreitung der Zelle, durch das Ausschalten der Lck-Kinase, unterbrochen. Die Lck-Kinase ist an den CD 3-T Zell Rezeptorkomplex assoziiert und bewirkt die Übertragung des extrazellulären Signals in das Zellinnere. Da dieser Signalweg unterbrochen ist, können sich die JCaM 1.6 Zellen durch den CD 3 Stimulus auch nicht ausbreiten.

Der Inhibitor Cytochalasin D hemmt die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Die Aktinpolymerisation kann nicht mehr erfolgen. Die Jurkat Zellen können sich also unter Einfluss des Inhibitors auch nicht ausbreiten [Köhler 2005]. Dies geschieht aber, im Gegensatz zur Zelllinie JCaM 1.6 nur dadurch, dass die Ausführung des extrazellulären Signals nicht erfolgen kann. Die Zellen erhalten zwar das Signal zur Ausbreitung, das Aktin kann aber nicht mehr in einer anderen Form polymerisieren, die Zellen sich nicht mehr ausbreiten.

Die Zelllinien, JCaM 1.6 und Jurkat, wurden wie oben beschrieben in einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro mL in einer Geschwindigkeit von 20 μ L / Minuten über eine Anti-CD3-Oberfläche gepumpt. Die Jurkat Zellen wurden 5 Minuten vor der Messung mit dem Inhibitor inkubiert. Der Inhibitor hatte eine Endkonzentration von 10 μ M in der Zellsuspension.

Abbildung 4-21 zeigt die zeitabhängige Änderung der optischen Schichtdicke der einzelnen Zellversuche.

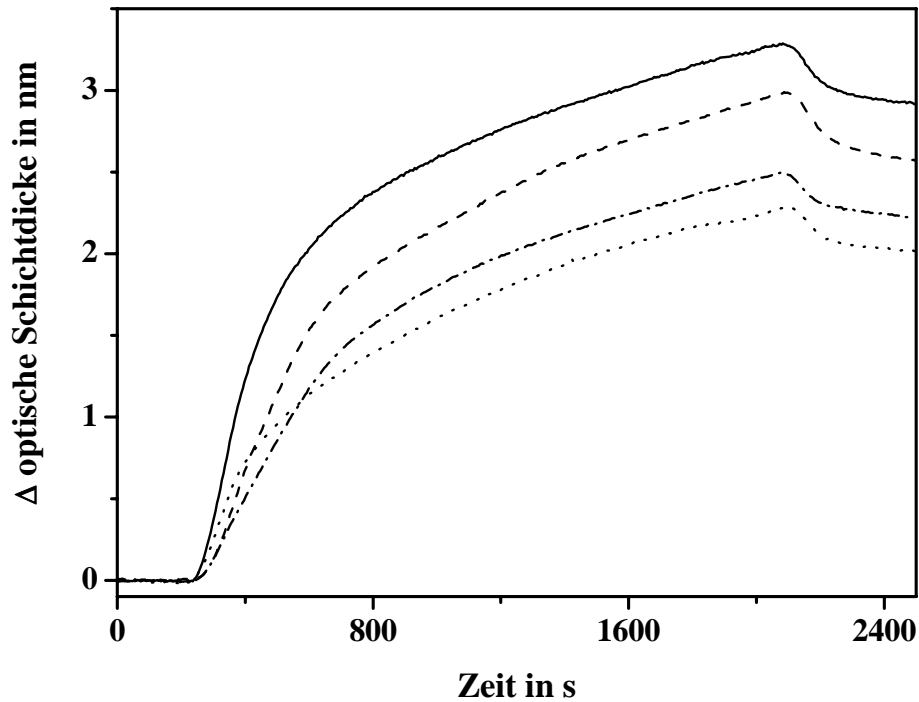


Abbildung 4-21: Zeitabhängige Änderungen der optischen Schichtdicke der Zelladhäsion. Jurkat T-Zellen auf einer Anti-CD3-Oberfläche (durchgezogene Linie) und auf einer Anti-CD28-Oberfläche (gepunktete Linie). Jurkat T-Zellen auf Anti-CD3-Oberfläche unter Einfluss des Aktinpolymerisation-Inhibitor Cytochalasin D (gepunktete und gestrichelte Linie) Lck-defiziente Zelllinie JCaM 1.6 auf Anti-CD3-Oberfläche (gestrichelte Linie). $5 \cdot 10^5$ Zellen / mL. Pumpgeschwindigkeit $20 \mu\text{L} / \text{min}$.

Man konnte eine deutliche Signalreduktion der JCaM 1.6 Zellen und der Jurkat Zellen unter Einfluss des Inhibitors auf Anti-CD3-Oberflächen erkennen. Bei der Durchführung dieser Versuche wurde als Referenz das Signal der Jurkat Zellen auf Anti-CD28-Oberflächen verwendet.

Zur Quantifizierung der Wirkung wurde die Reduktion des Signals von der maximalen Änderung der optischen Schichtdicke, nämlich die von Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen, benutzt. Dazu wurde die Signaländerung, die von den Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen erzeugt wurden, beim Zeitpunkt $t = 2000 \text{ s}$ gleich 100 %

gesetzt und die Signalreduktion der verschiedenen Versuche ausgewertet. Auf eine Referenzierung gegen BSA musste aus technischen Gründen verzichtet werden.

Bei der Zelllinie JCaM 1.6 reduziert sich das Signal im Vergleich zum Signal der Jurkat Zelllinie auf der Anti-CD3-Oberfläche ($t = 2000\text{s}$, 100%) um 11,5 %, unter Einfluss des Inhibitors Cytochalasin D um 21,5 %. Das Signal von Jurkat auf Anti-CD28-Oberflächen ist um 47,3 % reduziert.

Eine Übersicht über die Signalreduktion gibt Tabelle 4-5.

Tabelle 4-5: Signalreduktion in % bei Messpunkt $t=2000$ s. Optische Schichtdickenänderung von Jurkat Zellen auf mit Anti-CD3-Antikörpern immobilisierten Oberflächen entspricht 100 % bzw. 0% Reduktion bei Messpunkt $t=2000$ s.

Versuchsbedingungen	Signalreduktion in %
Jurkat Zellen auf mit Anti-CD28-Antikörpern immobilisierten Oberflächen	47,3 ± 15,8
Jurkat Zellen auf mit BSA immobilisierten Oberflächen	31,0 ± 4,4
Jurkat Zellen auf mit Anti-CD3-Antikörpern immobilisierten Oberflächen mit 10 µM Inhibitor Cytochalasin D	21,5 ± 12,9
JCaM 1.6 Zellen auf mit Anti-CD3-Antikörpern immobilisierten Oberflächen	11,5 ± 3,2

Man konnte die Wechselwirkung der Zelllinie JCaM 1.6 mit der Anti-CD3-Oberfläche von der Wechselwirkung der Zelllinie Jurkat unterscheiden. Das Signal der JCaM 1.6 Zellen zeigte keine so deutliche Reduktion wie die Jurkat Zellen auf BSA und auf Anti-CD28-Oberflächen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um eine andere Zelllinie handelt, die – trotz sehr hoher Verwandtschaft – eine teilweise veränderte Morphologie und Verhaltensweise zeigt. Dennoch konnte man beide Zelllinien mit RfS eindeutig voneinander unterscheiden und man hatte wieder ein Indiz dafür, dass die Änderung der optischen Schichtdicke der Jurkat Zelllinie auf Anti-CD3-Oberflächen durch die Ausbreitung der Zellen herrührte.

