

Kinetische Analyse von Peptidarrays mittels bildgebender Reflektometrischer Interferenzspektroskopie

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologin (t.o.) Barbara Schwarz
aus Nürnberg

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	02.06.2015
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Günter Gauglitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Weimar

Für Ella

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Günter Gauglitz bedanken. Ich danke für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Möglichkeiten meine Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen präsentieren zu können.

Herrn Professor Dr. Udo Weimar danke ich sehr herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Einige der hier vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen des Projekts „Peptidbibliotheken“ erzielt. Ich möchte mich deshalb bei der Baden-Württemberg Stiftung für die finanzielle Förderung des Projekts bedanken. Den Kooperationspartnern, namentlich PD Dr. Ralf Bischoff am DKFZ, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der FLAG-Arrays. Bei Dr. Günther Proll bedanke ich mich für die Begleitung des Projekts auf Seiten des Arbeitskreises.

Der Arbeitsgruppe, mit allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern, möchte ich herzlich für die sehr gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Sie hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Peter Fechner, Dr. Goran Markovich, Dr. Florian Pröll danke ich für die fachlichen Diskussionen, die Einführung und Unterstützung mit dem iRiFS-System und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Jochen Mehne möchte ich mich sehr für die Einführung in die Präparation der Transducer und die Bedienung der RiFS-Anlagen bedanken. Auch seine Geduld und Zeit beim „trouble shooting“ der Anlagen soll nicht unerwähnt bleiben.

Dipl. Chem. Johannes Riedt danke ich sehr für die schnelle, zuverlässige Erledigung aller formellen Angelegenheiten und seine Geduld wiederholt zu erklären, wohin welches farbige Bestellformular zu bringen ist.

Mein Dank gilt auch Dr. Lothar Leidner und Thomas Laue für ihre Unterstützung bei der Matlab-Programmierung.

Dr. Katrin Krieg danke ich für ihre Begleitung zur „Eurosensors“-Tagung und die schönen und interessanten Tage in Linz.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen (ehemaligen) Bürokolleginnen Dr. Nina Schweizer, Dr. Melanie Ewald und Dipl. Chem. Julia Widmaier für die freundschaftliche Atmosphäre, die Gespräche wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Art, sowie für die Motivation, wenn zwischendurch nichts vorwärts zu gehen schien.

Dr. Alexander LeBlanc danke ich für die schönen und kulinarisch sehr vielfältigen Abende.

Ein grosses Dankeschön gilt auch meinem privaten Freundeskreis für die langjährigen Freundschaften, die schönen gemeinsamen Erlebnisse, die mir immer wieder Rückhalt und Kraft geben.

Besonders zum Gelingen dieser Arbeit hat meine Familie beigetragen. Meinem Mann Thomas Laue danke ich für seine Unterstützung und den Rückhalt während der Zeit des Studiums und der Dissertation.

Meiner Tochter Ella danke ich sehr, dass sie mir immer wieder zeigt, was wichtig ist im Leben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Vertrauen in allen Lebenslagen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Zielsetzung	3
2	Theoretischer Teil	5
2.1	Immunologische Grundlagen	5
2.1.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem	5
2.1.2	Zellen der spezifischen Immunabwehr	5
2.1.3	Antikörper	6
2.1.4	Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems bei einer spezifischen Immunabwehr	7
2.1.5	Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Stoffen	8
2.1.6	Autoimmunität	8
2.1.7	Zöliakie	9
2.2	Biomolekulare Wechselwirkungen	10
2.3	Biomolekulare Interaktionsanalyse	11
2.3.1	Kinetisch kontrollierte Reaktion	12
2.3.2	Diffusionskontrollierte Reaktion	15
2.4	Optische Grundlagen	17
2.4.1	Wechselwirkungen von Licht mit Materie	17
2.4.2	Elektromagnetischen Wellen an Grenzflächen	18
2.4.3	Reflexion an dünnen Schichten	19
2.4.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	21
2.4.5	Weiterentwicklungen der Reflektometrische Interferenzspektroskopie	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	25
3.1.2	Verbrauchsmaterial	27
3.1.3	Geräte	28
3.1.4	Transducer	28
3.1.5	Software	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Oberflächenpreparation	29
3.2.2	Immobilisierung von biotinylierten Peptiden	31
3.2.3	Spotting	32

3.2.4	Proteinlabeling mit Cy5	34
3.2.5	OnChip Peptidsynthese	34
3.2.6	Messungen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie . .	35
3.2.7	Imaging Reflectometric Interfererence Spectroscopy (iRIfS)	36
3.2.8	RIfS und iRIfS Messungen	36
3.2.9	Datenaufbereitung der iRIfS-Messungen	36
3.2.10	Auswertung der kinetischen Messungen	37
4	Ergebnisse und Diskussion	39
4.1	Oberflächenchemie und Peptid-Immobilisierung	39
4.1.1	Peptid-Immobilisierung	40
4.1.2	Vergleich verschiedener Polymere	42
4.1.3	Spezifität der Anbindung	44
4.2	Wahl der geeigneten Transducer für das iRIfS-System	46
4.2.1	Simulation der Reflektivitätsänderung in Abhängigkeit der Schicht- dicke	46
4.2.2	Experimentelle Untersuchung zur Eignung von Goetheglas als Trans- ducermaterial und Vergleich mit RIfS-Glas	47
4.3	Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation	50
4.3.1	Test verschiedener Spottingbedingungen für das Modellprotein BSA	52
4.3.2	Test verschiedener Spottingbedingungen für das Modellprotein Strep- tavidin	57
4.4	Auswahl geeigneter Messbedingungen zur kinetischen Analyse	63
4.4.1	Einfluss der Flusszellegeometrie	63
4.4.2	Einfluss der Flussgeschwindigkeit und Oberflächenkonzentration des Peptids, sowie der Antikörperkonzentration in Lösung	67
4.5	Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems	70
4.5.1	Variation des Auswertebereichs zur Anpassung der scheinbaren Ratenkonstante	74
4.5.2	Auswertung der kinetischen Messungen	75
4.5.3	Globaler Fit zur Anpassung der Assoziationsratenkonstante	82
4.5.4	Sequentielle kinetische Messungen	83
4.6	Entwicklung und Test einer halbautomatisierten Software	87
4.6.1	Überblick über die einzelnen Auswerteschritte der Software	89
4.6.2	Beeinflussung der scheinbaren Ratenkonstante über die Auswahl der Intervallbreite und dessen Lage	102
4.6.3	Vergleich der Daten aus der halbautomatisierten Software und Origin107	
4.7	Kinetische Analyse des FLAG-Epitops	109
4.7.1	Auswahl einer zur Messung und Auswertung geeigneten Wellenlänge	109
4.7.2	Analyse des FLAG-Systems	112
5	Zusammenfassung und Ausblick	119
	Literaturverzeichnis	121

6	Anhang	131
6.1	Abkürzungen	131
6.2	Veröffentlichungen	132
6.2.1	Publikationen	132
6.2.2	Sonstige Publikationen	132
6.2.3	Vorträge	133
6.2.4	Poster	133
6.3	Akademische Lehrer	133

1 Einleitung

1.1 Motivation

In lebenden Organismen beruhen wesentliche Prozesse auf der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Molekülen. Entsprechend spielt ihre Untersuchung in vielen biochemischen und medizinischen Fragestellungen eine große Rolle. Die Wechselwirkung von DNA-DNA oder DNA-RNA Molekülen wird beispielsweise in Genexpressionsstudien (Sotiriou u. a., 2003) untersucht. Auch der Nachweis von Viren (Ranki u. a., 1983) und Bakterien (Polsky-Cynkin u. a., 1985), sowie der Nachweis von Antibiotikaresistenzen bei Krankheitserregern (Polsky-Cynkin u. a., 1985) beruht auf der Wechselwirkung von Nucleinsäuren. Zur Aufklärung von Signaltransduktionswegen in Zellen, der Erforschung von Krankheitsmechanismen bei Krebs (Taylor u. a., 2009) oder Auto-Immunkrankheiten werden Protein-Protein oder Protein-DNA Wechselwirkungen untersucht.

Aus dem Wunsch heraus, möglichst viele Interaktionen mit einem Versuch und geringen Probenmengen zu analysieren, entstand die Arraytechnologie. Sie erlaubt die parallele Analyse tausender Bindungsereignisse im zeitsparenden Hochdurchsatzverfahren. Die Miniaturisierung ermöglicht zudem den Verbrauch von Reagenzien zu reduzieren. Seit Mitte der 1980iger Jahre wurden DNA-Microarrays verstärkt im Rahmen verschiedener molekularbiologischer und genetischer Fragestellungen zu einem wichtigen Werkzeug der Genomforschung. Entsprechend stehen kommerzialisierte Systeme zur Verfügung (Heller, 2002).

Die Untersuchung von DNA-DNA-Wechselwirkungen hat den Vorteil, dass durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Technik zur Verfügung steht, die es erlaubt DNA einfach und in ausreichenden Mengen zu vervielfältigen. Die Herstellung oder Gewinnung von Proteinen in ähnlichen Mengen ist wesentlich komplexer. Für Proteine müssen meist individuell Methoden entwickelt werden, um sie in ausreichender Menge, Reinheit und nativer Form zu erhalten (Ramachandran u. a., 2005).

Anschließend müssen die Proteine in nativer Form auf die Arrayoberfläche aufgebracht werden. Dies ist durch die komplexe Chemie der Aminosäuren komplizierter, als bei Oligonucleotiden, die aus vier chemisch ähnlichen Nucleinsäuren bestehen. Zudem muss eine gute Zugänglichkeit des Proteins für den potentiellen Bindungspartner gewährleistet sein. Es gibt verschiedene Möglichkeiten diesen Herausforderungen zu begegnen. Eine Option ist die zellfreie *in situ* Herstellung von Proteinarrays. Hierbei werden die Proteine direkt an der Arrayoberfläche aus DNA hergestellt. Über einen Proteintag werden sie dort dann direkt immobilisiert. Die stabilen DNA-Arrays werden also erst bei Bedarf in Proteinarrays übersetzt (He u. a., 2008).

1 Einleitung

Eine andere Möglichkeit die komplexe Gewinnung von Proteinen zu umgehen, ist der Einsatz von Peptiden als Bindungspartner. Diese werden anstelle von kompletten Proteinen auf der Arrayoberfläche immobilisiert. Peptide sind, ähnlich wie DNA, leicht und reproduzierbar zu synthetisieren und bilden gewisse biologische Aktivitäten von Proteinen ab. Sie können außerdem gut modifiziert werden, das heißt es können z.B. auch posttranslationale Modifikationen eingeführt werden. Zudem sind sie meist stabiler als das native Protein (Hecker u. a., 2012). Dennoch weisen sie zum Teil eine geringere Affinität oder Spezifität zu Ihrem Zielprotein auf (Cretich u. a., 2006). Erkennt das Zielprotein keine lineare Sequenz des immobilisierten Partners, sondern in der Raumstruktur des Partners nahe zusammen liegende Aminosäuren, kann eine solche Interaktion nicht so einfach über Peptidarrays nachgebildet werden. Je nach Fragestellung sind somit Protein- oder Peptidarrays geeigneter, so dass beide Techniken ergänzend angewendet werden können (Hecker u. a., 2012). Im Folgenden soll kurz auf die Anwendung von Peptidarrays in verschiedenen Fragestellungen eingegangen werden.

Peptidarrays haben ein weites Anwendungsfeld in der Immundiagnostik. Lorenz et. al analysieren mit Hilfe von Peptidarrays Epitopsignaturen von IgG Autoantikörpern aus humanen Seren zur Diagnostik von Autoimmunkrankheiten (Lorenz u. a., 2009). Cerecedo et al. detektieren Epitope von Milchallergenen zur Diagnostik und Erforschung von Allergien (Cerecedo u. a., 2008). Auch können Peptidarrays zur Diagnostik von Infektionskrankheiten angewendet werden. Duburcq et al. weisen Pathogeninfektionen von verschiedenen Viren mittels eines Peptidarrays nach (Duburcq u. a., 2004). Bei nicht bekanntem Antigen des Erregers kann auch versucht werden, spezifische Markersignaturen über randomisierte Peptidbibliotheken zu erhalten (Bongartz u. a., 2009). Generell kann jeder physiologische Zustand, in dem die humorale (Antikörper vermittelte) Immunantwort beeinflusst wird, mit Hilfe von Peptidarrays analysiert werden (Lorenz u. a., 2009). Ahmed et al. untersuchten über einen Peptidarray die spezifische Interaktion von Krebszellen mit bestimmten Peptiden. Diese spezifischen Peptide könnten im weiteren Verlauf dazu verwendet werden, Medikamente zielgerichtet zu den Tumorzellen zu bringen und somit helfen, unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren (Ahmed u. a., 2010). Eine weitere Anwendung von Peptidarrays sind Peptid-Proteininteraktionsstudien. In der Biologie findet Kommunikation meist über Molekülinteraktionen statt. Zum Teil binden Proteine an konservierte Domänen wie *kringel*, SH2, SH3 etc. Dann kann es interessant sein, neue Bindungspartner zu erforschen (Bialek u. a., 2003, Stoevesandt u. a., 2005) oder bei bekannten Bindungspartnern die genaue Bindungsdomäne festzulegen und so detaillierte Informationen auch über alternative Signalwege zu bekommen (Maddala u. a., 2011).

In den meisten bisher genannten Arbeiten findet der Nachweis der Peptid-Interaktionspartner mittels optischer Detektionsmethoden über fluoreszenzmarkierte Interaktionspartner statt. In einem kleineren Teil der Arbeiten kommen auch markierungsfreie, meist optische Nachweismethoden wie Oberflächenplasmonresonanz (SPR) zum Einsatz (Fisher u. a., 2003, Pope u. a., 2009, Greving u. a., 2010). Diese markierungsfreien Methoden

haben im Vergleich zu den fluoreszenzbasierten Methoden den Vorteil, dass der Interaktionspartner nicht fluoreszenzmarkiert sein muss, beziehungsweise kein weiterer fluoreszenzmarkierter Antikörper zur Detektion der Bindung notwendig ist. Dies reduziert den Aufwand in der experimentellen Vorbereitung und der Durchführung und reduziert Kosten. Zudem wird vermieden, dass durch das Anbringen von Fluoreszenzmarkern am Interaktionspartner die Bindung zwischen Antikörper und Peptid beeinflusst wird.

Mit markierungsfreien, optischen Methoden können außerdem zeitaufgelöste Messungen durchgeführt werden. Diese erlauben die kinetische Analyse einer Interaktion zweier Bindungspartner. Bei fluoreszenzmarkierten Methoden wäre dabei die Photostabilität des Farbstoffs zu berücksichtigen, deshalb wird mit diesen Methoden oft nur die Affinität zweier Interaktionspartner bestimmt. Jedoch reicht diese Information meist nicht aus, um den genauen Mechanismus der Bindung zu verstehen. Diese Information erschließt sich oft nur durch die Kenntnis der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante, das heißt der Kinetik der Reaktion (Greving u. a., 2010). Zudem können Antikörper zwar die gleiche Affinitätskonstante aufweisen, sich aber deutlich in ihren Ratenkonstanten unterscheiden. Dies kann in medizinisch/pharmazeutischen Fragestellungen von großer Bedeutung sein (Hearty u. a., 2012, Steckbeck u. a., 2005).

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur kinetischen Analyse verschiedener Peptid-Antikörperinteraktionen mittels bildgebender Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (iRIfS). Es wurden zwei Interaktionspaare untersucht. Zum einen die Wechselwirkung zwischen Peptiden aus dem Enzym Gewebstransglutaminase und einem monoklonale Anti-Transglutaminaseantikörper, zum anderen die Wechselwirkung zwischen zum Teil modifizierten Peptiden des FLAG-Epitops und einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper.