Mit dem Inhibitor Cytochalasin D erhielt man ebenfalls eine Signalreduktion. Durch die Hemmung der Aktinpolymerisation konnten sich die Zellen nicht mehr ausbreiten. Man kann daraus schließen, dass durch den Inhibitor die Zellausbreitung auf der Oberfläche unterbunden wurde, und dies gleichzeitig mit RIfS beobachtet und quantifiziert werden kann. Allerdings erhielt man ebenfalls keine so ausgeprägte Signalreduktion wie auf den Vergleichsoberflächen BSA und Anti-CD28 und eine relativ hohe Standardabweichung. Das Cytochalasin D musste in das Zellinnere gelangen und dort an seinen Wirkort. Die Zellen wurden vor den jeweiligen Messungen 5 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert, bevor die Zellen über den funktionalisierten Transducer gepumpt wurden. Ein Grund für die geringere Reduktion und die relativ hohe Standardabweichung könnte demnach sein, dass die Zeit von 5 Minuten noch nicht ausreichte, um die Aktinpolymerisation aller Zellen vollständig zu hemmen. Wie aus Abbildung 4-18 ersichtlich, findet die Ausbreitung der abgesetzten Zellen sehr schnell statt. Es erscheint deshalb durchaus möglich zu sein, dass einige abgesetzte Zellen bei denen die Ausbreitung noch nicht gehemmt ist, sich ausbreiten konnten und daher ein insgesamt höheres Signal erzeugt wurde als bei den Anti-CD28- und BSA-Oberflächen. Trotzdem konnte die Wirkung des Inhibitors in einer Änderung der optischen Schichtdicke gegenüber dem nicht inhibierten Fall detektiert werden. Mit dem System ist es somit möglich, niedermolekulare Substanzen, die das Ausbreitungsverhalten der Zellen beeinflussen, durch RIfS zeitaufgelöst und markierungsfrei zu beobachten.

Zusammenfassung

Mit RIfS ließ sich die Stimulus abhängige Ausbreitung der Jurkat Zellen auf den mit Anti-CD3-Antikörpern immobilisierten Transducern beobachten. Dies ließ sich durch den Vergleich von Oberflächen, bei denen eine Ausbreitung der Zellen nicht, oder nur sehr gering stattfand, bestätigen. Oberflächen, auf denen BSA und Anti-CD28-Antikörper immobilisiert wurden, zeigten ein um 50 % reduziertes Signal (bei 2000 s) im Vergleich zum Signal von Jurkat Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen.

Bei der Lck-defiziente Zelllinie JCaM 1.6 kann das Signal vom TCR/CD3-Komplex nicht mehr ins Zellinnere geleitet werden. Die Signalkaskade ist unterbrochen und es

keine Ausbreitung dieser Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen stattfinden. Diese Zelllinie kann ebenfalls von den Jurkat Zellen auf der gleichen Oberfläche unterschieden werden.

Der Einfluss eines Inhibitors auf die Zellausbreitung konnte ebenfalls beobachtet werden. Die Wirkung des Aktinpolymerisation-Inhibitors Cytochalasin D zeigte sich durch eine Reduktion des RfS-Signals.

In Abbildung 4-22 sind die Signalreduktionen durch die verschiedenen Einflussfaktoren graphisch wiedergegeben.

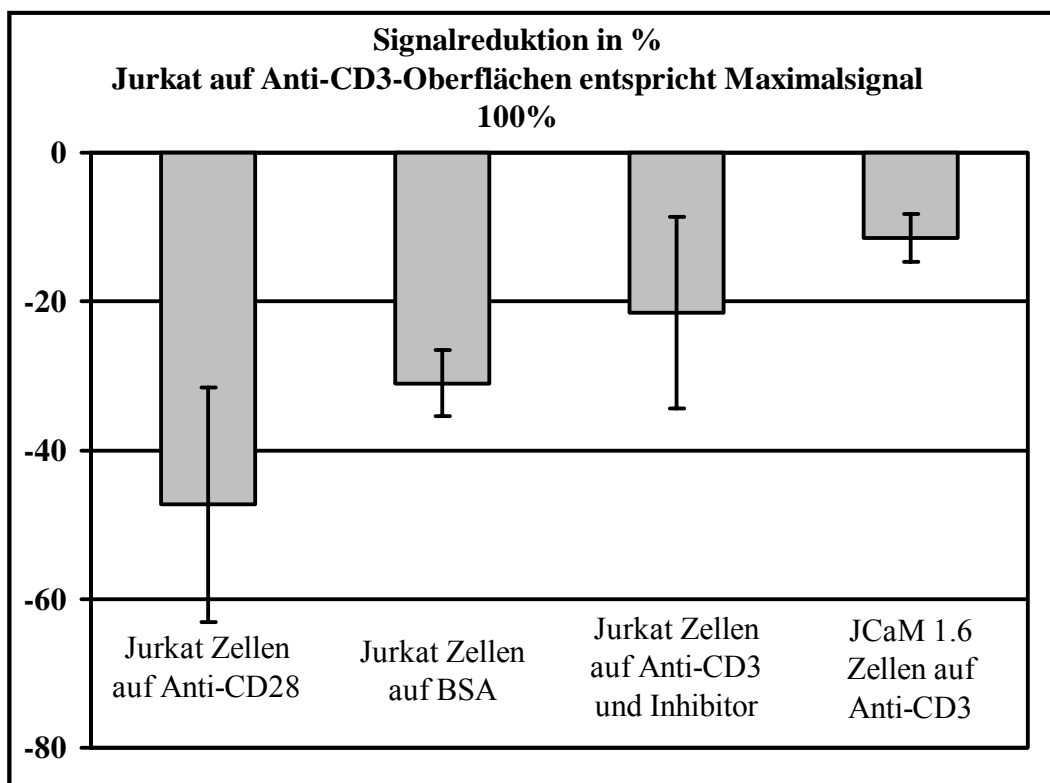


Abbildung 4-22: Signalreduktion in % durch das Verhalten der Zellen auf verschiedenen funktionalisierten Oberflächen.

4.4.6 Betrachtung der Anfangskinetik der Wechselwirkungen der Zellen mit den verschiedenen Oberflächen

Mit der zeitabhängigen Detektion der Zelladhäsion durch RIFs konnte man über die Anfangssteigung der Messkurven, die Kinetik der durch das Adhäsionsverhalten der Zellen verursachten Signaländerung im Fluss beobachten. Betrachtete man den Beginn der Messkurven, so fiel auf, dass die Anfangssteigungen unter den einzelnen Versuchsbedingungen unterschiedlich waren. In Abbildung 4-23 sind die Messkurven zu Beginn der Adhäsion bis zum Messzeitpunkt 500 s für die Wechselwirkungen der Zelllinie Jurkat mit der Anti-CD3-, Anti-CD28- und BSA-Oberfläche gezeigt.

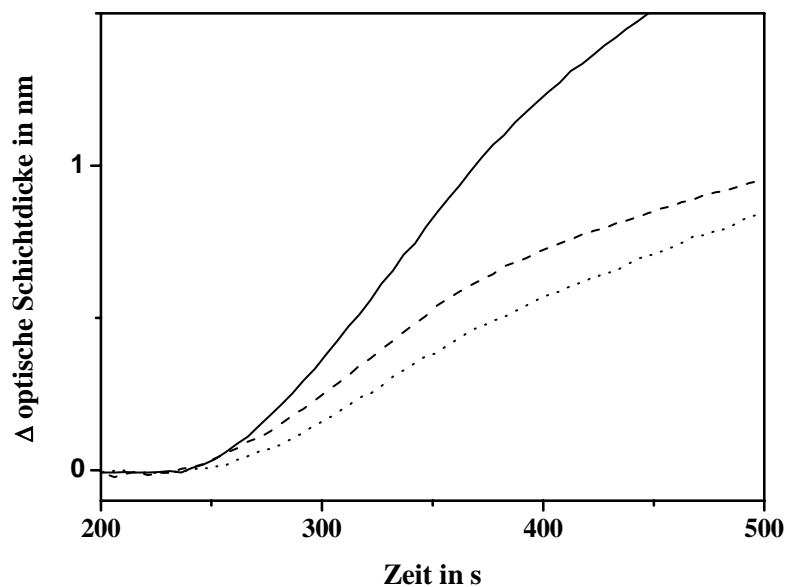


Abbildung 4-23: Anfangssteigungen der zeitabhängigen Änderungen der optischen Schichtdicke der Jurkat Zell-Wechselwirkungen auf einer Anti-CD 3-Oberfläche (durchgezogene Linie), auf einer Anti-CD 28-Oberfläche (gestrichelte Linie) und auf einer Oberfläche mit immobilisiertem BSA (gepunktete Linie).

Die Jurkat Zellen auf der Anti-CD3-Oberfläche zeigten die größte Steigung. Hier fand auch die Ausbreitung der Zellen statt. Das heißt, die Zellen, die sich auf der Oberfläche absetzten, begannen auch sofort mit der Ausbreitung. Die zeitliche

Änderung der optischen Schichtdicke ist für die Anti-CD28-Oberfläche größer als für die BSA-Oberfläche. Auf der BSA-Oberfläche konnten sich die Zellen nur unspezifisch absetzen. Auf der Anti-CD28-Oberfläche konnte hingegen das Oberflächenantigen CD28 auf den Zellen von dem immobilisierten Antikörper auf der Transduceroberfläche erkannt werden. Diese spezifische Wechselwirkung bewirkt wohl die größere Anfangssteigung des Signals. Bei der Steigung auf der Anti-CD3-Oberfläche konnten somit zwei Effekte, die Ausbreitung der Zellen und die spezifische Erkennung von CD3 auf der Zelloberfläche, zusammen für die größte Steigung verantwortlich gemacht werden.

In Tabelle 4-6 sind die Sekantensteigungen als Maß für die Anfangsgeschwindigkeiten aller Zelladhäsionsversuche angegeben.

Tabelle 4-6: Sekantensteigungen zwischen den Messpunkten 260 s und 340 s als Maß für die Anfangsgeschwindigkeiten. Dargestellt in ΔOT in nm / s (OT = optische Schichtdicke). Zwischen den gewählten Messpunkten für die Bestimmung der Sekantensteigungen waren die Messkurven annähernd linear.

Versuchsbedingungen	Sekantensteigung ΔOT (optische Schichtdicke) in nm / s
Jurkat Zellen auf Oberflächen mit immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern	$6,8 \pm 1,6 * 10^{-3}$
Jurkat Zellen auf Oberflächen mit immobilisierten Anti-CD28-Antikörpern	$5,8 \pm 0,4 * 10^{-3}$
Jurkat Zellen auf Oberflächen mit immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern mit 10 μ M Inhibitor Cytochalasin D	$4,2 \pm 0,6 * 10^{-3}$
JCaM 1,6 Zellen auf Oberflächen mit immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern	$4,1 \pm 0,6 * 10^{-3}$
Jurkat Zellen auf Oberflächen mit immobilisiertem BSA	$2,6 \pm 1,3 * 10^{-3}$

Bei Betrachtung der Anfangssteigungen ergab sich das erwartete Bild. Die größte Anfangssteigung hatten die Messkurven der Jurkat Zellen auf den Anti-CD3-

Oberflächen, die niedrigste auf den BSA-Oberflächen. Die beiden Versuchsbedingungen, bei denen keine Ausbreitung der Zellen stattfinden konnte, nämlich die Inhibition der Aktinpolymerisation durch Cytochalasin D und der Lck-defiziente Klon der Jurkat Zelllinie JCaM 1.6, zeigten ähnliche Anfangssteigungen auf den Anti-CD3-Oberflächen. Die Messkurve für die Jurkat Zellen auf der Anti-CD28-Oberfläche zeigte eine größere Anfangssteigung, obwohl sich die Zellen darauf nicht ausbreiten sollten. Aber die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zeigten, dass diese dennoch kleine Pseudopodien, also Zellfortsätze bilden.

Mit der Bestimmung der Anfangssteigungen konnten also die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden.

Korreliert man die Anfangssteigung der Zellausbreitung mit der Signalreduktion der Zelladhäsion, erhält man folgendes Diagramm, siehe Abbildung 4-24.

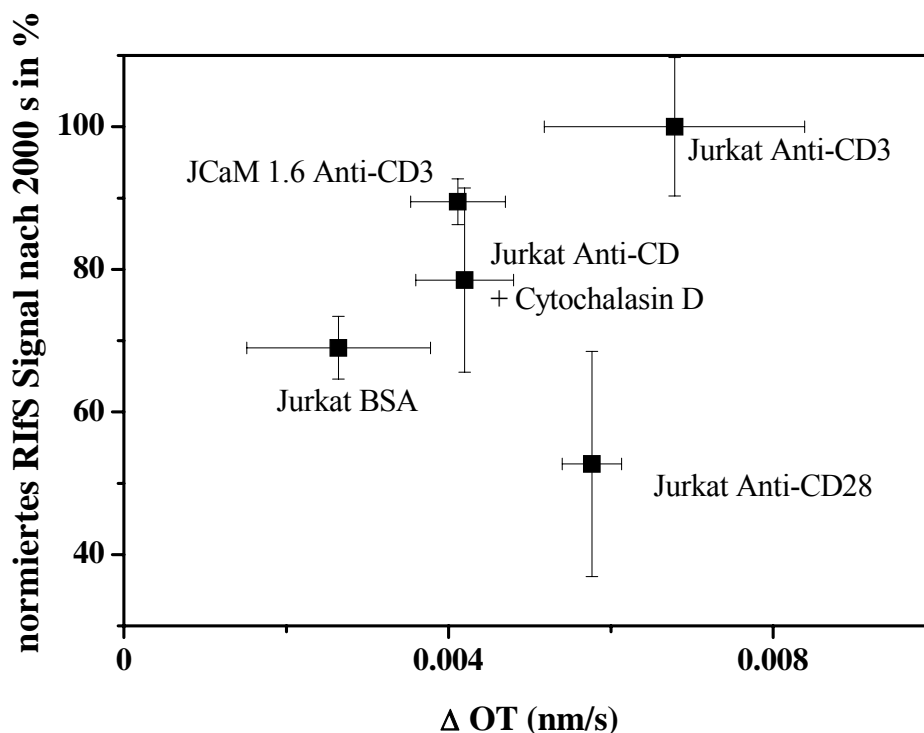


Abbildung 4-24: Korrelation der Anfangssteigungen ΔOT in nm / s mit der Reduktion des RfS-Signals bei 2000 s.