Für das Transglutaminasesystem wurde als erstes eine zur Immobilisierung der Peptide geeignete Oberflächenchemie ausgewählt und die optimalen Spottingbedingungen zur ortsaufgelösten Immobilisierung der Peptide ermittelt. Im Nachfolgenden wurde das System in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Spezifität charakterisiert und die optimalen Bedingungen zur kinetischen Analyse der Peptid-Antikörper Wechselwirkungen untersucht.

Mit diesen Bedingungen wurden dann verschiedene kinetische Analysen durchgeführt und verschiedene Auswertestrategien für kinetische Konstanten verglichen. Es wurde eine Software zur halbautomatisierten Auswertung kinetischer Arrays entwickelt, mit welcher es möglich ist, den optimalen Fitbereich zur kinetischen Analyse festzulegen.

Die Leistungsfähigkeit des iRIfS-Systems und der Software wurde an einem weiteren Peptid-Antikörperinteraktionssystem, dem FLAG-antiFLAG-System untersucht. Das

1 Einleitung

FLAG-Epitop wird zum Beispiel in rekombinanten Proteinen als Proteintag eingesetzt. Seine Sequenz ist bekannt und die Interaktion mit dem monoklonalen Antikörper ist charakterisiert. Insofern eignet es sich, um die Leistungsfähigkeit des iRIS-Systems zu zeigen. Für das FLAG-Epitop wurde an verschiedenen Positionen der Sequenz ein Austausch der Aminosäuren durchgeführt. Dabei wurde die ursprüngliche Aminosäure gegen jede andere proteinogene Aminosäure ausgetauscht und der Einfluss der einzelnen Veränderungen auf die kinetischen und thermodynamischen Konstanten untersucht.

2 Theoretischer Teil

2.1 Immunologische Grundlagen

Im ersten Teil sollen allgemeine immunologische Grundlagen zusammengefasst werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf dem adaptiven Immunsystem. Im Weiteren soll dann kurz auf die Struktur und Funktion von Antikörpern eingegangen werden. Die Zusammenfassung der immunologischen Grundlagen erfolgte nach Murphy et al. (Murphy u. a., 2009).

2.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Die Immunabwehr eines Menschen ist ein komplex reguliertes System, das tagtäglich eine Vielzahl von Keimen und Erregern meist sehr effizient bekämpft. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und neutrophile Zellen nehmen Krankheitserreger an den Eintrittsorten auf und zerstören diese. Erst wenn diese primären Barrieren des Immunsystems zur Bekämpfung des Erregers nicht ausreichen, wird das sogenannte adaptive Immunsystem initialisiert. Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, eine sehr große Vielzahl von Antigenen spezifisch zu erkennen und ermöglicht so, eine effektive Bekämpfung verschiedenster Krankheitserreger. In einem genau reguliertem und vernetzten System werden dazu sehr spezifische T- und B- Lymphozyten gebildet. Beide Zellen haben klonal verteilte Antigenrezeptoren. Das heißt, dass sich die Antigenrezeptoren verschiedener T- und B-Zellklone in ihrer Spezifität unterscheiden. Somit steht ein außerordentlich großes Repertoire zur Erkennung verschiedenster Erreger zur Verfügung.

2.1.2 Zellen der spezifischen Immunabwehr

B- und T-Lymphozyten nehmen unterschiedliche Aufgaben wahr. Aktivierte B-Lymphozyten bilden lösliche Antikörper. Die von ihnen sezernierten Antikörper binden Erregerzellen, Erregerbestandteile oder von Erregern ausgeschiedene Toxine. B-Lymphozyten leisten einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von extrazellulären Bakterien.

T-Lymphozyten hingegen erkennen ihre Antigene durch membrangebundene T-Zellrezeptoren. Man unterscheidet T-Helferzellen, und cytotoxische T-Zellen. Die Aufgabe von T-Helferzellen ist es, die Immunantwort zu optimieren. Sie aktivieren und unterstützen B-Lymphozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems in der Bekämpfung von Erregern. Regulatorische T-Helferzellen supprimieren die Immunantwort. Dadurch wird die Immunantwort begrenzt. Außerdem schützen sie so den Körper vor Angriffen der

eigenen Immunreaktion. Die Hauptaufgabe von cytotoxischen T-Zellen ist das Abtöten von infizierten Zellen.

2.1.3 Antikörper

Struktur der Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, (siehe Abbildung 2.1) sind Y-förmige Proteine. Sie sind achsensymmetrische Heterotetramere und aus je zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten zusammengesetzt. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Innerhalb der Ketten können jeweils sogenannte Immunglobulinomänen differenziert werden. Die leichte Kette (engl. *light chain*) besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne (V_L und C_L), die schwere Kette (engl. *heavy chain*) aus einer variablen und drei konstanten Domänen (V_H und C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Enzymatisch kann der Antikörper an der Gelenkregion in zwei Fab-Fragmente (antigen-binding fragment) und das Fc-Fragment (crystallisable fragment) gespalten werden.

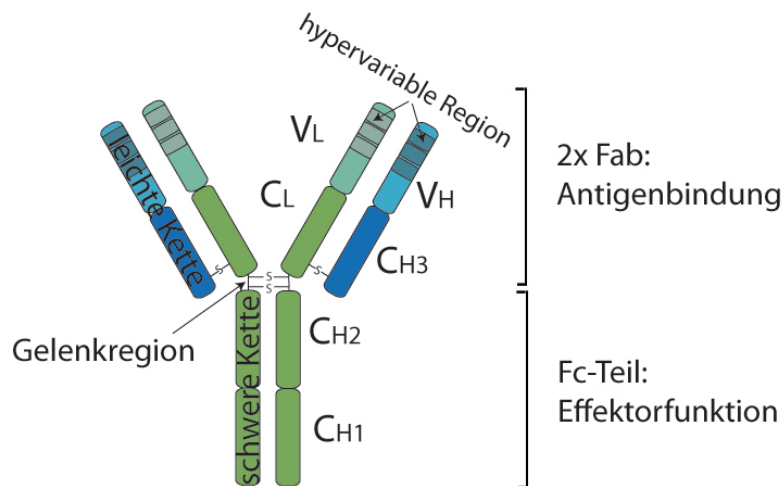


Abbildung 2.1: Struktur eines Antikörpers

Funktionen der Antikörper

Über diese beiden Fragmente werden die beiden wesentlichen Funktionen von Antikörpern vermittelt. Im Fab-Fragment findet die Antigenbindung statt. In jeder variablen Kette sind drei hypervariable Regionen lokalisiert. Zusammen bilden sie die Antigenbindestelle (Paratop) aus. Über sie findet die spezifische Wechselwirkung mit dem jeweiligen Antigen statt. Der vom Antikörper erkannte Molekülbereich wird Epitop genannt.

Der Fc-Teil mit den konstanten Ketten C_{H1} und C_{H2} hingegen, vermittelt die sogenannten Effektorfunktionen. Über diese Bereiche kommt es zur Wechselwirkung mit anderen

Teilen des Immunsystems. Die fünf verschiedenen Antikörper-Isotypen IgM, IgD, IgA, IgG und IgE unterscheiden sich in ihren Effektorfunktionen und ihrem Vorkommen im Körper. Dies ermöglicht eine effiziente Funktionsweise des Immunsystems.

Wirkung von Antikörpern

Sezernierte Antikörper wirken auf verschiedene Weise: Sie neutralisieren Antigene. Toxine können ihre Wirkung nicht mehr entfalten oder Erreger nicht mehr in Zellen eindringen. Desweiteren opsonieren sie Erreger und markieren sie so für die Aufnahme durch Fresszellen des angeborenen Immunsystems. Über verschiedene Wechselwirkungen können außerdem andere Mechanismen und Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden.

Antikörper in der Immundiagnostik

Die Bildung von spezifischen Antikörpern im Rahmen von Immunreaktionen wird zur Beantwortung diagnostischer Fragestellungen herangezogen. Serologische Tests prüfen auf das Vorhandensein eines bestimmten Antikörpers im Blut des Patienten. Mit diesen Tests können Infektionen nachgewiesen werden (Vaughn u. a., 1999, Haque u. a., 1993) oder der Impfstatus überprüft werden. Auch erlauben sie die Diagnose von Autoimmunerkrankheiten (Balboni u. a., 2006), Allergien und Hypersensitivitätserkrankungen (García Núñez u. a., 2012).

Die dabei gängigen Nachweisverfahren sind der Enzym-linked-Immunesorbent-Assay (ELISA) (van Zijderveld u. a., 1992) und der Immunoplot. Bei beiden Methoden wird das Antigen auf einer festen Trägeroberfläche immobilisiert. Beim ELISA erfolgt die Immobilisierung in Kavitäten von Mikrotiterplatten aus Polystyrol. Beim Immunoplot werden die Antigene auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Anschließend wird die Patientenprobe zugegeben. Falls spezifische Antikörper vorhanden sind, binden diese an das Antigen. Diese Wechselwirkung kann dann durch Zugabe eines markierten Detektionsantikörpers sichtbar gemacht werden.

2.1.4 Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems bei einer spezifischen Immunabwehr

Die Zellen der spezifischen Immunantwort müssen erkennen, dass Erreger in den Körper eingedrungen sind. Diese Aufgabe wird vor allem von den T-Zellen erfüllt. Fast alle Körperzellen präsentieren den cytotoxischen T-Zellen kurze Peptidfragmente des zellinternen Proteinrepertoires oder der, durch Phagozytose aufgenommenen, Zellumgebung. Die Präsentation erfolgt mit Hilfe von speziellen Molekülen, den MHC-Molekülen. MHC steht für *major histocompatibility complex*. Dieser Name deutet an, dass diese Moleküle eine Rolle bei der Transplantatverträglichkeit spielen.

Cytotoxische T-Zellen kontrollieren das interne Proteinexpressionsmuster von Zellen. Dieses ändert sich beispielsweise, wenn die Zelle von einem Virus befallen wurde. Präsentiert eine Zelle intrazelluläre Antigene, wird sie von den cytotoxischen T-Zellen ab-

getötet. Extrazelluläre Antigene werden nur von bestimmten Zellen des Immunsystems präsentiert, unter anderem auch von B-Zellen. Erkennen T-Helferzellen, dass eine B-Zelle ein extrazelluläres Antigen aufgenommen hat, wird die B-Zelle aktiviert. Dann produziert sie spezifische Antikörper, die eine effiziente Erregerabwehr ermöglichen.

2.1.5 Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Stoffen

Im Rahmen einer Immunantwort kommt es zu einem fein regulierten Zusammenspiel der verschiedenen Zellen. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Lymphozyten zwar körperfremde Stoffe erkennen, aber nicht mit körpereigenen Stoffen reagieren. Dies wird an verschiedenen Stellen im Entwicklungsprozess der Lymphozyten kontrolliert.

Die Mechanismen, welche während der Entwicklung von T- und B-Zellen im Thymus oder im Knochenmark wirken, werden als zentrale Toleranz bezeichnet. Mechanismen, die auf die reifen Zellen wirken, heißen entsprechend periphere Toleranz. Bei der T-Zellentwicklung im Thymus muss auf der einen Seite sicher gestellt werden, dass die T-Zelle mit den MHC-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen wechselwirkt, auf der anderen Seite dürfen körpereigene Strukturen nicht mit hoher Affinität erkannt werden. Nur Zellen, die diese beiden Kriterien erfüllen, verlassen den Thymus. Ähnliches geschieht bei der Entwicklung der B-Zellen. Erkennen die B-Zellen am Ende des Entwicklungsprozess körpereigene Antigene mit hoher Affinität, tritt die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) ein.

Trotz der Kontrollmechanismen bei der Entstehung der Zellen, kommt es zur Bildung autoreaktiver T- und B-Zellen. In der Peripherie müssen deshalb zur Aktivierung der Zellen weitere, sogenannte Kostimulationen erfolgen. Bei den T-Zellen spielen dabei Signalstoffe, die von den Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt werden, eine wichtige Rolle. B-Zellen benötigen zwei Signale zur Aktivierung. Sie müssen das Antigen über ihren B-Zellrezeptor erkennen und gleichzeitig T-Zellhilfe erhalten. Bei autoreaktiven Zellen fehlt die T-Zellhilfe. Durch diese Mechanismen soll sichergestellt werden, dass körpereigene Strukturen nicht angegriffen werden. Dennoch kann es vorkommen, dass diese Kontrollmechanismen versagen, dann kommt es zur Ausbildung von Autoimmunreaktionen (Schütt und Bröker, 2011).

2.1.6 Autoimmunität

Kennzeichnend für eine Autoimmunkrankheit sind Gewebsschäden, die durch eine adaptive Immunantwort gegen körpereigene Antigene ausgelöst werden. Die Entstehung von Autoimmunkrankheiten ist zum Teil noch Gegenstand aktueller Forschung. Nicht immer sind die Ursachen ihrer Entstehung bekannt. Dennoch gibt es verschiedene Einflussfaktoren, die ihre Ausbildung begünstigen.

Bei vielen Autoimmunkrankheiten lässt sich eine gewisse genetische Komponente feststellen. Sie betrifft oft Gene, die für Proteine codieren, die in einem Toleranzmechanismus eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Beseitigung und Präsentation von Antigenen. Auch verschiedene MHC-Gene sind mit einer bestimmten Prädisposition an einer

Autoimmunkrankheit zu erkranken, verknüpft. Autoimmunkrankheiten können B- und T-Zell basiert ausgelöst werden:

Im Rahmen einer Infektion kann es zur Entstehung oder Aktivierung von kreuzreaktiven B-Zellen kommen. Menschliche Zellen tragen zum Teil Oberflächenstrukturen, die denen von Erregern ähneln (molekulares Mimikry). Eine Reaktion gegen körpereigene Strukturen kann nun entstehen, wenn sich geringfügig selbstreaktive Lymphozyten in der Umgebung einer Infektion befinden. Dort sind erhöhte Konzentrationen an costimulierenden Molekülen vorhanden, die nun auch die geringfügig selbstreaktiven Zellen aktivieren und so eine Autoimmunantwort auslösen können.

Auch autoreaktive cytotoxische T-Zellen können im Rahmen einer Immunantwort aktiviert werden und körpereigene Zellen in den programmierten Zelltod schicken. Daneben bewirken überschießende Reaktionen von T-Helferzellen, dass Entzündungsreaktionen gegen körpereigene Strukturen ausgelöst werden. Die Reaktionen von Zellen des angeborenen Immunsystems führen dann zu Gewebsschäden.

2.1.7 Zöliakie

Zöliakie ist eine Erkrankung des Dünndarms. Sie wird durch eine Immunantwort gegen Gluten, dem Klebereiweiß aus Weizen, Roggen, Dinkel, Hafer und Gerste hervorgerufen. Die Krankheit hat eine starke genetische Komponente. 95% aller Erkrankten sind Träger eines MHC-Allels mit der Bezeichnung HLA-DQ2 (Murphy u. a., 2009):

Bei der Verdauung von Gluten entstehen verschiedene Peptide, die dann in die Schleimhaut aufgenommen werden. Dort werden die Peptide durch das Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) desaminiert und tragen nun negative Ladungen. Dadurch können die Peptide besonders gut an das HLA-DQ2 Molekül binden. Im Folgenden werden antigenspezifische T-Helferzellen aktiviert und dann auch entsprechend Antikörper gebildet. Zudem sezernieren die T-Helferzellen Interferon-gamma (IFN- γ), einen Signalstoff des Immunsystems. Durch dieses Zytokin werden Darmentzündungen hervorgerufen. Es sind dann pathophysiologische Veränderungen der Darmschleimhaut mit entsprechenden Folgen für die Nahrungsaufnahme festzustellen.