Bis auf das Wertepaar für das Verhalten der Jurkat Zellen auf Anti-CD28-Oberflächen, zeigten die Werte für die Anfangssteigung und der Signalreduktion eine gute Korrelation. Die Bestimmung der Anfangssteigungen der Messsignale gab zusätzlich Informationen über die Geschwindigkeit der Erkennung bzw. Ausbreitung und bestätigte die Ergebnisse der Endpunktbestimmung der Signalreduktion bei 2000 Sekunden im Fluss. Kinetik und maximale Änderung der optischen Schichtdicke können also mit RIfS gleichzeitig, d.h. aus den selben Messkurven, bestimmt werden und der Informationsgehalt beider Bestimmungen für die Interpretation und das Verhalten der Zellen auf den funktionalisierten Oberflächen verwendet werden.

4.4.7 Korrelation der RIfS-Daten mit denen der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen

Die zeitaufgelösten RIfS-Messungen gaben Informationen über die Kinetik der T-Zell-Anheftung und die Ausbreitung der Zellen in einem Flusssystem.

Deshalb war es interessant, ob eine Korrelation der dynamischen Daten mit denen aus den statischen Stopp-Flow-Messungen existierte. Abbildung 4-25 zeigt die Auftragung der Reduktion des Maximalsignals und der Anfangsgeschwindigkeit der Zellanheftung mit den bestimmten Ausbreitungsflächen der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (siehe Tabelle 4-4).

Beide Diagramme zeigen eine starke positive Korrelation der dynamischen und statischen Daten. Auffällig ist, dass die Anfangskinetik, Abbildung 4-25 B, deutlich besser mit den Daten der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen korreliert.

In Abbildung 4-25 A weicht wieder, wie in Abbildung 4-24, das Wertepaar für die Jurkat Zellen auf den Anti-CD28-Oberflächen von den anderen Wertepaaren ab. Dennoch korrelieren die Daten der Jurkat Zellen auf den Anti-CD3-Oberflächen und den BSA-Oberflächen sehr gut miteinander. Warum dieses Wertepaar abweicht, kann nicht über die RIfS-Messungen erklärt werden. In Abbildung 4-25 B zeigen hingegen alle Wertepaare eine sehr gute Korrelation.

Durch die Kombination der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und RfS ist es nun möglich, zwischen der Art und Weise der Bindung an die Oberfläche zu unterscheiden:

1. unspezifische Absetzung, wie auf den BSA-Oberflächen,
2. Kontakte, die eine schnelle und feste Anbindung aber keine Zellausbreitung bewirken, wie auf Anti-CD28-Oberflächen,
3. Inhibition der Ausbreitung der Zellen wie durch den Inhibitor Cytochalasin D und die Lck defiziente Zelllinie JCaM 1.6,
4. und Kontakte, die eine schnelle Anbindung an die Oberflächen bewirken und bei denen die Zellen sich aktiv ausbreiten, wie auf den Anti-CD3-Oberflächen.

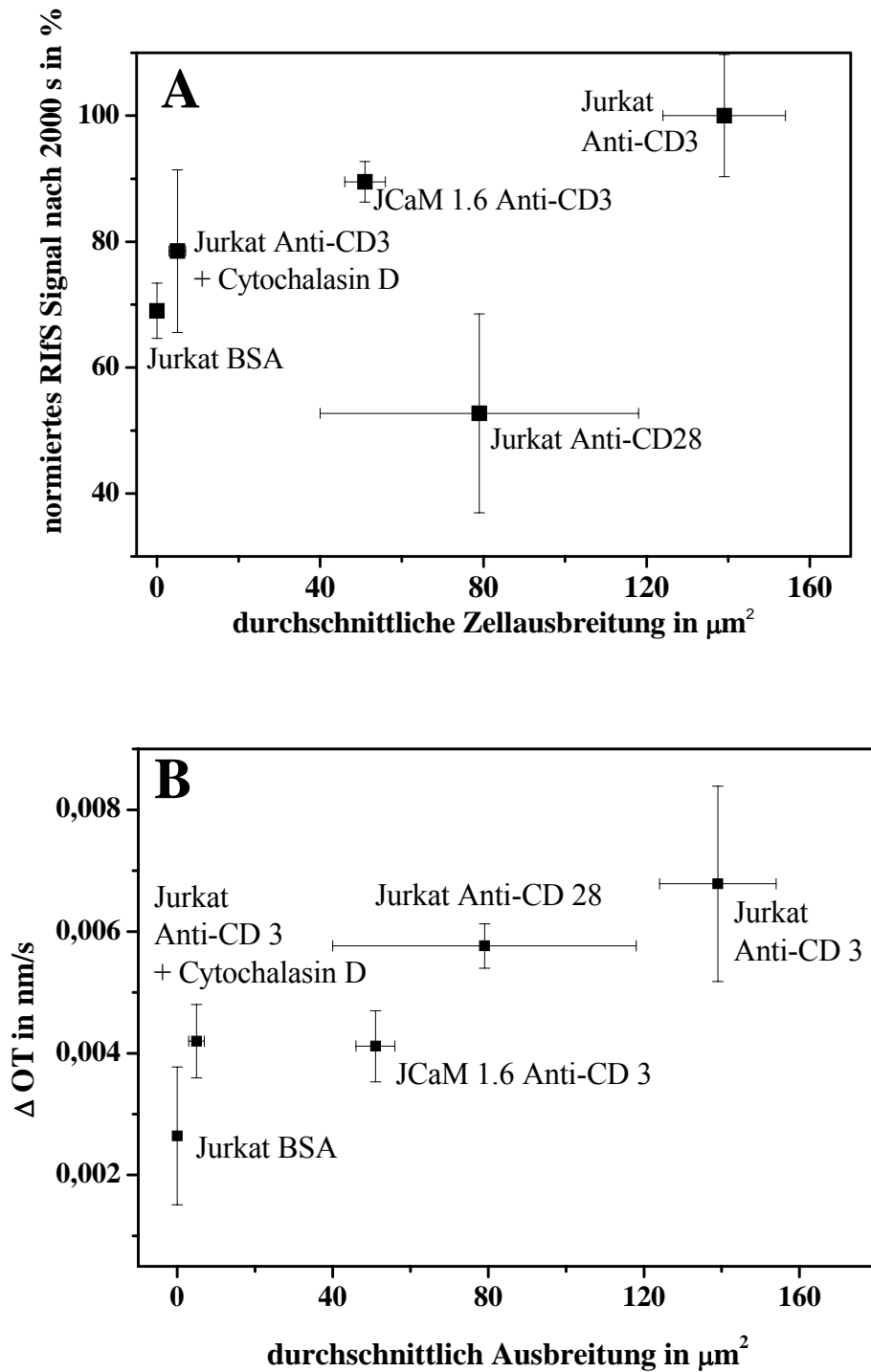


Abbildung 4-25: Korrelation der Ergebnisse der RIFS-Messungen mit den Daten der Zellausbreitung in den Stopp-Flow-Messungen. **A** Korrelation des normierten Signals mit der Zellausbreitung; **B** Korrelation der Anfangssteigung mit der Zellausbreitung.

4.4.8 Zusammenfassung

Die Ergebnisse demonstrieren, dass es die Reflektometrische Interferenzspektroskopie ermöglicht, die Adhäsion von T-Zellen markierungsfrei und zeitaufgelöst im Fluss zu detektieren. Die Zellen zeigten eine differenzierte Antwort auf die mit unterschiedlichen Antikörpern funktionalisierten Transducer. Auf den Anti-CD3-Oberflächen, die das Signal zur aktiven Ausbreitung geben, konnte die Zellausbreitung selektiv detektiert werden. Zellen, denen ein Signalprotein fehlt, und Zellen, die mit einem Inhibitor der Zellausbreitung behandelt wurden, zeigten ein charakteristisches Muster in der Kinetik und der maximalen Änderung der optischen Schichtdicke. Bemerkenswert ist, dass die beobachtete Zellausbreitung unter Stopp-Flow-Bedingungen sowohl mit der Anfangssteigung des RfS-Signals als auch mit der maximalen Änderung der optischen Schichtdicke korreliert.

Es gibt Hinweise darauf, dass in der T-Zell-Rezeptor abhängigen Signaltransduktion die Assoziationskinetik des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Peptid-Komplex ein Haupteinflussfaktor für die Aktivität der T-Zellen ist [Gonzalez 2005]. Die Messungen im Flusssystem und besonders die Korrelation der dynamischen Daten mit denen der Fluoreszenzmikroskopie, wie hier exemplarisch gezeigt, sollten es ermöglichen, diese offenen Fragen in einem Versuchsaufbau, wie dem hier verwendeten, zu klären. Schließlich kann man das Adhäsionsverhalten von T-Zellen im Fluss für das Screening von niedermolekularen Substanzen, die die T-Zell-Interaktion beeinflussen, als Modell für das Verhalten im Blutsystem verwenden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie lassen sich biochemische Erkennungsreaktionen markierungsfrei und zeitaufgelöst beobachten und quantifizieren. Die in dieser Arbeit betrachteten Wechselwirkungen zwischen biologisch aktiven Substanzen reichen von Nukleinsäurederivaten über Antikörper bis hin zu einem Transkriptionsfaktor.

Mit der RfS konnte die Wechselwirkung zwischen DNA und dem neu entwickelten Nukleinsäurederivat LNA charakterisiert werden. Dabei konnte die Affinitätskonstante eines 15 Basenpaare DNA-LNA-Mixmers mit seiner komplementären DNA bestimmt werden. Die Hybridisierung eines kompletten LNA Strangs mit seiner komplementären DNA hatte eine Affinitätskonstante von über 10^{12} M^{-1} , ein sehr hoher Wert für ein 15 Basenpaare langen Nukleinsäurestrang. Die erhaltenen Ergebnisse sind wichtig für das Verständnis der Hybridisierung. Zusammen mit der Arbeit von Pröll et al. [Pröll 2005] geben sie wichtige Informationen über die Verwendung von LNA für DNA-Chip-Sensoren, für die „antisense“ Technologie und die Untersuchung von Single Nucleotide Polymorphismen (SNP).

Bei der Untersuchung von Autoimmunantikörpern im Blutserum auf peptidfunktionalisierten Sensoroberflächen, konnte über die Verwendung eines sekundären Antikörpers zwei von vier Blutserumproben von mittels Biopsie diagnostizierten Zöliakie-Patienten ebenfalls als positiv auf Zöliakie bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass es auf Sensoroberflächen möglich ist, Erkennungsreaktionen von Antikörpern gegen ihr Epitop selbst in der komplexen Matrix Blut zu detektieren. Hinzu kommt, dass durch die Regeneration der Oberfläche, diese wiederverwendet werden konnte. Gegenüber der Verwendung aufwendig hergestellter Proteine für die Assays, die nicht regeneriert werden können, lassen sich durch den Einsatz von speziell synthetisierten Peptiden die Kosten für einen Test senken.

Mit der Untersuchung der Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors SRF mit einem funktionellen Erkennungspeptid aus dem Ternary Complex Faktor (TCF), stößt die RfS in den Bereich der Detektion von schwachen Wechselwirkungen wichtiger

Signalproteine der Zelle vor. Die bestimmte Affinitätskonstante lag dabei im Bereich von vergleichbaren Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Die technische Weiterentwicklung einer effektiven Kopplung der beiden markierungsfreien Methoden RIFs und der Massenspektrometrie, können dazu beitragen, die RIFs mit der Schlüsseltechnologie, der MS, in der Proteomanalyse zu verknüpfen. Dazu wurde eine Oberflächenchemie auf elektrisch leitende Indium-Zinn-Oxid-(ITO)-Transducer etabliert. Die elektrische Leitfähigkeit des Materials führt dazu, dass nun auch direkt unter der Probe auf dem Transducer das elektrische Feld anliegt. Mit den modifizierten ITO-Transducern erreichte man im Vergleich zu den modifizierten Glastransducer eine um den Faktor 5 niedrigere Nachweisgrenze eines BSA-Verdaus in der MALDI-Massenspektrometrie.

Die biochemische Erkennung führt in den kleinsten lebensfähigen Einheiten, den Zellen, zu bestimmten Reaktionen. Diese können für den Betrachter unsichtbar sein, z.B. durch die Veränderung der intrazellulären Proteinstruktur, oder aber zu einer Bewegung oder zu einer Veränderung der Zellmorphologie führen. Mit RIFs konnte zum ersten Mal die Stimulus abhängige Ausbreitung von Jurkat T-Zellen auf speziell funktionalisierten Oberflächen zeitaufgelöst und markierungsfrei beobachtet werden. Dabei konnte man den Effekt der intrazellulären Signalkaskade, ausgelöst durch die Stimulierung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes durch immobilisierte OKT-3 Antikörper, charakterisieren. Die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes resultiert über eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade in einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und damit in die Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche. Die Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche führte zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche und damit zu einer stärkeren Änderung der optischen Schichtdicke. Es konnte die Reaktion der Jurkat T-Zellen auf Kontrolloberflächen, die keine Stimulus zur Ausbreitung der Zellen gaben, von den stimulierenden Anti-CD3-Oberflächen unterschieden werden. Die Lck-Kinase defiziente Zelllinie JCaM 1.6, die den Stimulus auf die intrazelluläre Signalkaskade nicht übertragen kann, konnte ebenso wie die Wirkung des Aktin-Polymerisations-Inhibitor Cytochalasin D von dem Verhalten der Jurkat T-Zellen auf Anti-CD3-Oberflächen unterschieden werden. Wichtig dabei ist, dass die Messungen in einem Flusssystem stattfanden. Die Wirkung

der einzelnen Oberflächen, des Inhibitor und die Reaktion der Zelllinie JCaM 1.6 konnten sowohl über die Signalreduktion bei einem Endpunkt als auch über die Anfangssteigungen der Messkurven quantifiziert und unterschieden werden. Nur durch die zeitaufgelösten Messungen mittels RIfS konnten sowohl die Daten bei einem Endpunkt als auch die dynamischen Daten durch die Bestimmung der Anfangssteigung für einen Vergleich der Versuchsbedingungen herangezogen werden. Bemerkenswert ist, dass die RIfS-Daten sehr gut mit den bestimmten durchschnittlichen Flächenausbreitungen, die über Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen beobachtet wurden, korrelierten.

Ausblick

Die Untersuchung von Zellen in einem Flusssystem ermöglicht es, Bedingungen zu simulieren, wie sie im menschlichen Organismus im Blutsystem vorgefunden werden. Es gibt Hinweise darauf, dass in der T-Zell-Rezeptor abhängigen Signaltransduktion die Assoziationskinetik des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Peptid-Komplex ein Haupteinflussfaktor für die Aktivität der T-Zellen ist [Gonzalez 2005]. Die Messungen im Flusssystem würden es ermöglichen, offenen Fragen in einem Versuchsaufbau, wie dem hier verwendeten, zu klären.