Im Verlauf der Krankheit kommt es auch zur Bildung von Auto-Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase. Deren Bildung erfolgt wahrscheinlich wie folgt: Das Enzym bildet Komplexe mit den Glutenpeptiden. B-Zellen, die das Enzym spezifisch erkennen, nehmen diese Komplexe auf und prozessieren sie in ihrem Inneren. Anschließend präsentieren sie den T-Zellen die Glutenpeptide. In einem positiven Rückkopplungsmechanismus aktivieren nun die glutenreaktiven T-Zellen die B-Zellen, die für die Transglutaminase spezifisch sind. Für diesen Mechanismus spricht auch, dass man keine reaktiven T-Zellen gegen die Gewebstransglutaminase findet. Zu dem tragen die Auto-Antikörper gegen das Enzym wahrscheinlich nicht zu den Gewebsschäden bei. Deshalb nimmt man auch Abstand davon, Zöliakie als Autoimmunkrankheit zu bezeichnen. Dennoch werden serologische Tests auf autoreaktive IgA- und IgG-Antikörper zur Diagnostik von Zöliakie eingesetzt. Diese Antikörper sind gegen die Gewebstransglutaminase sowie das Endomyrium, einem bestimmten Bindegewebe, gerichtet (Korponay-Szabó u. a., 2003, Dieterich u. a., 1998).

2.2 Biomolekulare Wechselwirkungen

Biochemische Moleküle (DNA, RNA, Proteine) sind zu einer Vielzahl an spezifischen Wechselwirkungen fähig. Die dabei auftretenden attraktiven Wechselwirkungen sind nicht-kovalenter Natur. Sie können durch hohe Salzkonzentrationen, extreme pH-Werte oder auch Detergenzien wieder aufgebrochen werden (Murphy u. a., 2009). Zwischen Antikörper und Antigen wirken verschiedene Arten attraktiver Wechselwirkungskräfte. Man unterscheidet dabei in elektrostatische Wechselwirkungen (Ion-Ion, Ion-Dipol), Van-der-Waals-Wechselwirkungen (Dipol-Dipol, Dipol-induzierter Dipol und Dispersionswechselwirkungen), Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Sie unterscheiden sich in ihren Ursachen, ihrer Abstandsabhängigkeit und der Bindungsenergie (Atkins und de Paula, 2013). Im Folgenden sollen die Ursachen der wirkenden Kräfte kurz beschrieben werden. Die Bindungsenergien und die entsprechende Abstandsabhängigkeit sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

- **Elektrostatische Wechselwirkungen:** Sie beruhen auf der gegenseitigen Wechselwirkung zweier entgegengesetzt geladenen Gruppen im Molekül oder der Wechselwirkung einer geladenen Gruppe mit einem Dipol.
- **Van-der-Waals-Kräfte:** Darunter werden alle anziehenden Wechselwirkungen zwischen ungeladenen, geschlossenschaligen Molekülen zusammengefasst. Im engeren Sinne wird damit eine Wechselwirkung bezeichnet, deren Abstandsabhängigkeit inversproportional zu r^6 ist. Sie beruht auf im Molekül vorhandenen oder induzierten Dipolmomenten. Diese haben ihre Ursache in der Polarisierbarkeit der Moleküle.
- **Wasserstoffbrückenbindungen:** Diese Wechselwirkungen treten nur auf, wenn die beteiligten Moleküle eine bestimmte Struktur der Form A-H \cdots B aufweisen. A und B sind stark elektronegative Atome. Der an A gebundene Wasserstoff ist partiell positiv geladen. B trägt zusätzlich ein freies Elektronenpaar. Typischerweise tritt diese Art von Wechselwirkung bei den Atomen O, N, B und Cl auf. Wasserstoffbrücken sind für die spezifische Bildung von DNA-Basenpaaren verantwortlich.
- **Hydrophobe Wechselwirkungen:** Unpolare Stoffe lösen sich gering in polaren Lösungsmitteln. Man kann feststellen, dass dieser Vorgang endergonisch ($\Delta G > 0$) aber exotherm ($\Delta H < 0$) verläuft: Um die hydrophoben Moleküle bildet sich ein Käfig aus polaren Lösungsmittelmolekülen, beispielsweise Wasser. Dabei werden in einem exothermen Prozess neue Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Entstehen viele kleine Käfige, nimmt die Entropie des Systems stark ab. Bilden sich jedoch weniger und dafür größere Käfige, kommt es zu einem Entropiegewinn des Systems. Dieser Entropiegewinn führt insgesamt zu einer spontanen Zusammenlagerung hydrophober Moleküle im polaren Lösungsmittel.

Tabelle 2.1: Abstandabhängigkeiten und Energien verschiedener intermolekularer Wechselwirkungen (nach Atkins und de Paula, 2013).

Wechselwirkung	Abstandsabhängigkeit der potenziellen Energie	Energie [kJmol ⁻¹]	Anmerkung
Ion-Ion	$\propto r^{-1}$	250	zwischen Ionen
Ion-Dipol	$\propto r^{-2}$	15	
Dipol-Dipol	$\propto r^{-3}$	2	zwischen ruhenden polaren Molekülen
	$\propto r^{-6}$	0.6	zwischen rotierenden polaren Molekülen
Dispersion	$\propto r^{-6}$	2	zwischen allen Arten von Molekülen
Wasserstoffbrückenbindung	$\propto r^{-6}$	20	nur bei Strukturen der Art A-H .. B
hydrophobe Wechselwirkung	keine		

Der Beitrag der einzelnen Kräfte zur jeweiligen spezifischen biomolekularen Wechselwirkung ist unterschiedlich. Bei der Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und einem Antigen ist es wichtig, dass die beiden jeweiligen Wechselwirkungsplätze chemisch und räumlich komplementär sind.

Vergleicht man die Aminosäurezusammensetzung von Antikörpern im Bereich der Bindungstasche mit anderen Sequenzabschnitten, sind zwei Auffälligkeiten zu bemerken, die für die Spezifität der Wechselwirkung verantwortlich sein können. Im Bereich der Bindungstaschen besitzen Antikörper oft eine überdurchschnittliche Anzahl an aromatischen Aminosäureresten. Diese sind an van-der-Waals Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen und im Fall von Tyrosin auch an Wasserstoffbrücken beteiligt. Aber auch geladene Aminosäurereste, die über elektrostatische Wechselwirkungen einen wesentlichen Beitrag zur Spezifität und zur Bindungsenergie zwischen den Bindungspartnern leisten, sind im Bereich der Bindungstasche überrepräsentiert (Murphy u. a., 2009).

2.3 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Die Wechselwirkung eines Liganden mit einem Rezeptor lässt sich durch folgende Reaktionsgleichung beschreiben:



Die Geschwindigkeit der Anbindung des Rezeptors an seinen Liganden wird mittels der

2 Theoretischer Teil

Assoziationsratenkonstante k_a ausgedrückt. Die Zerfallsgeschwindigkeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes RL wird mit der Dissoziationsratenkonstante k_d beschrieben. Wie aus Gleichung (2.1) ersichtlich, handelt es sich bei der Assoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes um eine bimolekulare Reaktion, der Zerfall des Komplexes verläuft jedoch nach einem monomolekularem Mechanismus.

Die Stabilität des Komplexes ist über die Affinitätskonstante K_{aff} gegeben. Sie lässt sich über die Gleichgewichtskonstante des Massenwirkungsgesetzes bestimmen und kann über den Quotienten der Gleichgewichtskonzentrationen des Rezeptor-Ligand-Komplexes ($[RL]$) und der Gleichgewichtskonzentrationen von freiem Rezeptor und Ligand ($[R]$ und $[L]$) berechnet werden. Alternativ kann sie auch über das Verhältnis der beiden Ratenkonstanten k_a und k_d ermittelt werden. Die Zusammenhänge sind in Gleichung (2.2) gegeben.

$$K_{aff} = \frac{[RL]}{[R] * [L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (2.2)$$

Im biochemischen Bereich wird neben der Affinitätskonstante auch oft die Dissoziationskonstante K_{diss} angegeben. Diese entspricht dem Wert der reziproken Affinitätskonstante.

Mittels Biosensoren ist es möglich, biomolekulare Wechselwirkungen zu charakterisieren. Dabei ist einer der Bindungspartner an der Sensoroberfläche immobilisiert (Ligand) während der zweite Bindungspartner in Lösung über die Sensoroberfläche gegeben wird (Rezeptor). Da beide Bindungspartner in unterschiedlichen Phasen vorliegen, handelt es sich um eine heterogene Reaktion. Durch die Anbindung des Rezeptors an die Sensoroberfläche bildet sich ein Konzentrationsgradient aus. Dabei verarmt die Lösung an Rezeptormoleküle zur Sensoroberfläche hin. Die Konzentration der Rezeptormoleküle in der sogenannten Diffusionsschicht wird durch den Massentransport bestimmt, der durch die jeweilige Diffusionsratenkonstante k_{diff} charakterisiert ist. Arbeitet man unter Bedingungen des Rezeptorüberschusses oder im Fluss, bleibt die Konzentration des Rezeptors in einer gewissen Entfernung zur Oberfläche jedoch unbeeinflusst. Dieser Teil der Lösung mit konstanter Rezeptorkonzentration wird als *bulk* bezeichnet.

Entsprechend sind bei Affinitätsreaktionen in heterogener Phase zwei Faktoren zu berücksichtigen, die die Geschwindigkeit der Reaktion beeinflussen: Die Kinetik der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor an der Sensoroberfläche und der Massentransport des Rezeptors an die Oberfläche (Glaser, 1993). Der langsamste Schritt ist dann letztendlich geschwindigkeitsbestimmend. Die beiden Prozesse sind in Abbildung 2.2 veranschaulicht.

2.3.1 Kinetisch kontrollierte Reaktion

Um Aussagen über die Kinetik der Reaktion machen zu können, werden die experimentellen Bedingungen so gewählt, dass der Massentransport an die Oberfläche viel schneller ist, als die Komplexbildung an der Oberfläche.

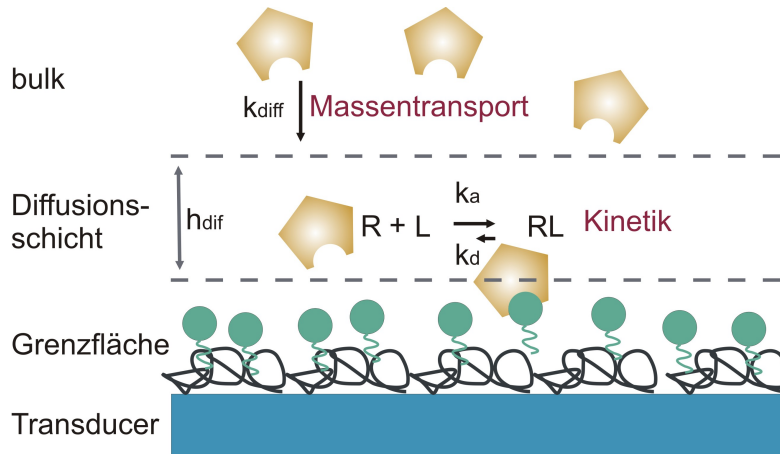


Abbildung 2.2: Bindungsreaktionen in heterogener Phase

Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante

Die Geschwindigkeitsgleichung für die Bildung des Rezeptor-Ligandkomplexes an der Oberfläche ergibt unter Annahme einer Sorption gemäß der Langmuir-Isotherme Gleichung (2.3) (O'Shannessy, 1994, Piehler, 1997):

$$\frac{d[RL_{of}]}{dt} = k_a * [R_{bu}] * [L_{of}] - k_d[RL_{of}] \quad (2.3)$$

$$= k_a * [R_{bu}] * ([RL_{of,\infty}] - [RL_{of}]) - k_d[RL_{of}] \quad (2.4)$$

Wobei $[RL_{of}]$ die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes an der Oberfläche ist, $[RL_{of,\infty}]$ die maximal mögliche Konzentration des Komplexes. Diese, auch Maximalbeladung genannte Konzentration, wird bei einer quasi unendlich hohen Rezeptorkonzentration im *bulk* erreicht. $[R_{bu}]$ ist die Rezeptorkonzentration im *bulk* und $[L_{of}]$ die Ligandkonzentration an der Oberfläche. Wird im Fluss gearbeitet, kann die Rezeptorkonzentration im *bulk* als konstant angenommen werden, da immer neues Material nachgeliefert wird.

Mit obiger Annahme ergibt Gleichung (2.3) integriert und umgeformt eine Kinetik pseudo-erster Ordnung für die Bildung des Komplexes (O'Shannessy u. a., 1993):

$$[RL_{of}](t) = [RL_{of,ggw}] \left(1 - e^{-k_{st}t}\right) \quad (2.5)$$

Wobei $[RL_{of,ggw}]$ die Gleichgewichtskonzentration des Komplexes darstellt. Sie wird nach unendlich langer Reaktionszeit erreicht, wenn sich das Gleichgewicht zwischen Lösung und Oberfläche eingestellt hat. Für sie gilt:

$$[RL_{of,ggw}] = [RL_{of,\infty}] * \frac{K_{aff} * [R_{bu}]}{1 + K_{aff} * [R_{bu}]} \quad (2.6)$$

2 Theoretischer Teil

k_s stellt die sogenannte scheinbare Ratenkonstante dar. Sie wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$k_s = k_a * [R_{bu}] + k_d \quad (2.7)$$

k_s beschreibt die Krümmung der Bindungskurve. Je größer k_s , desto stärker ist die Krümmung, desto schneller wird die Gleichgewichtsbeladung erreicht. Wie aus Gleichung (2.7) ersichtlich, ergibt sich k_s aus dem Zusammenspiel von k_a und k_d . In der Assoziationsphase kommt es somit zu einer Überlagerung von Assoziation und Dissoziation des Rezeptors. Allein die Krümmung der Bindungskurve in der Assoziationsphase enthält keine Aussage über die Assoziationsratenkonstante. Erst durch die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit kann der Anteil von Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante ermittelt werden.

Die Dissoziationsratenkonstante allein, kann jedoch in der Dissoziationsphase bestimmt werden. Der Zerfall des Rezeptor-Ligand-Komplexes entspricht einer Kinetik erster Ordnung. Das Konzentrations-Zeit Gesetz folgt Gleichung (2.8).

$$[RL_{of}](t) = [RF_{of,0}] * e^{-k_d(t - t_0)} \quad (2.8)$$

Hierbei ist RL_{of} die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes an der Oberfläche zum Zeitpunkt t und $RL_{of,0}$ die Konzentration des Komplexes zum Startzeitpunkt. k_d ist unabhängig von der Rezeptor-Ligand-Konzentration auf der Oberfläche. Ihr Wert lässt sich experimentell gut über die Anpassung der unten genannten Gleichung an die Dissoziationsphase bestimmen.

Einflussfaktoren kinetischer Messungen

Werden kinetische Messungen unter dem Einfluss von Massentransport durchgeführt, kann man ein Abflachen der Bindungskurve in der Assoziationsphase beobachten. Die Krümmung der Bindungskurve wird geringer. Deshalb muss beim experimentellen Design kinetischer Messungen der Einfluss des Massentransports genau untersucht und minimiert werden, um relevante kinetische Daten zu erhalten. Nach Myszka et al. können drei verschiedene Faktoren ausgemacht werden, über die der Einfluss des Massentransports an die Oberfläche minimiert werden kann (Myszka u. a., 1997):

- **Rezeptorkonzentration im *bulk*:** Durch eine hohe Rezeptorkonzentration im *bulk* wird ein steiler Konzentrationsgradient und damit ein großer Massenfluss an die Oberfläche erreicht.
- **Ligandkonzentration an der Oberfläche:** Durch eine niedrige Ligandkonzentration wird der Überschuss an freiem Rezeptor aufrechterhalten und die Verarmung der Lösung an Rezeptor gering gehalten.