Des weiteren eignen sich die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse für einen parallelisierten RIfS-Aufbau. Dadurch könnten die Fehler, die durch die sequenzielle Messung der RIfS-Transducer bei den Zellexperimenten hervorgerufen wurden, deutlich reduziert werden. Ein paralleles RIfS-Set-Up ist auch hinsichtlich eines Imaging bei Zellarrays ein wichtiger Aspekt.

Bei der Diagnostik von Zöliakie über die aktiven Epitope ist ein paralleles RIfS für eine Anwendung der Technologie in der Medizin sogar notwendig.

Sowohl die Untersuchungen der Protein-Protein-Wechselwirkung von Signalmolekülen als auch die Kopplung von RIfS mit der Massenspektrometrie, werden für eine breitere Anwendung der Biologischen Interaktionsanalyse (BIA) durch RIfS in der Proteomanalyse beitragen.

6. Literatur

- Abraham, R. T.; Weiss, A. *Nature Reviews Immunology*, **2004**, 4, 301-308.
- Aebersold, R.; Mann, M. *Nature*, **2003**, 422-198-207.
- Alarcon, B.; Gil, D.; Delgado, P.; Schamel, W. W. *Immunol. Rev.*, **2003**, 191, 38-46.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.
Molekularbiologie der Zelle, **1997**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Arentz-Hansen, H.; McAdam, S. N.; Molberg, O.; Fleckenstein, B.; Lundin, K. E. A.;
Jorgensen, T. J. D.; Jung, G.; Roepstorff, P.; Sollid L.M. *Gastroenterology*,
2002, 123, 803-809.
- Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A. N.; Bycroft, B. W. *Biochem.
Biophys. Research Comm.*, 1981, 101(2), 632-638.
- Beckey, H D. *Principle of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*,
1977, Pergamon Press, Oxford.
- Bergmann, L.; Schäfer, C.; Niedrig, H. (Hrsg.) *Lehrbuch der Experimentalphysik –
Band 3: Optik*, **1993**, 9. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Brecht, A.; Gauglitz, G.; Nahm, W. *Analisis*, **1992**, 20(3) 135-140.
- Brenner, S. L.; Korn, E. D. *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255(3), 841-844.
- Casella, J. F.; Flanagan, M. D.; Lin, S. *Nature*, **1981**, 293(5830), 302-305.
- Chai, J.; Tarnawski, A. S. *J. Physiol. Pharmacol.*, **2002**, 53, 147-157.
- Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R.
M.; *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 1145-1155.
- Christensen, U.; Jacobsen, N.; Rajwanshi, K. V.; Wengel, J.; Koch, T. *Biochem. J.*,
2001, 354, 481-484.
- Ciclitira, P.; Evans, D.; Fagg, N. L. K.; Lennox, E. S., Bowling, R. H. *Clin. Sci.*,
1984, 66, 357-364.

- Cotter, R. J. Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications to Biological Research, **1997**, Am. Chem. Soc., Washington D.C.
- Dietrich, W.; Ehnis, T.; Bauer, M.; Donner, P.; Volta, U.; Riecken, E.O.; Schuppan, D. Nature Med., **1997**, 3, 797-801.
- Doroshenko, V. M.; Cotter, R. J. J. Mass Spectrom., **1998**, 33, 305-318.
- Edelstein, N. G.; Caterall, W. A.; Moon, R. T. Biochemistry, **1988**, 27, 1818-1822.
- Fenselau, C. Anal. Chem., **1997**, 69, 661-665.
- Fleckenstein, B.; Molberg, O.; Qiao, S.; Schmid, D.G.; Mülbe, F. v. d.; Elgstoen, K.; Jung, G.; Sollid, L. M. J. Biol. Chem., **2002**, 277, 34109-34116.
- Fowles, G. R. Introduction to Modern Optics, **1989**, Second Edition, Dover Publications, New York.
- Gauglitz, G.; Nahm, W. Fresenius Z. Anal. Chem., **1991**, 341, 279-283.
- Gauglitz, G.; Opto-chemical and opto-immuno sensors, in Baltes, H.; Göpel, W.; Hesse, J. (Hrsg); Sensors Update, **1996**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Gillis, S.; Watson, J.; Biochemical. J. Exp. Med. **1980**, 152(6), 1709-1719.
- Goldsmith, M. A.; Weis, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1987**, 84, 6879-6883.
- Goldsmith, M.A.; Bockenstedt, L. K.; Dazin, P.; Weiss A. Adv. Exp. Med. Biol. , **1989**, 254, 25-33.
- Gonzalez, P. A.; Carreno, L. J.; Coombs, D.; Mora, J. E.; Palmieri, E.; Goldstein, B.; Nathenson, S. G.; Kalergis, A. M. Proc Natl Acad Sci U S A., **2005**, 102(13), 4824-4829.
- Greenberg, M. E.; Ziff, E. B. Nature, **1984**, 311, 433-438.
- Hailey, D. W.; Davis, T. N.; Muller, E. G. D. Meth. Enzymology, **2002**, 351, 34-49.
- Halstensen, T. S.; Scott, H.; Fausa, O.; Brandtzaeg, P. Scand. J. Immunol., **1993**, 581-590.
- Hassler, M.; Richmond, T. J.; EMBO Journal, **2001**, 20 (12), 3018-3028.

- Hecht, E. Optik, **2002**, 4. Auflage, Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Heidenreich, O.; Neining, A.; Schratt, G.; Zinck, R.; Cahill, M. A.; Engel, K.; Kotlyarov, A.; Kraft, R.; Kostka, S.; Gaestel, M.; Nordheim, A. J. Biol. Chem., **1999**, 274(20), 14434-14443.
- Hendrix, C.; Rosenmayer, H.; Verheggen, I.; Seela, F.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. Nucleic Acids Res., **1996**, 24, 2966-2973.
- Hill, P. G.; Forsyth, J. M.; Semeraro, D.; Holmes, G. K. T. Scand. J. Gastroenterol., **2004**, 11, 1078-1082.
- Hillenkamp, F.; Ehring, H. Mass Spectrometry in the Biological Science: A Tutorial, **1992**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. Anal. Chem., **1991**, 63, 1193-1203.
- Huang, Y.; Wange, R. L. J. Biol. Chem., **2004**, 279(28), 28827-28830.
- Hyoungsik, K.; Junho, L.; Chinho, P.; J. Korean Physical Society, **2002**, 41 (3), 395-399.
- Ingham, K. C.; Brew, S.; Vaz, D.; Saunder, D. N.; McGavin, M. J. J. Biological Chem., **2004**, 279(41), 42945-42953.
- Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomik, M. Immunologie, **2002**, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Johannsen, F. E.; Prywes, R. Mol. Cell Biol., **1994**, 14, 5920-5928.
- Jung, A.; Stemmler, I.; Brecht, A.; Gauglitz, G. Fres. J. Anal. Chem., **2001**, 371(2), 128-136.
- Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc., **1987**, 78, 53-68.
- Karas, M.; Hillenkamp, F. Advances in Mass Spectrometry, **1989**, Ed. Longevialle, P., Heyden & Sohn, London.