- **Höhe der Diffusionsschicht:** Gleichung (2.9) beschreibt die Einflussfaktoren auf die Dicke der Schicht (Christensen, 1997):

$$h_{diff} = \sqrt[3]{\frac{Dh^2bl}{F}} \quad (2.9)$$

Wobei h_{diff} die Höhe der Diffusionsschicht, D der Diffusionskoeffizient, h , b , und l die Höhe, Breite und Länge des Flußkanals sind. F ist die Fließgeschwindigkeit parallel zur Sensoroberfläche.

Damit zeigt sich, dass die Dimensionen der Flusszelle wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Diffusionsschicht haben. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit ist insbesondere eine niedrige Höhe des Flußkanals zu bevorzugen. Ebenso kann die Dicke der Diffusionsschicht über eine möglichst hohe Fließgeschwindigkeit minimiert werden.

2.3.2 Diffusionskontrollierte Reaktion

Unter diffusionskontrollierten Bedingungen kann die Wechselwirkung von Rezeptor und Ligand an der Oberfläche nicht charakterisiert werden. Diese Messbedingungen ermöglichen aber, die Bestimmung der Affinität in homogener Phase. Wird der Rezeptor in homogener Lösung mit Ligand versetzt, wechselwirken beide Partner. Es stellt sich ein Gleichgewicht gemäß dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung (2.2)) von freiem Rezeptor und Ligand sowie dem Komplex ein. Wird diese Lösung nun über die Sensoroberfläche mit immobilisiertem Liganden gegeben, bindet der freie Rezeptor an den immobilisierte Liganden. Desweiteren kann es zu Austauschreaktionen von gelöstem und immobilisiertem Ligand kommen. Die Prozesse sind in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

Unter diffusionskontrollierten Bedingungen kann aufgrund der nachfolgenden Überlegungen die Affinitätskonstante der Wechselwirkung in Lösung bestimmt werden. Für Messungen, die unter Konvektion oder im Durchfluss stattfinden, wird der Massentransport vom *bulk* über die Diffusionsschicht an die Oberfläche durch das erste Ficksche Gesetz (Gleichung (2.10)) beschrieben.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.10)$$

Wobei J den Massentransport darstellt. D ist der für den Rezeptor spezifische Diffusionskoeffizient. $\frac{\partial c}{\partial x}$ entspricht dem Konzentrationsgradient.

Damit lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Komplexbildungsgeschwindigkeit an der Oberfläche und der Rezeptorkonzentration in freier Lösung (Kumpf, 2005, Glaser, 1993) aufstellen.

$$\frac{d[R_{of}]}{dt} = \frac{d[RL_{of}]}{dt} = D \frac{[R_{bu}]}{h_{diff}} \quad (2.11)$$

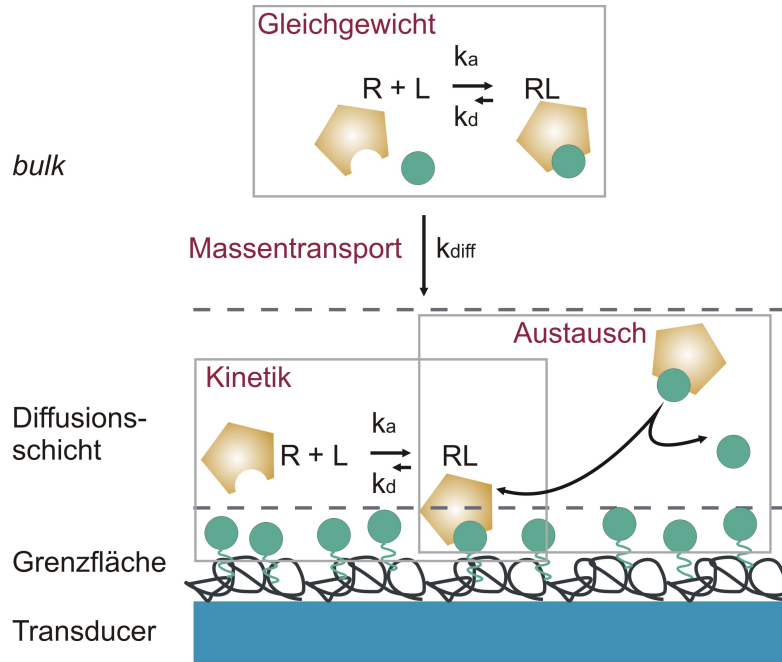


Abbildung 2.3: Bindungsreaktionen in homogener Phase

Wird nun eine konstante Konzentration an Rezeptor in Lösung mit verschiedenen Ligandkonzentrationen titriert, stellt sich abhängig der eingesetzten Ligandkonzentration, ein Gleichgewicht zwischen freiem Ligand und Rezeptor sowie dem Komplex ein. Dieses Gleichgewicht ist abhängig von der Affinität zwischen Rezeptor und Ligand. Die Gleichgewichtskonzentrationen in Lösung und damit die Affinitätskonstante können indirekt bestimmt werden (Piehler, 1997). Dazu wird die Anbindung des freien Rezeptors an die Sensoroberfläche gemessen und die Proportionalität in Gleichung (2.11) ausgenutzt. Die Affinitätskonstante berechnet sich dann mit den Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktanten im *bulk*. Der Ansatz für das Massenwirkungsgesetz lautet hierfür wie folgt:

$$K_{aff} = \frac{[RL_{bu}]}{([R_{bu,0}] - [RL_{bu}]) * ([L_{bu,0}] - [RL_{bu}])} \quad (2.12)$$

Darin wird die Komplexkonzentration im *bulk* mit RL_{bu} , die eingesetzte Rezeptorkonzentration mit $R_{bu,0}$ und die eingesetzte Ligandkonzentration mit $L_{bu,0}$ bezeichnet. Diese Gleichung kann mit Hilfe der Mitternachtsformel gelöst werden. Für die Komplexkonzentration im *bulk* ergibt sich dann:

$$[RL_{bu}] = \frac{[R_{bu,0}] + [L_{bu,0}] + \frac{1}{K_{aff}}}{2} - \sqrt{\left(\frac{[R_{bu,0}] + [L_{bu,0}] + \frac{1}{K_{aff}}}{2}\right)^2 - [R_{bu,0}][L_{bu,0}]} \quad (2.13)$$

Mit

$$[R_{bu}] = [R_{bu,0}] - [RL_{bu}] \quad (2.14)$$

folgt aus Gleichung (2.13) die Konzentration an bindungsfähigem Rezeptor im *bulk*:

$$[R_{bu}] = \frac{[R_{bu,0}] - [L_{bu,0}] - \frac{1}{K_{aff}}}{2} + \sqrt{\left(\frac{[R_{bu,0}] + [L_{bu,0}] + \frac{1}{K_{aff}}}{2}\right)^2 - [R_{bu,0}][L_{bu,0}]} \quad (2.15)$$

Aus Gleichung (2.15) ist ersichtlich, dass die Konzentration des freien Rezeptors im *bulk* nur von den eingesetzten Konzentrationen an Ligand und Rezeptor, sowie der Affinitätskonstante abhängt. Dieser Zusammenhang ermöglicht, bei bekannten Rezeptor- und Ligandkonzentrationen, die Affinitätskonstante eines Interaktionspaares zu bestimmen. Bei bekannter Affinitätskonstante und bekannter Konzentration eines der Bindungspartner kann über eine Kalibrierkurve die Konzentration des Interaktionspartners angegeben werden.

Dabei ist allerdings die Einschränkung zu treffen, dass Gleichung (2.15) nur für monovalente Rezeptoren wie zum Beispiel Fab-Fragmente verwendet werden darf. Für bivalente Rezeptoren wie Antikörper muss der Ansatz verändert werden, da der Rezeptor nach der Bindung mit einer Bindungsstelle nochmals mit einer zweiten binden kann. Eine ausführliche Beschreibung des mathematischen Ansatzes findet sich bei Kumpf oder Stevens (Kumpf, 2005, Stevens, 1987).

2.4 Optische Grundlagen

In dieser Arbeit kam ein optisches, markierungsfrei arbeitendes Biosensorsystem zum Einsatz. Optische Biosensoren nutzen die Wechselwirkung von Licht mit Materie zur Detektion von biomolekularen Wechselwirkungen. Die Grundlagen zur optischen Detektion sollen im Folgenden erläutert werden (Zinth und Zinth, 2009).

2.4.1 Wechselwirkungen von Licht mit Materie

Elektromagnetische Wellen sind zeitlich veränderliche, miteinander gekoppelte elektrische und magnetische Felder, die sich im Vakuum mit Lichtgeschwindigkeit ausbreiten. Trifft die elektromagnetische Welle auf ein Medium, kommt es zu frequenzabhängigen Wechselwirkungen mit der Materie. Dabei können verschiedene Effekte wie Absorption, Transmission, Reflexion und Streuung auftreten. Im optischen Bereich, in nichtmagnetischen Medien, wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit von der relativen Dielektrizitätskonstante ϵ bestimmt. ϵ ist eine materialspezifische und frequenzabhängige Größe. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle im Medium ist um den Faktor $\frac{1}{\epsilon}$ geringer als im Vakuum. Darüber lässt sich der Brechungsindex n eines Mediums beschreiben:

$$n = \sqrt{\epsilon} \quad (2.16)$$

2.4.2 Elektromagnetischen Wellen an Grenzflächen

Wenn elektromagnetische Wellen von einem Medium in ein anderes Medium mit unterschiedlichen dielektrischen Eigenschaften übergehen, dann kommt es, wird die Absorption vernachlässigt, zu Reflexion und Transmission. Dabei ändert sich nicht nur die Ausbreitungsgeschwindigkeit, sondern auch der Ausbreitungswinkel. Elektromagnetische Wellen werden an der Grenzfläche reflektiert oder gebrochen (Abbildung 2.4).

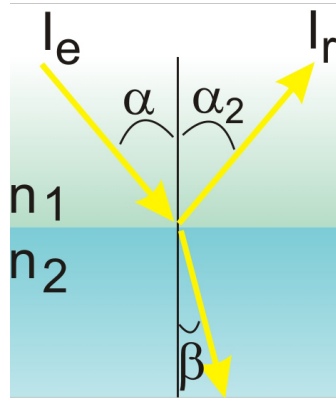


Abbildung 2.4: Reflexion und Transmission von Licht an einer Grenzfläche zwischen einem optisch dünneren Medium mit n_1 und einem optisch dichteren Medium mit n_2

Die entsprechenden Winkel ergeben sich aus folgenden Überlegungen: Aufgrund der Stetigkeit der Tangentialkomponente des E-Feldes müssen die Frequenzen von eingestrahlttem, reflektiertem und transmittiertem Licht gleich sein. Desweiteren ergibt sich, dass die Wellenvektoren in einer Ebene liegen müssen.

Für den reflektierten Teilstrahl ergibt sich hieraus das Reflexionsgesetz:

$$\text{Einfallswinkel } \alpha = \text{Ausfallswinkel } \alpha_2 \quad (2.17)$$

Für den transmittierten Teilstrahl gilt das Brechungsgesetz:

$$n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta \quad (2.18)$$

wenn $n_2 > n_1$ wird der Wellenvektor zum Lot hin gebrochen. Wenn $n_2 < n_1$ gilt, wird er vom Lot weggebrochen.

Neben den Winkeln der Wellenvektoren interessieren auch die Amplituden der transmittierten oder reflektierten Felder. Die reflektierten bzw. transmittierten Intensitäten werden über den Reflexions- bzw. Transmissionsgrad R und T ausgedrückt. Es gilt:

$$1 = R + T \quad (2.19)$$

Dabei gilt:

$$R = \frac{A_r^2}{A_e^2} = \frac{I_r}{I_e} = r * r^* \quad (2.20)$$

Wobei $\frac{A_r^2}{A_e^2}$ das Amplitudenverhältnis zwischen reflektierter und eingestrahelter Welle darstellt, sowie r den Reflexionskoeffizient und r^* den konjugiert komplexen Wert.

Zur Berechnung der Reflexionskoeffizienten unter einem beliebigen Einfallswinkel müssen die elektrischen und magnetischen Felder in ihre Komponenten senkrecht (\perp) und parallel (\parallel) zur Einfallsebene aufgespalten werden. Unter Verwendung der Stetigkeitsbedingungen und des Reflexionsgesetzes sowie des Brechungsgesetzes ergeben sich nach Umformung folgende Zusammenhänge:

$$r_{\perp} = \frac{E_{r\perp}}{E_{e\perp}} = \frac{n_1 \cos \alpha - n_2 \cos \beta}{n_1 \cos \alpha + n_2 \cos \beta} \quad (2.21)$$

$$r_{\parallel} = \frac{E_{r\parallel}}{E_{e\parallel}} = \frac{n_2 \cos \alpha - n_1 \cos \beta}{n_2 \cos \alpha + n_1 \cos \beta} \quad (2.22)$$

Für die Transmissionkoeffizienten findet man entsprechend folgende Zusammenhänge:

$$t_{\perp} = \frac{E_{t\perp}}{E_{e\perp}} = \frac{2n_1 \cos \alpha}{n_1 \cos \alpha + n_2 \cos \beta} \quad (2.23)$$

$$t_{\parallel} = \frac{E_{t\parallel}}{E_{e\parallel}} = \frac{2n_1 \cos \beta}{n_2 \cos \alpha + n_1 \cos \beta} \quad (2.24)$$

2.4.3 Reflexion an dünnen Schichten

An dünnen, dielektrischen Schichten, deren Schichtdicke kleiner als die Kohärenzlänge des eingestrahnten Lichtes ist, können Interferenzerscheinungen beobachtet werden. Aus dem Alltag sind diese Phänomene von schillernden Seifenblasen oder Ölfilmen bekannt. Der Effekt beruht auf Interferenzen von Teilstrahlen, die an Vorder- und Rückseite der dünnen Schicht reflektiert werden. Notwendige Voraussetzungen für solche Interferenzen sind (Anders, 1967, Zinth und Zinth, 2009):

- Kohärenz des reflektierten Lichtes
- Paralleler Strahlengang
- Ideal transparente Schichten

Die Verhältnisse bei der Reflexion an dünnen Schichten sollen im Folgenden erläutert werden und sind in Abbildung 2.5 gezeigt (Anders, 1967):

Gegeben sei ein System aus drei parallelen Schichten mit den Brechungsindices n_0 , n_1 und n_2 . Die mittlere Schicht dieses Dreischichtsystems sei eine dünne Schicht und besitze eine Dicke von d_1 . Dann gibt es zwei Grenzflächen, an denen Licht reflektiert oder

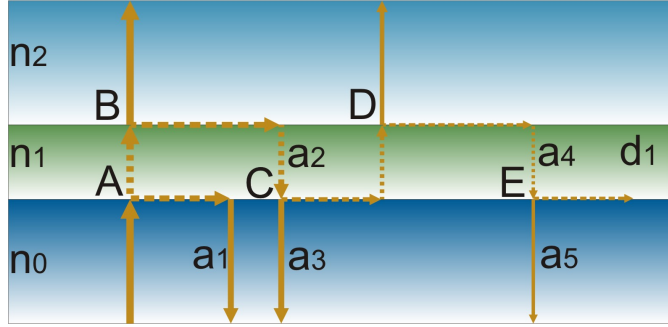


Abbildung 2.5: Mehrfachreflexion an dünnen Schichten

transmittiert werden kann. Es soll der Fall des senkrechten Lichteinfalls betrachtet werden. Am Punkt A wird von der Welle mit der Amplitude A der Bruchteil $r_1 = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1}$ reflektiert. Die Amplitude des transmittierten Teilstrahls beträgt $a_1 = \sqrt{1 - r_1^2}$. An der zweiten Grenzfläche (Punkt B) wiederum beträgt der reflektierte Anteil $r_2 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}$ und ein Teilstrahl mit der Amplitude $a_2 = r_2 \sqrt{1 - r_1^2}$ wird zurück an die erste Grenzfläche reflektiert. Die dort in C reflektierte Welle besitzt eine Amplitude von $-r_1 r_2 \sqrt{1 - r_1^2} e^{i\Delta_1}$. Die Amplitude der transmittierten Welle wird um den Faktor $\sqrt{1 - r_1^2}$ reduziert, so dass sich eine Amplitude von $a_3 = r_2(1 - r_1^2)$ ergibt. Die in C austretende Welle hat die dünne Schicht mit der optischen Schichtdicke $n_1 d_1$ zweimal durchquert. Dadurch ergibt sich im Vergleich zur eingestrahlenen Welle A einen Gangunterschied von:

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1 \quad (2.25)$$

Werden die Amplituden und Phasen der beiden Wellen addiert ergibt sich:

$$r_1 + r_2(1 - r_1^2)e^{-i\Delta_1} \quad (2.26)$$

Die in C zurück reflektierte Welle wird in D ein drittes Mal reflektiert. Damit beträgt die Amplitude des Teilstrahls in E: $a_4 = r_1^2 r_2^2 \sqrt{1 - r_1^2}$.

In E wird dann eine Welle mit der Amplitude $a_5 = -r_1 r_2^2(1 - r_1^2)$ emittiert. Diese Welle hat im Vergleich zur ersten eine Wegdifferenz von $4n_1 d_1$ zurückgelegt. Für beliebig viele Reflexionen ergibt sich für die resultierende Welle aus der Interferenz der Teilstrahlen folgende Summe der Amplituden und Phasen:

$$r e^{i\epsilon} = r_1 + r_2(1 - r_1^2)e^{-i\Delta_1} - r_1 * r_2^2(1 - r_1^2)e^{-i2\Delta_1} + r_1^2 * r_2^3(1 - r_1^2)e^{-i3\Delta_1} \pm \dots \quad (2.27)$$

Mittels einer geometrischen Reihenentwicklung kann die Formel (2.27) umgeschrieben werden in:

$$re_{i\epsilon} = \frac{r_1 + r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1}}{1 + r_1 r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1}} \quad (2.28)$$

Gemäß Gleichung (2.20) muss Gleichung (2.28) mit ihrem konjugiert komplexen Wert multipliziert werden, um die messbare Größe R zu erhalten:

$$R = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos\Delta_1}{1 + r_1^2 r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos\Delta_1} \quad (2.29)$$

Bei geringen Reflektivitäten strebt der Nenner dem Wert eins zu. Werden zudem Messbedingungen unter senkrechtem Lichteinfall gewählt und sind keine Phasensprünge bei der Reflexion zu erwarten, da die Brechungsindexänderung monoton verläuft, ergibt sich unter diesen Bedingungen eine periodische, wellenlängenabhängige Modulation der Reflektivität an einer dünnen Schicht. Gleichung (2.29) vereinfacht sich zu (Brecht, 1993):

$$R = r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos\Delta_1 \quad (2.30)$$

Durch die Verwendung von Weißlicht entsteht ein Interferenzspektrum mit wellenlängenabhängigen, alternierenden Minima und Maxima. Die Lage dieser Extremwerte hängt von der Schichtdicke der jeweiligen dünnen Schicht ab.

Aus Gleichung (2.30) ergibt sich die Lage der Extremwerte, so dass die Phasenverschiebung ein ganzzahliges Vielfaches von λ sein muss. Damit folgt für die Lage der Maxima:

$$\frac{2nd}{\lambda} = \{1, 2, 3, \dots\} \quad (2.31)$$

Während die Minima bei

$$\frac{2nd}{\lambda} = \{0.5, 1.5, 2.5, \dots\} \quad (2.32)$$

zu finden sind.

2.4.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Interferenz an dünnen Schichten wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, kann zur Detektion von molekularen Wechselwirkungen verwendet werden. Neben Antikörper-Antigen oder DNA-DNA-Wechselwirkungen kann auch das Quellen eines Polymers unter Analyteinwirkung verfolgt werden (Brecht u. a., 1992). Eine erste Beschreibung der Methode findet sich bei Gauglitz und Nahm (Gauglitz und Nahm, 1991). Im Folgenden sei kurz das Messprinzip erläutert. Dies ist auch in Abbildung 2.6 dargestellt.

Grundlage der Detektion ist ein Transducer aus einem transparenten Material (Glas oder Kunststoff). Zur Signalverstärkung können, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, verschiedene Schichtsysteme aufgebracht sein. Auf diesen Transducer wird als letzte Schicht eine spezifische Erkennungsstruktur, z.B. Antikörper aufgebracht. Diese letzte Schicht wird

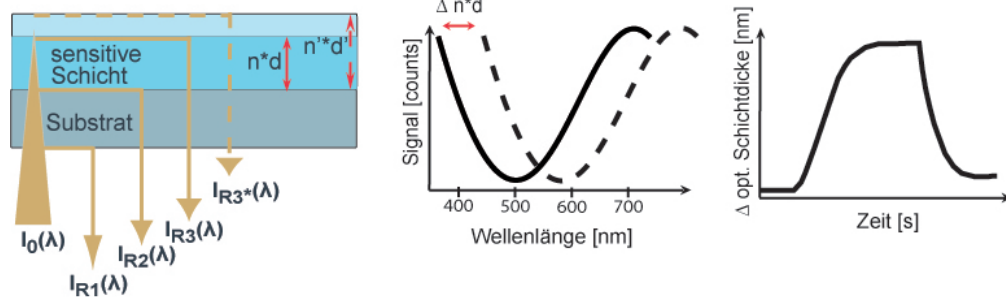


Abbildung 2.6: Messprinzip der RIFs: links: Aufbau des Transducers und entsprechende Reflexionen des eingestrahnten Lichtes, Mitte: Verschiebung des Interferenzspektrums bei sich ändernder optischer Schichtdicke der sensitiven Schicht, rechts: zeitaufgelöste Bindungskurve

als sensitive Schicht bezeichnet, da hier die Erkennung des Analyten stattfindet.

Wird nun mit einer Weißlichtquelle in dieses Schichtsystem eingestrahlt, kommt es zur Reflexion und Interferenz an den verschiedenen Schichten. Die wellenlängenabhängige Intensität wird mittels eines Spektrometers detektiert und aufgezeichnet.

Die Gleichungen (2.32) und (2.31) beschreiben die Abhängigkeit der Lage der Extremwerte des Interferenzspektrums in Abhängigkeit des Produkts aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke. Dieses Produkt wird als optische Schichtdicke bezeichnet. Die Anlagerung eines Bindungspartners an die sensitive Schicht des Sensors oder das Quellen eines Polymers verändert sowohl den Brechungsindex, als auch die physikalische Schichtdicke der sensitiven Schicht. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Interferenzmusters.

Wird diese Verschiebung über die Zeit verfolgt, kann aus der zeitlichen Lageänderung des ausgewählten Punkts des Interferenzspektrums, z.B. eines Minimums, eine zeitaufgelöste Bindungskurve erhalten werden. Eine detaillierte Beschreibung der Auswertestrategie findet sich bei Kraus (Kraus und Gauglitz, 1992, Kraus und Gauglitz, 1994). Aus dieser Bindungskurve können bei entsprechenden gewählten experimentellen Bedingungen kinetische und thermodynamische Daten ermittelt werden.

2.4.5 Weiterentwicklungen der Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Der apparative Aufbau des spektral auszuwertenden RIFs-System ist relativ aufwendig und erlaubt zudem nur die Untersuchung jeweils einer molekularen Wechselwirkung. Deshalb gab es verschiedene Ansätze zur Miniaturisierung und zur Parallelisierung des Messaufbaus. Die Miniaturisierung ist interessant für Fragestellungen z.B. im Bereich der patientennahen Diagnostik, der Umweltanalytik, oder der Prozesstechnik. Dort werden kleine portable Geräte für den Vor-Ort-Einsatz benötigt, um die Zeit zwischen Probenahme und Ergebnis möglichst gering zu halten.

Parallelisierte Aufbauten werden verwendet, wenn eine große Anzahl an Proben untersucht werden soll oder mehr als ein möglicher Interaktionspartner zur Verfügung steht. Dies ist interessant für Fragestellungen in der pharmazeutisch-medizinischen Forschung z.B. beim Wirkstoffscreening, aber auch für Anwendung in der biochemisch-molekularbiologischen Grundlagenforschung.

Für beide Anwendungsgebiete der RIFS wurden Lösungsstrategien entwickelt. Ihnen allen ist gemeinsam, dass statt des kompletten Spektrums nur wenige oder sogar nur eine Wellenlänge zur Auswertung herangezogen werden.

Reichl et. al (Reichl u. a., 2000) entwickelten einen vereinfachten Aufbau, in dem das Interferenzspektrum mittels vier ausgewählten Wellenlängen abgebildet wird. Als Lichtquellen werden dabei LEDs und als Detektor eine Photodiode verwendet. Eine weitere Miniaturisierung erfolgte unter der Verwendung von p-i-n Photodioden aus amorphem Silicium (Sämann u. a., 2010). Sie werden direkt auf die Rückseite des RIFS-Substrats aufgebracht und in die Elektronik integriert. Somit können sehr kleine Sensorsysteme realisiert werden.

Auch im Bereich der Parallelisierung wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie weiter entwickelt. Diese erlaubt eine parallelisierte Detektion von molekularen Wechselwirkungen im Mikrotiterplattenformat. Bei diesem System wurden mit Hilfe eines Filterrades sechs verschiedene Wellenlängen sequentiell durchgestimmt und die reflektierten Intensitäten mittels einer CCD-Kamera detektiert. Die Verwendung einer Kamera erlaubte die ortsgenaue Auswertung einer Fläche. Dieses System wurde unter anderem zur pharmakologischen Wirkstoffsuche und zum Epitopmapping eines anti-Transglutaminaseantikörpers eingesetzt (Rothmund, 1999, Kröger u. a., 2002). Im Gegensatz zu den anderen entwickelten Systemen misst dieses System, bedingt durch die Verwendung einer Mikrotiterplatte, nicht im Durchfluss, sondern im *stopped flow*.

1 λ -RIFS

Ein weiterer Entwicklungsschritt ist die Verwendung von nur einer Wellenlänge zur Detektion. Dies ist möglich, da sich die Reflektivität für eine Wellenlänge gemäß Gleichung (2.30) mit veränderlicher optischer Schichtdicke ändert. Die Auswertung erfolgt nun nicht mehr über die Verschiebung eines Extrempunktes im Interferenzspektrum, stattdessen wird die Intensitätsänderung bei einer Wellenlänge verfolgt und daraus die Bindungskurve ermittelt. Dieses Verfahren wurde erfolgreich im Bereich miniaturisierter Sensorsysteme angewendet (Ewald u. a., 2013) und konnte auch für parallelisierte Messungen als *imaging Reflectometric Interfererence Spectroscopy* (iRIFS) etabliert werden (Pröll, 2010). Da bei den 1 λ -Systemen nicht mehr der gesamte Spektralbereich zur Analyse zur Verfügung steht, müssen die untersuchten Systeme gut charakterisiert sein. Im Falle der 1 λ -Auswertung müssen das Transducer-Schichtsystem, die zur Beleuchtung verwendete Wellenlänge und die zu erwartende Schichtdickenänderung gut aufeinander abgestimmt sein, um eine lineare Abhängigkeit des Signals von der Veränderung der optischen Schichtdicke zu erlangen (Markovic, 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Reagenz	Typenbezeichnung	Hersteller
AMD50	Aminodextran, 100K Dalton, 50%	Innovent e. V., Jena,
AMD10	Aminodextran, 100K Dalton, 10%	Innovent e. V., Jena,
PEG	Diaminopolyethylenglykol 2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, 96%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid, 30 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GOPTS	3-Glycidylxypropyl- trimethoxysilan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DIC	Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NHS	N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)- 1,1,3,3-Tetramethyluronium tetrafluoroborat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Aceton, getrocknet, max. 0,01 % Wasser	Merck, Darmstadt
DCM	Dichlormethan	Merck, Darmstadt
DMF	Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HCl	Salzsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaOH	Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3 Material und Methoden

Reagenz	Typenbezeichnung	Hersteller
NaCl	Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol		Carl Roth, Karlsruhe
Tween [®] 20:	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat	Sigma, Taufkirchen
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCholat	Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton [®] X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol	Sigma, Taufkirchen
OVA	Ovalbumin (Hühnereialbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin	Streptavidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
a-TG	anti-Transglutaminase2 Antikörper (Klon: CUB 7402)	Abcam, Cambridge, UK
a-Testosteron	anti-Testosteron (3-CMO-BSA) Antikörper (Klon: BM2076)	Acris Antibodies, Herford
Testosteronoxim	Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
a-FLAG [®]	anti-FLAG [®] Antikörper (Klon: M2)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Labelingkit	FluoroLink [™] Cy5 Reactive Dye 5-pack	GE Healthcare

Peptidsequenzen

Peptid	Sequenz
Peptid 5	YPEGSSSEEREAFTRA
Peptid 6	PEGSSSEEREAFTRAN
Peptid 7	EGSSSEEREAFTRANH
Peptid 8	GSSEEREAFTRANHL
Peptid 10	SEEREAFTRANHLNK

Lösungen

Lösung	Herstellung
10x Phosphatpuffer (PBS)	26.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.4 g KH_2PO_4 80 g NaCl 2 g KCl mit Reinstwasser auf 1 L
1x Phosphatpuffer	100 ml 10x Phosphatpuffer mit Reinstwasser auf 1 L pH mit KOH auf pH7.4
Regenerationslösung	750 mg Glycin mit Reinstwasser auf 1 L pH mit HCl auf pH2
10mM MES-Puffer	1.95g MES 8.7 g NaCl mit Reinstwasser auf 1 L pH mit NaOH auf pH6

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Typenbezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten	384 Microarray Plate	ThermoScientific
Gelfiltrationssäule	Sephadex G-25 M	GE Healthcare
Sterilfilter	Stericup TM and Steritop [®] VacuumFilter Cups	Millipore

3.1.3 Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
RIfS-Aufbau		
Halogenlampe	Parabolic Reflector lamp (5V/2A)	Welch Allyn
Diodenarrayspektrometer	SPEKOL 1100 (modifiziert)	Analytik Jena AG
Y-Wellenleiter	1x2(50:50) POF Koppler	Ratioplast- Optoelectronics
Fluidik mit automatischem Probengeber	Flow-Injektion Analyzer ASIA-FIA	Ismatec
iRIfS-Aufbau		
CCD Kamera	pco.1600	PCO
Objektiv	Telezentrisches koaxiales Objektiv mit normaler Auflösung	Sill Optics
LED	Luxeon III Star $\lambda = 520$ nm	Philips Lumileds
Fluidik mit automatischem Probengeber	Flow-Injektion Analyzer ASIA-FIA	Ismatec
Spotter	BioOdyssey TM Calligrapher TM MiniArrayer	BioRad
Scanner	GenePix [®] 4100 Microarray Scanner	Molecular Devices
Zentrifuge	Labofuge 400R	Hereaus
Spektrometer	Lambda 9	Perkin Elmer
Ultraschallbad	Sonorex Super 10P	Bandelin

3.1.4 Transducer

Die Wahl eines optimalen Transducersystems hat entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Messungen. Anforderungen an das gewählte System sind die Stabilität der optischen Parameter, eine geeignete Oberflächenchemie zur Anbindung der sensitiven Schicht (Biopolymer und Erkennungsstruktur) und geeignete optische Eigenschaften. Eine ausführliche Diskussion der nötigen Anpassungen findet sich bei Brecht und Gauglitz, 1994.