- Köhler, K.; Lellouch, A. C.; Vollmer, S.; Stoevesandt, O.; Hoff, A.; Peters, L.; Rogl, H.; Malissen, b.; Brock, R. *Chembiochem.*, **2005**, 6(1), 152-161.
- Koshkin, A. A.; Nielsen, P.; Meldegaard, M.; Rajwanshi, V. K.; Singh, S. K.; Wengel, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998a**, 120, 13252-13253.
- Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V.K.; Kumar, R.; Meldgaard, C. E.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron*, **1998b**, 54, 3607-3630.
- Krauss, G.; Gauglitz, G. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992**, 344, 153-157.
- Kröger, K. Dissertation, Universität Tübingen, **2003**.
- Kröger, K.; Bauer, J.; Mülbe, F. v. d.; Fleckenstein, B.; Rademann, R.; Jung, G.; Gauglitz, G. *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, 17, 937-944.
- Kühlmann, U. C.; Kleanthous, C.; James, R.; Moore, G. R.; Henning, A. M. *Acta Cryst.*, **1999**, D55, 256-259.
- Kumpf, M. Dissertation, Universität Tübingen, **2005**.
- Kurreck, J.; Wyszjo, E.; Gillen, C.; Erdmann, V. A. *Nuc. Acids Research*, **2002**, 30(9), 1911-1918.
- Kusnezow, W.; Jacob, A.; Walijew, A.; Diehl, F.; Hoheisel, J. D.; *Proteomics*, **2003**, 3(3), 254-264.
- Lane, C. S. *Cell. Molecular Life Sci.*, **2005**, 62(7-8), 848-869.
- Larson, H. J.; Bentin, T.; Nielson, P. E. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 159-166.
- Lazo, P. S.; Dorfman, K.; Noguchi, T.; Mattei, M. G.; Bravo, R. *Nuc. Acids Res.*, **1992**, 20, 343-350.
- Lee, K. H.; Dinner, A. R.; Tu, C.; Campi, G.; Raychaudhuri, S.; Varma, R.; Sims, T. N.; Burack, W. R.; Wu, H.; Wang, J.; Kanagaea, O.; Markiewicz, M.; Allen, P. M.; Dustin, M. L.; Chakraborty, A. K. Shaw, A.S. *Science*, **2003**, 302, 1218-1222.

- Ling, Y.; Lakey, J. H.; Roberts, C. E.; Sharrocks, A. D. *EMBO J.*, **1997**, 16(9), 2431-2440.
- Lipsky, R.H.; Mazzanti, C. M.; Rudolph, J. G.; Xu, K.; Vyas, G.; Bozak, D.; Radel, M. Q.; Goldman, D. *Clin. Chem.*, **2001**, 47, 635-644.
- Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 5076-5080.
- Löffler, G.; Petrides, P. E.; *Biochemie und Pathobiochemie*, **1997**, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio.
- Lottspeich, F; Zorbach, H. (Hrsg.) *Bioanalytik*, **1998**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Macfarlane, R.D.; Torgerson, D. F. *Science*, **1976**, 191, 920-925.
- Mäki, M.; Collins, P. *Lancet*, **1997**, 249, 1755-1759.
- Malissen, B. *Immunol. Rev.*, **2003**, 191, 7-27.
- Mash, S. G. *Tissue Antigens*, **2000**, 55(6), 571-572.
- McTigue, P. M.; Peterson, R.J. ; Kahn, J. D. *Biochemistry*, **2004**, 43, 5388-5405.
- Mehlmann, M. Dissertation, Universität Tübingen, **2003**.
- Mehlmann, M.; Garvin, A. M.; Steinwand, M.; Gauglitz, G.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382(8), 1942-1948.
- Molberg, O.; McAdam, S. N.; Korner, R.; Quarsten, H.; Kristiansen, C.; Madsen, L.; Fugger, L.; Scott, H.; Noren, O.; Roepstorff, P.; Ludin, K. E. A.; Sjoström, Sollid, L. M. *Nature Med.*, **1998**, 4, 713-717.
- More, J. J.; in *Lecture notes in mathematics 630*, ed. G.A. Watson (Springer Verlag), **1997**, 105-116.
- Mülbe von der, F. Dissertation, Universität Tübingen, **2001**.
- Mutschler, T. Dissertation, Universität Tübingen, **2004**.
- Nakatani, K.; S. Sando, S.; Saito, I. *Nat. Biotech.*, **2001**, 19(1), 51-5.

- Nielsen, K. E. ; Singh, S. K.; Wengel, J.; Jacobsen, J. P. *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11, 228-238.
- Nielsen, K. E.; Rasmussen, J.; Kumar, R.; Wengel, J.; Jacobsen, J. P.; Petersen, M. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 449-457.
- Osborn, M. and Weber, K.; *Meth. Cell Biol.*, **1982**, 24, 97-132.
- Parsey, M. V.; Lewis, G. K. *J. Immunol.*, **1993**, 151(4), 1881-1893.
- Perez-Albuerne, E. D.; Schattenman, G.; Sanders, L. K.; Nathans, D. *Reoc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 11960-11964.
- Piehler, J. Dissertation, Universität Tübingen, **1997**.
- Piehler, J.; Brecht, A.; Giersch, T.; Hock, B.; Gauglitz, G.; *J. Immun. Meth.*, **1997**, 201, 189-206.
- Piehler, J.; Brecht, A.; Giersch, T.; Kramer, K.; Hock, B.; Gauglitz, G. *Sensors Actu. B*, **1997**, 38-39, 432-437.
- Pitcher, L. A.; van Oers, N. S. *Trends Immunol.*, **2003**, 554-560.
- Pröll, F.; Möhrle, B.; Kumpf, M.; Gauglitz G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382(8), 1889-1894.
- Richards, F. M. *Meth. in Enzymol.*, **1990**, 184, 3-4.
- Rothmund, M.; Schütz, A.; Brecht, A.; Gauglitz, G.; Berthel, G.; Gräfe, D. *Fres. J. Anal. Chem.*, **1997**, 359, 15-22.
- SantaLucia, J. Jr.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, 17, 95 (4), 1460-1465.
- Sauer, S.; Brecht, A.; Charisse, K.; Maier, M.; Gerster, M.; Stemmler, I.; Gauglitz, G.; Bayer, E. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(14), 2850-2857.
- Schmitt, H. M.; Brecht A.; Piehler, J.; Gauglitz, G. *Biosens. Bioelectron.*, **1997**, 12, 809-816.
- Shumaker-Parry, J. S.; Aebersold, R.; Campbell, C. T. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(7), 2071-2082.

- Silano, M.; De Vincenzi, M. *Nahrung*, **1999**, 43(3), 175-184.
- Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Comm.*, **1998a**, 4, 455-456.
- Singh, S.; Wengel, J. *Chem. Comm.*, **1998b**, 12, 1247-1248.
- Sollid, L. M. *Annu. Rev. Immunol.*, **2000**, 18, 53-81.
- Stemmler, I.; Dissertation Universität Tübingen, **1999**.
- Strauss, D. B.; Weiss, A.; *Cells*, **1992**, 70(4), 585-592.
- Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, T.; Yoshida, T. *Rapid Comm. Mass Spectrom*, **1988**, 60, 2299.
- TIM, Thiemes Innere Medizin, **1999**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Treisman, R. *Cell*, **1986**, 46, 567-577.
- Tyers, M.; Mann, M. *Nature*, **2003**, 422, 193-197.
- Ugozzoli, L. A.; Latorra, D.; Pucket, R.; Arar, K., Hamby, K. *Anal. Biochemistry*, **2004**, 324, 143-152.
- Van Wauwe, J. P.; De Mey, J. R.; Goossens, J. G. *J. Immunol.*, **1980**, 124, 2708-2713.
- Venter, C. J. et al. *Science*, **2001**, 291, 1304-1351.
- Vester, B.; Wengel, J. *Biochemistry*, **2004**, 43(12), 13233-13241.
- Wange, R. L.; Samelson, L. E. *Immunity*, **1996**, 5, 197-205.
- Watson, J. D.; Crick F. H. C. *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- Weiss, A.; Wiskocil, R. L.; Stobo, J. D. *J. Immunol.*, **1984**, 133(1), 123-128.
- Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M. *Fenn, J. B. Anal. Chem.*, **1985**, 57, 675-679.
- Yang, S. H.; Shore, P.; Willingham, N.; Lakey, J. H.; Sharrocks, A. D. *EMBO J.*, **1999**, 18, 5666-5674.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

A	Adenin, Nukleotid
ACA	Atrazincapronsäure
AMD	Aminodextran
C	Cytosin, Nukleotid
CD	Cluster of Differentiation
CD28	Membranprotein in der Zellmembran von T-Zellen
CD3	Membranprotein, das mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist
CDR	complementary determining regions
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
G	Guanin, Nukleotid
GOPTS	(3-Glycidylpropyl)trimethylsiloxan
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MHC	Major Histocompatibility Complex
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Faktor
T	Thymin, Nukleotid
TCF	<u>T</u> ernary <u>C</u> omplex <u>F</u> actor
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _m	Schmelzpunkt komplementärer Polynukleotidketten (Melting Temperature)
TOF	Time-Of-Flight Massenanalysator
UV	Ultraviolett, Wellenlängenbereich des Spektrums

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Publikationen

C. Köhle, B. Möhrle, P. A. Münzel, M. Schwab, D. Wernet, O. A. Badary, K. W. Bock: *Frequent co-occurrence of TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (UGT1A1*28) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (UGT1A6*2 and UGT1A7*3) in Caucasians and Egyptians*, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 65, 1521-1527.

B. Möhrle, J. Bauer, D. Fröhlich, K. Kröger, G. Jung, G. Gauglitz: *Markierungsfreies High Throughput Screening (MF-HTS) von Protein-Ligand Wechselwirkungen für die klinische Diagnostik und pharmazeutische Wirkstoffsuche*, 6. Dresdner Sensor Symposium, 2003, ISBN 3-935712-92-8, 255-258.

F. Pröll, B. Möhrle, M. Kumpf, G. Gauglitz: *Label free Characterisation of Oligonucleotide Hybridisation using Reflectometric Interference Spectroscopy*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382(8) 1889-1894.

B. P. Möhrle, M. Kumpf, G. Gauglitz: *Determination of affinity constants of Locked Nucleic Acid (LNA) and DNA duplex formation using label free sensor technology*, *Analyst*, 2005, 130, 1634-1638.

B. P. Möhrle, K. Köhler, J. Jaehrling, R. Brock, G. Gauglitz: *Label free Characterisation of Cell adhesion using Reflectometric Interference Spectroscopy (RIFS)*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384, 407-413.

7.2.2 Poster

B. Möhrle, C. Köhle, K. W. Bock, M. Schwab, D. Wernet, J. Tomiuk, P. A. Münzel: *Rapid Analysis of UDP-Glucuronosyltransferase Polymorphisms using Real-time PCR*, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 2002.

B. Möhrle, J. Bauer, D. Fröhlich, K. Kröger, G. Jung, G. Gauglitz: *Markierungsfreies High Throughput Screening (MF-HTS) von Protein-Ligand Wechselwirkungen für die klinische Diagnostik und pharmazeutische Wirkstoffsuche*, 6. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, 2003.

B. Möhrle, M. Kumpf, D. Werth, O. Mader, O. Heidenreich, G. Gauglitz: *Label free and time resolved detection of binding of Serum Response Factor (SRF) to a B-box like peptide with reflectometric interference spectroscopy (RIfS)*, BioPerspectives 2005, Mainz, 2005.

7.2.3 Vorträge

B. Möhrle: *Reflektometrische Interferenzspektroskopie zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen, Epiotopmapping*, Immunanalytik-Tag, Sartorius College, Göttingen, 2003.

B. Möhrle, M. Kumpf, J. Jaehrling, F. Pröll, G. Gauglitz: *Analytical Features of an optical biosensor based on Reflectometric Interference Spectroscopy (RIfS)*, BIO TEC'2004, Oviedo, Spanien, 2004.

B. Möhrle, K. Köhler, R. Brock, G. Gauglitz: *Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von T-Zellen durch Reflektometrische Interferenzspektroskopie*, Deutsches Biosensor Symposium, Regensburg, 2005.

B. Möhrle, M. Kumpf, S. Buckenmaier, A. Jakob, G. Gauglitz: *Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) auf Indium-Zinn-Oxid-(ITO) Schichten zur Kopplung mit der MALDI Massenspektrometrie*, ANAKON, Regensburg, 2005.

B. Möhrle, J. Bauer, D. Fröhlich, K. Kröger, G. Jung, G. Gauglitz: *Markierungsfreies High Throughput Screening (MF-HTS) von Protein-Ligand Wechselwirkungen für die klinische Diagnostik und pharmazeutische Wirkstoffsuche*, 6. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, 2005.

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, H. Bisswanger, K. W. Bock, P. Bohley, U. Breyer-Pfaff, A. Buchmann, M. Duszenko, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, G. Gauglitz, P. Grabmayr, P. Grathwohl, H. Günzl, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, B. Hamprecht, F. Hasselbach, V. Hoffmann, R. Hübener, F. Iglauer, W. Jäger, G. Jung, E. Kaiserling, G. Kissling, B. Kotchoubey, K.-A. Kovar, D. Krug, H. Liebich, E. Lindner, F. Madeo, J. Maier, D. Mecke, P. Münzel, W. Nakel, H. Oberhammer, E. Pfaff, W. Pfeiffer, O. Pommer, H. Probst, H.-G. Rammensee, R. Reuter, K. Reutter, H.-J. Reinecke, H. Schott, M. Schröder, V. Schurig, M. Schwarz, B. Spitzer, J. Strähle, H.-J. Wagner, U. Weber, K. Wegmann, J. Werringloer, U. Weser, W. Wohlleben

7.4 Lebenslauf

Name:	Bernd Peter Möhrle
Geburtsdatum:	2. August 1973
Geburtsort:	Heidelberg
Schulische Ausbildung:	1980-1984 Grundschulen Schwäbisch Hall und Korb 1984-1993 Hohenstaufen-Gymnasium Göppingen
Berufliche Ausbildung:	1993-1995 Ausbildung zum Finanzassistent/Banken Volksbank Göppingen eG. 1995-1996 Tätigkeit in der Kreditabteilung
Studium:	1996-2002 Biochemie Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1998-2000 Medizin Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Diplomarbeit:	September 2001 – April 2002 Unter Anleitung von Prof. Dr. K. W. Bock und PD Dr. P. A. Münzel am Institut für Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. „FRET-Technologie (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zur Analyse von Polymorphismen der UDP-Glucuronosyltransferasen UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7“
Promotion:	Mai 2002 - Januar 2006 Unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. „Markierungsfreie Untersuchung biochemischer Erkennung und die Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von Zellen im Flusssystem“