Transducer mit Schichtsystem 1: Dieser Schichtaufbau wird im Folgenden als RIfS-Glas bezeichnet. Das RIfS-Glassubstrat hat einen dreiteiligen Schichtaufbau. Als Träger-

schicht fungiert 1 mm dickes D263 oder BK7 Glas. Darauf aufgedampft eine 10 nm dicke Schicht an Ta_2O_5 und eine 330 nm dicke Schicht aus SiO_2 . Das Ta_2O_5 hat bei einer Wellenlänge von 500 nm einen Brechungsindex von ca. 2.1 und verstärkt somit die Reflektivität. Es ist zudem chemisch, thermisch und mechanisch sehr stabil und besitzt eine gute Transparenz im Wellenlängenbereich von 300-1000 nm. Das SiO_2 dient als Interferenzschicht. Um ein Interferenzphänomen beobachten zu können, muss die Schichtdicke etwa im verwendeten Wellenlängenbereich liegen. Bei sehr dünnen Schichtdicken der sensitiven Schicht, z.B. bei Proteinmonolagen kann dies kritisch werden. Die Interferenzschicht garantiert eine genügend große Schichtdicke, um auch bei vergleichsweise geringen Schichtdicken ein Interferenzspektrum mit Minimum im sichtbaren Bereich zu erhalten (Brecht und Gauglitz, 1994).

Transducer mit Schichtsystem 2: Dieser Schichtaufbau wird im Folgenden als Goethe-Glas bezeichnet. Das oben beschriebene Schichtsystem kann durch Variation der Schichtdicken der hochbrechenden Schicht und der Interferenzschicht noch weiter optimiert werden, um ein möglichst hohes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erlangen (Nopper, 2000, Rathgeb, 1999). Der Schichtaufbau ist wie folgt: 1 mm dickes BK7 Glas, 45 nm Ta_2O_5 , 20 nm SiO_2 . Dieses Glas ist für die $1-\lambda$ Reflektometrie gut geeignet. Die Wahl der Messwellenlänge ist dann den zu erwartenden Schichtdickenänderungen des entsprechenden Messsystems anzupassen.

Für die RIfS-Messungen wurden Transducer der Größe 1x1 cm verwendet. Das iRIfS ist für Transducer in Objektträgergröße (76 x 26 mm) ausgelegt.

3.1.5 Software

Software	Hersteller
imageJ 1.46e	Wayne Rasband / National Institutes of Health
Matlab R2012b	MathWorks
Origin 8.1	Additive
Microsoft Office 2007	Microsoft
FilmWizard	Scientific Computing International
GenePix® Pro 7 Acquisition and Analysis Software	MolecularDevices

3.2 Methoden

3.2.1 Oberflächenpreparation

Die unter 3.1.4 beschriebenen Glastransducer werden in Vorbereitung der Messungen mit verschiedenen Biopolymeren beschichtet. Diese Beschichtung ermöglicht zum einen das Anbinden der Biomoleküle, zum anderen minimieren diese Biopolymere unspezifische Wechselwirkungen der Probenmatrix mit dem Transducer. Diese Wechselwirkungen

3 Material und Methoden

haben einen negativen Einfluss auf Messungen mit markierungsfreien Methoden.

1. Reinigung und Aktivierung

Zur Reinigung und Aktivierung werden die Glastransducer ca. 30-60 s lang in 6 M KOH gelegt und danach gründlich mit Reinstwasser gespült. Im Anschluss werden die Transducer für 15 min in frisch hergestellter Piranha-Lösung im Ultraschallbad aktiviert. Die Piranha-Lösung enthält 3 Teile rauchende H_2SO_4 und 2 Teile H_2O_2 . Beim Mischen der beiden Chemikalien entsteht Peroxomonoschwefelsäure, die stark oxidierend wirkt. Es bilden sich Silanolgruppen an der Glasoberfläche. Die aktivierten Transducer werden dann mit Reinstwasser gründlich abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

2. Silanisierung

Zur weiteren Verarbeitung werden die Transducer mit einem Epoxysilan modifiziert. Die kovalente Anbindung des verwendeten Silans geschieht über eine Kondensationsreaktion mit den Silanolgruppen der aktivierten SiO_2 -Schicht des Transducers. Zur Silanisierung werden 10 μl bzw. 100 μl GOPTS auf die RIfS- respektive iRIfS-Transducer aufgebracht und 1 h in einer luftgefüllten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu werden die Plättchen im Sandwichverfahren verarbeitet, d.h. die zu beschichtenden Seiten werden dabei aufeinandergelegt, wobei sich die Inkubationslösung zwischen den Transducern befindet. Anschließend wird das nicht reagierte GOPTS mit wasserfreiem Aceton sorgfältig abgespült und die Transducer im Stickstoffstrom getrocknet. Die Epoxygruppen auf der Oberfläche sind hydrolyseempfindlich, deshalb müssen die Transducer rasch weiter verarbeitet werden.

3. Immobilisierung des Biopolymers

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Biopolymere, Aminodextran (AMD) und Polyethylenglycol (PEG) zur Beschichtung der Transducer verwendet.

a) Immobilisierung von Aminodextran

In der Arbeit kamen zwei verschiedenen Aminodextrane zum Einsatz. Diese unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Aminogruppen im Polymer. Bei AMD10 sind 10 %, bei AMD50 50 % der Hydroxylgruppen des Polymers in Aminogruppen umgewandelt. Beide AMD werden in einer Konzentration von 1 mg pro 10 μl in Reinstwasser gelöst. Auf die RIfS-Transducer werden davon 10 μl , auf die iRIfS-Transducer 100 μl pro Sandwich aufgebracht. Die Transducer werden über Nacht (mind. 6 h) in einer wasserdampfgesättigten Kammer inkubiert. Anschließend wird das nicht gebundene AMD mit Reinstwasser abgespült und die Transducer werden im Stickstoffstrom getrocknet.

b) Immobilisierung von Diaminopolyethylenglycol

Das Diaminopolyethylenglycol (PEG) wird in Dichlormethan (DCM) gelöst (4 mg PEG auf 1 ml DCM). Pro RIfS-Transducer werden 15 μl und pro iRIfS-Transducer 120 μl der Lösung aufgebracht. Die Lösung wird durch vorsichtiges Schwenken des Transducers gleichmäßig verteilt, bis das Lösemittel vollständig verdampft ist. Die kovalente Anbindung des Polymers erfolgt im

Ofen bei 80°C über Nacht. Das überschüssige PEG wird anschließend gründlich mit lauwarmem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die mit Polymer beschichteten Transducer sind mehrere Wochen bei 4°C lagerfähig und können zur Anbindung von (Bio)-Molekülen verwendet werden.

4. Anbindung eines Liganden an die Transduceroberfläche

Die beiden oben beschriebenen Biopolymere tragen beide Aminogruppen, an die Liganden z.B. über Carboxyfunktionen angekoppelt werden können. Alternativ können auch aminofunktionalisierte Liganden angebunden werden, nach dem die Aminogruppen des Polymers in Carboxygruppen umfunktionalisiert wurden.

a) Anbindung von Biotin

Die Anbindung von Biotin erfolgt über die Carboxygruppe des Moleküls über Aktivesterchemie. TBTU reagiert mit Carboxygruppen zu einem Aktivester. Dabei abstrahiert die Base Diisopropylethylamin (DIPEA) das Proton der Carboxyfunktion und erleichtert so den nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Säure auf das Carbeniumion des TBTU. Der Aktivester bildet sich unter Abspaltung eines Benzotriazolderivats. Zur Biotinylierung der Transducer wird 1 mg Biotin in 25 µl trockenem DMSO und 1,4 mg TBTU in 25 µl trockenem DMSO hergestellt. Diese beiden Lösungen werden gemischt und 4 µl DIPEA dazugegeben. Pro Transducersandwich werden 10 µl bzw. 100 µl für RIfS bzw. iRIfS-Transducer aufgebracht und 4 h in einer mit DMSO-Dampf gesättigten Kammer inkubiert. Anschließend werden die Transducer mit DMSO und Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

b) Anbindung von Proteinen mittels Aminogruppen

Hierfür werden die Aminogruppen des Polymers in Carboxyfunktionen umgewandelt. Dazu wird eine Glutarsäureanhydrid-Lösung (2 mg Glutarsäureanhydrid pro 1 µl trockenem DMF) hergestellt und in denselben Volumina wie die Biotinlösung im Sandwichverfahren auf die Transducer aufgebracht. Die Inkubation beträgt mind. 6h, danach werden die Transducer mit DMF und Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Anbindung des Proteins werden die Carboxygruppen mittels Aktivesterchemie aktiviert. Dazu werden die Plättchen im Sandwichverfahren mit einer NHS-DIC Lösung (5,7 mg NHS auf 38 µl DMF und 12 µl DIC) 4 h in einer DMF-Dampf gesättigten Kammer inkubiert. Die Transducer werden abschließend mit DMF und Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Proteine können nun in wässriger Lösung aufgebracht werden. Die Anbindung des Proteins erfolgt schließlich über die Bildung einer Amidbindung.

3.2.2 Immobilisierung von biotinylierten Peptiden

Die biotinylierten Peptide werden über Streptavidin an ebenfalls biotinylierte PEG- oder AMD-Oberflächen angebunden. Hierbei wird ausgenutzt, dass Streptavidin vier Bindestellen für Biotin besitzt. Die Kopplung kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen.

a) **Offline-Immobilisierung**

Bei der Offline-Immobilisierung erfolgt der Schichtaufbau sukzessive: Nacheinander werden $4 \mu\text{l}$ einer Streptavidin und $10 \mu\text{l}$ der Peptidlösung (beide 1 g/l in PBS) im Sandwichverfahren auf die biotinylierte Sensoroberfläche aufgebracht. Die Inkubationszeit für das Streptavidin beträgt 1 h bei Raumtemperatur und für die Peptid-Lösung mindestens 12 h bei 4°C . Ungebundenes Material wird jeweils mit PBS abgespült.

b) **Online-Immobilisierung**

Für die Online Immobilisierung ist eine Vorinkubation von Streptavidin und Peptid notwendig. Dieser Komplex wird im Fluss durch die ASIA-Fluidik über die Sensoroberfläche gepumpt und bindet dann durch die freien Bindestellen des Streptavidins an die biotinylierte Sensoroberfläche. Es werden verschiedene molare Mischungsverhältnisse an Streptavidin-Peptid verwendet. Für einen zweifachen molaren Überschuss an Peptid werden $2.24 \mu\text{l}$ Peptidlösung (0.1 g/l) mit $4 \mu\text{l}$ Streptavidinlösung (1 g/l) gemischt. Für einen vierfachen Überschuss wird entsprechend die doppelte Menge an Peptidlösung verwendet. Die Mischung wird 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Immobilisierung wird die Lösung mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und durch die ASIA-Fluidik über die Sensoroberfläche gepumpt.

3.2.3 Spotting

Die Peptide werden, wie in der Online-Immobilisierung, als Peptid-Streptavidinkomplexe auf die biotinylierten und mit PEG oder AMD beschichteten Transduceroberflächen aufgebracht. Der Ablauf insgesamt ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

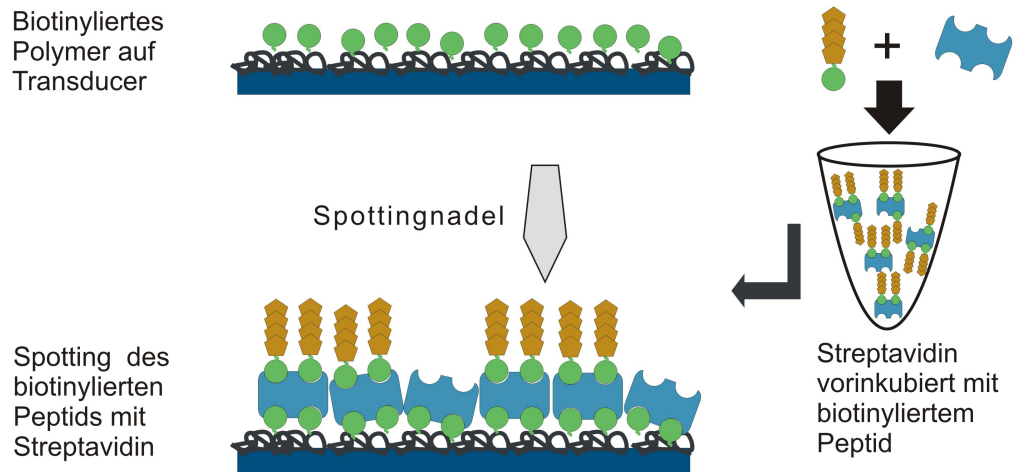


Abbildung 3.1: Ablauf des Spotting der Peptidarrays

Zur Herstellung der Spottinglösung werden das Peptid und das Streptavidin im molaren Verhältnis $1:4$ gemischt und 1 h bei Raumtemperatur vorinkubiert. Im Anschluss wird die Peptid-Streptavidin-Lösung mit PBS verdünnt. Die Vortests hatten ergeben, dass

die Spotmorphologie von der Proteinkonzentration abhängt. Deshalb wurde bei niedrigen Streptavidinkonzentrationen BSA zugesetzt, um ein optimales Spottingergebnis zu gewährleisten. In Tabelle 3.7 ist das entsprechende Pipettierschema gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen der Lösungen sind 0.1 g/l Peptid in PBS für die Peptidlösung und 1 g/l Streptavidin- und BSA-Lösung.

Tabelle 3.7: Pipettierschema für die Streptavidin-Peptidlösung

Endkonzentration Streptavidin [g/l]	Streptavidin [μ l]	Peptid [μ l]	BSA [μ l]	PBS [μ l]	V_{ges} [μ l]
0.25	5	0.6	0	5.4	11
0.1	2	0.24	5	3.8	11.04
0.05	1	0.12	5	4.9	11.02

Anschließend wird die Protein- oder Peptidlösung mit einem Spottingpuffer gemischt. Durch den Spottingpuffer wird die Oberflächenspannung und Viskosität der Lösung eingestellt. Damit wird eine optimale Benetzbarkeit der Transduceroberfläche erreicht. Zudem können dem Spottingpuffer Zusätze beigemischt werden, die Proteine stabilisieren und z.B. das Denaturieren beim Abtrocknen der Spots verhindern.

Die vorbereitete Streptavidin-Peptid-Lösung wird in die Mikrotiterplatte pipettiert und dann im Verhältnis 11:9 mit Spottingpuffer gemischt, so dass die gewünschten Endkonzentrationen an Protein/Peptid bzw. Spottingpuffer erhalten werden (siehe Tabelle 3.8). In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Spottingpufferzusammensetzungen getestet. Wenn nicht anders aufgeführt, wird zum Spotten der Peptidarrays ein PBS-Puffer mit einer Endkonzentration von 0.01% CHAPS (ein zwitterionisches Detergenz) als Spottingpuffer verwendet. Die Ausgangskonzentration des Spottingpuffers betrug 0.02% CHAPS in PBS. Abschließend wurde die Mikrotiterplatte 1 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und bis zur Verwendung im Spotter auf Eis gelagert.

Tabelle 3.8: Pipettierschema zum Herstellen der Spottinglösung

Endkonzentration Streptavidin [g/l]	Protein- lösung [μ l]	Spotting- puffer (0.02%) [μ l]
0.05	11	9
0.1	11	9
0.2	11	9

Zum Spotten der Slides wird der BioOdysseyTM CalligrapherTM MiniArrayer der Firma BioRad verwendet. Dieser Spotter arbeitet im Kontaktdruckverfahren. Das heißt, zum Spotten wird eine Keramiknadel verwendet, die die Probe vom Voratsgefäß auf den Ar-

3 Material und Methoden

ray überträgt und dabei die Arrayoberfläche berührt. Zur Herstellung der Arrays wird in diesem Fall die sogenannte *solid pin* verwendet. Diese kompakte Nadel überträgt die Probe direkt, ohne sie in einer internen Kapillare zwischenzuspeichern. Das Spotvolumen beträgt 0.5-1 nL.

Die optimale Luftfeuchtigkeit für ein gutes Spottingergebnis beträgt 55% rel. Luftfeuchte. Die Arbeitsplatte, auf der die Slides während des Spottingvorgangs lagern, wird mit einer Kühlmitteltemperatur von 10°C betrieben. Als Probenhalter für die Spottinglösungen dient eine 384 well Mikrotiterplatte (MTP). Das Probenvolumen pro well beträgt 20 µl. Pro Probe werden mehrere Replikate gespottet: Die Peptidarrays werden mit jeweils vier Replikaten, die Arrays zum Testen der optimalen Spottingbedingungen mit je sechs Replikaten pro Probe gespottet. Der Spotabstand beträgt jeweils 900 µm. Die Replikate der ersten Probe wurden nicht mit in die jeweilige Auswertung einbezogen.

Die einzelnen Replikate einer Probe werden ohne dazwischenliegende Waschschriffe gespottet. Zwischen den einzelnen Proben erfolgt die Reinigung der Nadel im Durchfluss mit filtriertem Reinstwasser, dann im statischen Waschbad mit Waschpuffer (10% EtOH und 0,1 % Tween[®]20 in Reinstwasser). Abschließend wird nochmals mit Reinstwasser im Durchfluss nachgespült. Gespottet wird auf mit NHS-DIC aktivierte, sowie auf biotinylierte AMD- oder PEG-Oberflächen.

3.2.4 Proteinlabeling mit Cy5

Zum Testen der optimalen Spottingbedingungen wurde mit Cy5 gelabeltem BSA gearbeitet. Das Fluoreszenzlabeln von 1 mg BSA erfolgte mit dem Cy5 bis-Reactive Dye Pack von Amersham/GE Healthcare gemäß den Anweisungen des Herstellers, außer dass als Konjugationspuffer PBS pH 7.4 statt Carbonatpuffer verwendet wurde. Die Aufreinigung erfolgte mit SEPHADEX Säulen. Im Anschluss wurde der Labellinggrad mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers gemäß den Angaben im Labelingprotokoll bestimmt.

3.2.5 OnChip Peptidsynthese

Die Herstellung der FLAG-Peptid Arrays erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Chip-Based Peptide Libraries am DKFZ in Heidelberg“. Prinzipiell erfolgt die Synthese der Peptide direkt auf dem Chip nach der Merrifield-Festphasensynthese (Berg u. a., 2013). Dabei kommt eine Variante der von Frank (Frank, 2002) entwickelten SPOT-Synthese zum Einsatz. Bei der Spotsynthese werden die entsprechenden Aminosäurederivate in einem flüchtigen Lösemittel ortsgerichtet auf das Arraysubstrat aufgedruckt und die entsprechenden Schritte der Aminosäurekopplung und Abspaltung der Schutzgruppen durchgeführt. Im Fall der von Breitling et. al (Breitling u. a., 2009) entwickelten partikelbasierten Synthese von Peptid-Arrays werden die Aminosäurederivate nicht in flüssigem Lösemittel aufgebracht, sondern in Tonerpartikel verpackt. Die Adressierung der Partikel auf der Substratoberfläche erfolgt mittels eines Laserdruckers oder eines Mikrochips mit adressierbaren Mikroelektroden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in Schirwitz et al. (Schirwitz u. a., 2009)

3.2.6 Messungen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie

Der apparative Aufbau ist in Abbildung 3.2 gezeigt und besteht aus einer Halogenlampe als Weißlichtquelle, die über ein Linsensystem in einen Y-Lichtleiter eingekoppelt wird. Über diesen Lichtleiter wird das Licht zum Transducer geleitet und senkrecht eingestrahlt. Über den zweiten Arm des Lichtleiters wird das reflektierte Licht in ein Diodenarray-Spektrometer zur Detektion eingeleitet. Die Probenhandhabung und Fluidiksteuerung erfolgt mittels einer automatisierten Fluidik und einem automatischen Probengeber. Zur Aufzeichnung der Signale und zur Auswertung der Daten standen zwei im Arbeitskreis Gauglitz entwickelten Softwarepakete zur Verfügung. Zur Datenaufzeichnung und Steuerung der Fluidik wurde das Programm *measure* verwendet, zur Auswertung der Interferenzspektren und der Onlinedarstellung der Bindungsdaten auf dem PC das Programm *ifz* (Brecht, 1993).

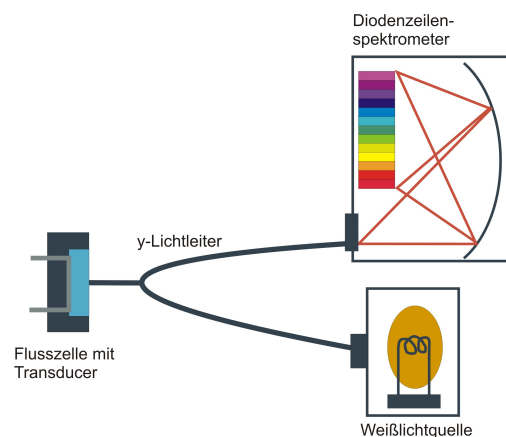


Abbildung 3.2: Aufbau des spektralen RIFs

Für die Erfassung der Messdaten mittels des Diodenarrayspektrometers wird zuerst die sogenannte „Integrationszeit“ bestimmt. Das ist die Zeit, die benötigt wird, bis eine der Dioden eine maximale Intensität von ca. 13000 counts erreicht. Desweiteren ist als Randparameter festgelegt, dass alle fünf Sekunden ein Messpunkt aufgenommen werden soll. Aus der zuvor ermittelten Integrationszeit und dem Fünfsekunden-Messintervall ergibt sich dann eine Anzahl an Messwerten, die pro fünf Sekundenintervall gemittelt werden können. Diese Messdaten werden dann von der Software aufgezeichnet. In einem weiteren Schritt erfolgt eine Korrektur der Messwerte um den Dunkelstrom des Spektrometers und um eine Referenzmessung. Die Referenzmessung wird mit einem Referenzplättchen aufgenommen. Dieses besitzt im Prinzip den gleichen Schichtaufbau wie der Transducer, nur dass ihm die Interferenzschicht aus SiO_2 fehlt. Durch diese Korrektur wird das charakteristisch modulierte Interferenzspektrum erhalten und es können die Änderungen der Reflektivität aufgrund von Änderungen der Schichtdicke oder des Brechungsindex der sensitiven Schicht verfolgt werden.

3.2.7 Imaging Reflectometric Interfererence Spectroscopy (iRIFS)

Der Messaufbau für das iRIFS-System besteht aus einer 14 bit CCD-Kamera, einem telezentrischen, koaxialen Objektiv mit polarisierendem Strahlteiler und einem $\lambda/2$ -Plättchen, einer LED, sowie entsprechenden Fluidikkomponenten. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Die genaue Bezeichnung der verwendeten Geräte findet sich in Tabelle 3.5. Das Licht wird über die LED in das Objektiv eingestrahlt, an dem Schichtsystem des Transducers reflektiert und über den Strahlteiler der Kamera zugeführt. Durch den Strahlteiler gelangt nur Licht zur Kamera, dessen Polarisation um 90° phasenverschoben ist, bezogen auf die Polarisationsrichtung, wenn das Licht aus dem Objektiv austritt. Ohne $\lambda/2$ -Plättchen ändert sich die Polarisationsrichtung durch die Reflexion am Transducer um 180° und kein Licht würde in die Kamera gelangen. Durch das eingebaute $\lambda/2$ -Plättchen wird die Polarisation so gedreht, dass das Licht 90° phasenverschoben ist und deshalb über den Strahlteiler zur Kamera hin gelangen kann. Die Ansteuerung der Kamera erfolgt mit der mitgelieferten Software CamWare, die Fluidiksteuerung mittels *measure*. Für die jeweilige Messung wird die Belichtungszeit angepasst, um eine gute Signaldynamik zu erzielen und eine Übersteuerung der Sensorpixel zu vermeiden. Diese wird so gewählt, dass die maximale Intensität auf der Arrayfläche bei 14000 counts lag. Desweiteren wird mit einer Aufnahmefrequenz von 30 Bildern pro Sekunde gemessen. Diese werden in einem ersten Verrechnungsschritt intern gemittelt, so dass die Kamera ein Bild pro Sekunde abspeichert.

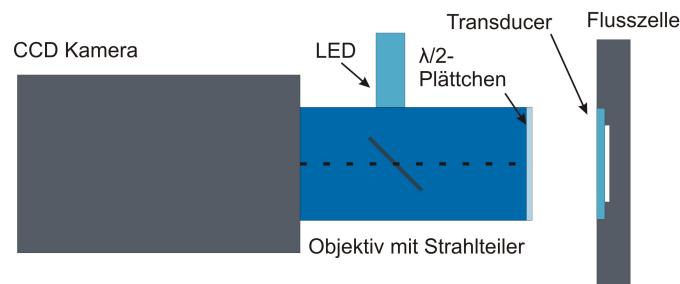


Abbildung 3.3: Aufbau des iRIFS

3.2.8 RIFS und iRIFS Messungen

In Tabelle 3.9 sind die verwendeten Messbedingungen für das RIFS- und iRIFS-System zusammengefasst. Die Reduktion des Probenvolumens beim iRIFS erfolgt, damit der Antikörperverbrauch bei den kinetischen Messungen reduziert werden kann. In beiden Systemen wird die sensitive Schicht vor der Messung einmal mit Regenerationslösung regeneriert, um eventuelle Rückstände der Präparation zu entfernen.

3.2.9 Datenaufbereitung der iRIFS-Messungen

Die Auswertung der Kamerabilder des iRIFS-Systems erfolgt im ersten Schritt mittels einer selbstgeschriebenen Routine für die Software imageJ (Fechner, P. und Lämmle, D.

Tabelle 3.9: Übersicht über die verwendeten Messbedingungen im RIfS- und iRIfS-System

		RIfS	iRIfS
verwendete Lösungen	Laufpuffer	PBS	PBS
	Probenpuffer	PBS	PBS mit 0.1 g/l BSA
	Regeneration	10 mM Glycin pH2	10 mM Glycin pH2
Probenvolumen		1000 μ l	500 μ l
Pumpge- schwindigkeit	für Injektion	30 μ L/min	30 μ L/min
	für Dissoziation	240 μ L/min	240 μ L/min
Vorbehandlung vor erster AK-Messung		Regeneration mit Glycin	Regeneration mit Glycin

unveröffentlichte Daten). Diese Routine erlaubt das Auslesen der Spots eines gemessenen Arrays und des umliegend Hintergrundes. Zur Festlegung des Auswerterrasters erfolgen Angaben über die Lage des Arrays anhand dreier Referenzspots und die Größe der Spots. Das Raster wird dann über die Angabe der Spots pro Zeile und Spalte und deren Abstand vervollständigt. Zudem wird der Hintergrund berechnet. Dazu wird ein Kreisring in wenigen Pixeln Abstand um den Spot ausgewertet. Der direkte Bereich um den Spot wird nicht mit berücksichtigt. Die Angaben erfolgen mit Breite des inneren Rings und äußeren Rings. Im Falle der Transglutaminase-Arrays betragen die Werte acht Pixel für den inneren und 25 Pixel für den äußeren Ring.

Anhand dieses Rasters wird die mittlere Pixel-Intensität pro Spot- und Hintergrundfläche ermittelt. Die mittlere Intensität von Spot und Hintergrund werden zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung und der Anzahl zugrundeliegender Pixel in einer Ausgabedatei gespeichert.

In Excel werden die Daten anschließend weiterverarbeitet. Dazu wird für jeden Spot zu jedem aufgenommenem Zeitpunkt die relative Intensität zwischen Messspot und Hintergrund ermittelt. Um die Messungen dann miteinander vergleichen zu können, wird im Anschluss für jeden Messwert die Differenz zum ersten Messwert gebildet. Damit können von null ausgehend die Änderungen in der relativen Intensität verglichen werden.

3.2.10 Auswertung der kinetischen Messungen

Die kinetischen Messungen werden anhand der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Grundlagen ausgewertet. k_d wird aus der Anpassung der Exponentialfunktion (3.1) an die Dissoziationsphase erhalten. Es wurde hierfür ein globaler Fit verwendet, bei dem die Exponentialfunktion in Gleichung (3.1) gleichzeitig an die Dissoziationsphase aller Messungen angepasst wird. Zur Anpassung wurde der Levenberg-Marquardt Algorithmus

3 Material und Methoden

verwendet, eine nicht-lineare Anpassung gemäß der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

$$R(t) = A * e^{-k_d(t-t_0)} + B \quad (3.1)$$

Über B wird eine mögliche Rückbindung des Antikörpers an die Oberfläche parametrisiert.

Im Bereich der Assoziationsphase wird eine Exponentialfunktion der Form (3.2) angepasst. Dabei wird, wenn nicht anders vermerkt, ein Fitbereich von 100 Datenpunkten angepasst und alle Parameter für den Fit variabel gehalten. Bei der Auswahl des zu fitenden Bereichs ist, vor allem bei den niedrigeren Konzentrationen darauf zu achten, den Anfangsbereich der Assoziation nicht mit zu berücksichtigen, da hier noch Bedingungen des Massentransports vorliegen (lineare Anfangssteigung).

$$R(t) = A \left(1 - e^{-k_s(t-t_0)} \right) \quad (3.2)$$

Über die Auftragung von k_s gegen die eingesetzte Antikörperkonzentration wird dann k_a aus der Steigung ermittelt (siehe Gleichung (2.7)). Dabei kann k_d sowohl aus dem Ordinatenabschnitt von Gleichung (2.7), als auch direkt aus Gleichung (3.1) gewonnen werden. Letztere Möglichkeit ist weniger fehlerbehaftet und deshalb zu bevorzugen. In der hiervorliegenden Arbeit wird der aus (3.1) ermittelte Werte k_d in Gleichung (2.7) eingesetzt und k_a mit festgesetztem Ordinatenabschnitt ermittelt.

Alternativ zur Ermittlung von k_a über die Linearisierung kommt in dieser Arbeit auch die Berechnung der Ratenkonstante über einen globalen Fit zum Einsatz. Dieser ist ab der Softwareversion Origin 8.1 möglich. Dabei wird k_a über die gleichzeitige Anpassung einer Exponentialfunktion (Gleichung (3.3)) an die Assoziationsphase jeder Konzentration ermittelt. Dies ist möglich, wenn die Gleichung (2.7) für k_s in Gleichung (3.2) eingesetzt wird. Wobei k_d zuvor aus der Dissoziationsphase ermittelt wird und als fester Parameter in den Fit eingeht. Ebenso werden die eingesetzten Rezeptorkonzentrationen vorgegeben. Damit kann k_a bestimmt werden, ohne eine Linearisierung vornehmen zu müssen.

$$R(t) = A \left(1 - e^{-(k_a * c + k_d)(t-t_0)} \right) \quad (3.3)$$

4 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein System zur kinetischen Analyse von Peptid-Arrays mittels bildgebender Reflektometrischer Interferenzspektroskopie untersucht. Um parallelisierte, zeitaufgelöste Messungen von Peptidarrays kinetisch auswerten zu können, müssen einige Rahmenbedingungen beachtet und experimentell analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen in diesem Teil der Arbeit vorgestellt und diskutiert werden.

4.1 Oberflächenchemie und Peptid-Immobilisierung

Bei der Verwendung von markierungsfreien, optischen Methoden zur Analyse von biomolekularen Wechselwirkungen wird jegliche Interaktion an oder mit der Oberfläche detektiert. Gerade Proteine zeigen eine starke Tendenz, unspezifisch an Glas- oder auch Kunststoffoberflächen zu adsorbieren. Zur Minimierung solcher Wechselwirkungen werden die Transduceroberflächen mit verschiedenen Polymeren beschichtet. In dieser Arbeit wurden zur Beschichtung der Transducer Dextrane oder Polyethylenglycol verwendet. Diese Polymere sind vielfach in der Literatur auf ihre abschirmende Wirkung hin beschrieben worden (Jonkheijm u. a., 2008, Angenendt u. a., 2003).

Desweiteren ist bei der Immobilisierung von Biomolekülen zu beachten, dass ihre native Struktur erhalten bleibt, da nur so die entsprechende Wechselwirkung stattfinden kann. Prinzipiell gibt es unterschiedliche Immobilisierungsverfahren. Es besteht die Möglichkeit, Biomoleküle über verschiedene funktionelle Gruppen wie Amin-, Thiol- oder Carboxyfunktionen kovalent anzubinden (Kusnezow und Hoheisel, 2003, Kusnezow u. a., 2003). Diese kovalente Immobilisierung wurde nicht gewählt, da die verwendeten Peptide mit 15 Aminosäuren relativ kurz sind und dies die Gefahr birgt, dass eine kovalente Immobilisierung über funktionelle Gruppen der Aminosäureseitenketten geschieht, die für die Peptid-Antikörper-Interaktion nötig sind.

Eine andere Möglichkeit ist die Immobilisierung über Affinitätswechselwirkungen wie Biotin-Streptavidin, His-Tag oder GST (Hutsell u. a., 2010). In dieser Arbeit wurde die Immobilisierung der Peptide auf der Transduceroberfläche mittels der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung gewählt. Streptavidin besitzt vier Bindestellen für Biotin. Diese Wechselwirkung findet mit einer sehr hohen Affinität ($K_{aff} = 10^{14} - 10^{15} M$) statt, so dass die Dissoziation des Komplexes praktisch zu vernachlässigen ist. Die Peptide werden über Festphasensynthese hergestellt und können leicht mit einem biotinylierten Spacer modifiziert werden. Somit kann eine gerichtete Immobilisierung an der Transduceroberfläche erreicht werden.

4.1.1 Peptid-Immobilisierung

Die Peptid-Antikörper-Wechselwirkung wird sowohl durch die Menge an immobilisiertem Peptid, als auch dessen sterische Zugänglichkeit beeinflusst. Diese Faktoren lassen sich über die Wahl der Immobilisierungsstrategie und das zur Beschichtung verwendete Polymer beeinflussen. Die Immobilisierung der Peptide über Streptavidin-Biotin kann auf zwei Arten erfolgen (Abbildungen 4.1 und 4.2).

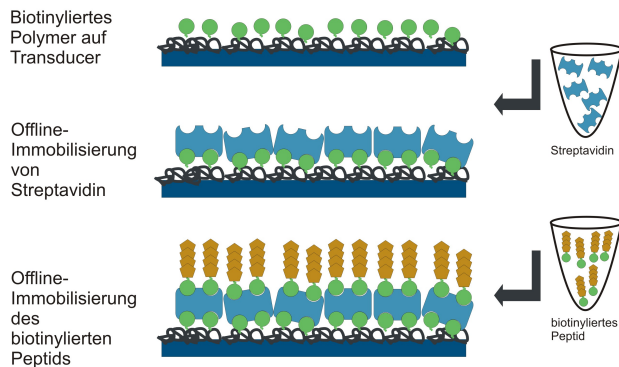


Abbildung 4.1: Offline-Immobilisierung des Peptids: An das biotinylierte Polymer (PEG oder AMD) werden in zwei nachfolgenden Schritten Streptavidin und das Peptid im Sandwichverfahren angebunden.

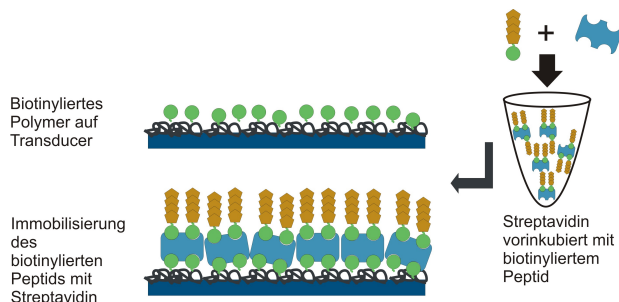


Abbildung 4.2: Online-Immobilisierung des Peptids: Zur Online-Immobilisierung werden Streptavidin und Peptid in einem bestimmten molaren Verhältnis vorinkubiert. Die Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes an das biotinylierte Polymer erfolgt dann mittels der ASIA-Fluidik.

Bei der Offline-Immobilisierung werden das Streptavidin und das Peptid in zwei aufeinanderfolgenden Schritten an das biotinylierte Polymer (PEG oder AMD50) im Sandwichverfahren angebunden. Bei der Online-Immobilisierung werden Streptavidin und Peptid in einem bestimmten molaren Verhältnis vorinkubiert. Die Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes an das biotinylierte Polymer erfolgt dann im Fluss über die ASIA-Fluidik. Bei der Online-Immobilisierung ist darauf zu achten, dass die Konzentration

4.1 Oberflächenchemie und Peptid-Immobilisierung

an biotinyliertem Peptid nicht zu hoch gewählt wird. Es dürfen nicht alle vier Bindestellen des Streptavidins mit biotinyliertem Peptid abgesättigt sein, damit der Komplex noch an die biotinylierte Oberfläche binden kann. Um eine optimale Immobilisierung des Peptid-Streptavidin-Komplexes zu erzielen wurden zwei verschiedene Mischungsverhältnisse (1:2 und 1:4) an Streptavidin-Peptid getestet. Die Oberflächen wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben präpariert. In Abbildung 4.3 sind die Anbindung von 0.3 mg/l anti-Transglutaminaseantikörpers an die peptidmodifizierten Transduceroberflächen gezeigt. Dabei wurde sowohl die Offline-Immobilisierung, als auch die Online-Immobilisierung untersucht.

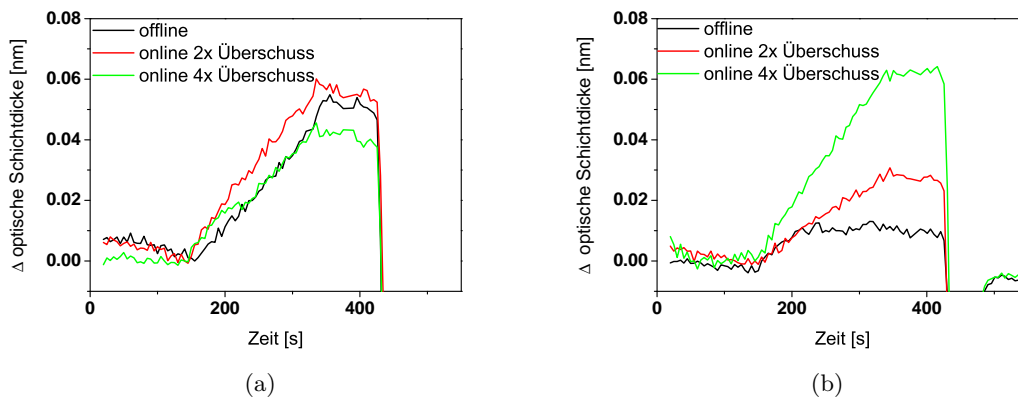


Abbildung 4.3: Vergleich der Antikörperanbindung bei vorhergehender Online- und Offline-Immobilisierung auf den beiden Polymeren AMD50 (a) und PEG (b). Bei der Onlineimmobilisierung wurde die Sensoroberfläche mit Streptavidin-Peptidkomplex im Verhältnis 1:2 und 1:4 präpariert.

Vergleicht man nun die Bindungssignale des Anti-Transglutaminaseantikörpers ergibt sich mit AMD50 als Beschichtungspolymer, dass mit beide Strategien in etwa die gleichen Anbindungssignale erhalten werden. Das Peptid kann mit beiden Methoden in ausreichender Menge und sterisch zugänglich immobilisiert werden. Vergleicht man die beiden Bindungskurven zur Online-Immobilisierung wird bei einem vierfachen Peptidüberschuss eine etwas geringere Anbindung des Antikörpers detektiert. Dies könnte an einer geringeren Menge an immobilisiertem Komplex liegen. Dagegen spricht jedoch, dass die Bindung des Streptavidin-Peptidkomplexes mit vierfachem Überschuss ein höheres Bindungssignal ergibt und somit eine größere Menge als bei zweifachem Überschuss gebunden wurde (Daten nicht gezeigt). Desweiteren ist es möglich, dass sterische Effekte eine Anbindung des Antikörpers erschweren. Dies kann durch Ausdünnen der Bindestellen auf der Oberfläche überprüft werden (siehe Abschnitt 4.1.2). Auch fluidische Effekte sind aufgrund der abknickenden Bindungskurve möglich.

Für PEG jedoch, erhält man bei der Online-Immobilisierung ein dreifach höheres An-

4 Ergebnisse und Diskussion

tikörperbindungssignal. Das lineare Bindungssignal bei der Online-Bindungskurve deutet auf weitere freie Bindestellen auf der Oberfläche hin, während bei der Offline-Immobilisierung die Gleichgewichtsbeladung annähernd schon erreicht ist (gekrümmte Bindungskurve).

Ein Grund hierfür kann eine sterische Hinderung der Anbindung von Streptavidinmolekülen an die Oberfläche sein. Dieses Phänomen ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden und tritt vor allem bei einer hohen Biotinbelegung der Oberfläche auf (Diamand und Christopoulos, 1991 und Spinke u. a., 1993). Möglich ist, dass dies bei der zweidimensionalen Oberflächenstruktur des PEG-Polymers der Fall ist, während die dreidimensionale Oberfläche des AMD50 flexibler ist und es zu keiner sterischen Hinderung der Anbindung kommt.

Zusammenfassung der Versuche zur Peptid-Immobilisierung

Die vorgestellten Versuche haben gezeigt, dass beide Polymere PEG und AMD50 für Messungen der Anti-Transglutaminase-Peptidwechselwirkung geeignet sind, wenn die Online-Immobilisierungsstrategie verwendet wird. Eine Präinkubation von Streptavidin und biotinyliertem Peptid bietet hinsichtlich der späteren Verwendung von Peptidarrays einen weiteren Vorteil. Andersen et al. (Andresen u. a., 2006) beschreiben eine Vereinfachung der Spottingprozedur durch die Präinkubation. Da die Molekulargewichte der Peptide im Vergleich zum Molekulargewicht des Streptavidins klein sind, werden die physikochemischen Eigenschaften vorwiegend durch das Streptavidin bestimmt. Dies ermöglicht eine Anpassung und Optimierung der Spottingbedingungen für dieses Protein und vermeidet, dass für jedes Peptid andere Spottingbedingungen (wie z.B. Spottingpuffer) verwendet werden müssen.

4.1.2 Vergleich verschiedener Polymere

Weisen Sensoroberflächen eine hohe Oberflächenbeladung an Ligand (hier Peptid) auf, kann es zu einer sterischen Hinderung der Antikörperanbindung kommen. Dies ist vor allem bei Polymeren mit hoher Bindungskapazität, wie AMD50, der Fall. Dann bindet auf einer Oberfläche mit vielen Bindungsstellen weniger Antikörper, als auf einer Oberfläche mit geringerer Anzahl an Bindungsstellen (Nygren u. a., 1987). Die Ursache hierfür liegt in Umorganisationsprozessen, die erst auf der Oberfläche stattfinden müssen, damit weitere Antikörper binden können. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden neben den bisher verwendeten Polymeren PEG und AMD50 mit 50% Aminofunktionen noch ein weiteres Aminodextran mit nur 10% Aminofunktionen getestet. Es erfolgte eine Online-Immobilisierung von 4 μg Streptavidin mit 0.48 μg Peptid 7 (Probenvolumen 1 ml) und eine anschließende Messung mit 0.8 mg/l α -Transglutaminaseantikörper. Die Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes und des Antikörpers sind in Abbildung 4.4 gezeigt.

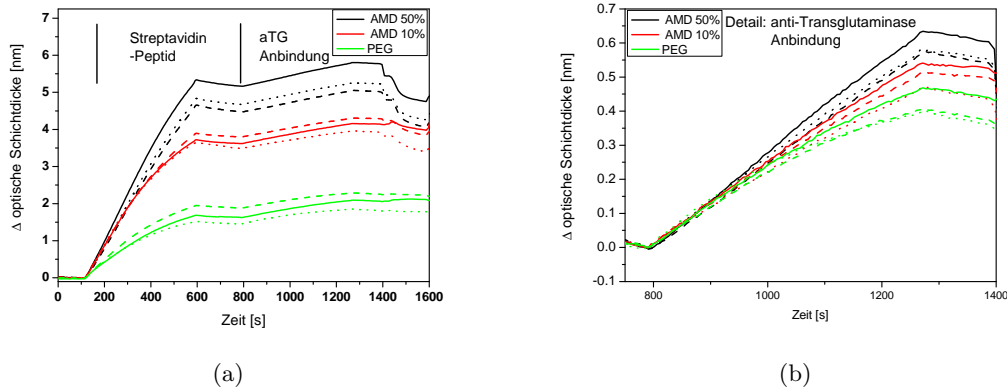


Abbildung 4.4: Vergleich der Bindungssignale der Online-Immobilisierung auf drei verschiedenen Oberflächenpolymeren (AMD50, AMD10 und PEG) auf Transducern aus RfS-Glas. Bindungskurven gleicher Farbe repräsentieren Dreifachmessungen. (a) Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes und nachfolgende Antikörperanbindung. (b) Ausschnitt der linksgezeigten Bindungskurve: Anbindung des anti-Transglutaminaseantikörpers.

Die Messungen in Abbildung 4.4 (a) ergaben deutliche Unterschiede in der Anbindungskapazität der Polymere für den Streptavidin-Peptidkomplex. Wie zu erwarten, zeigt PEG die geringste Anbindung und AMD50 die höchste (vergleiche (Piehler, 1997)). Wobei sich die Bindungskurve bei PEG und AMD10 zum Ende der Injektion hin abflacht, was auf ein baldiges Erreichen der Gleichgewichtsbeladung bei der hier eingesetzten Konzentration an Streptavidin-Peptidkomplex schließen lässt. Diese wird bei AMD50 noch nicht erreicht.

Ähnliches spiegelt sich auch in der Anbindung des Antikörpers wieder (Abbildung 4.4 (b)). Sie ist für PEG am niedrigsten und AMD50 am höchsten, wobei auch hier bei PEG ein Abflachen zum Ende hin zu sehen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die untersuchten Bedingungen keine sterische Hinderung der Antikörper-Anbindung bei AMD50 vorliegt, da mit diesem Polymer kein geringeres, sondern ein höheres Bindungssignal als mit den anderen beiden Polymeren erreicht wird.

Zusammenfassung der Versuche zum Vergleich verschiedener Polymere

Generell können alle drei Polymere zur Immobilisierung und der Detektion verwendet werden. Eine sterische Hinderung der Antikörperanbindung ist bei allen drei Polymeren nicht zu erwarten. Sie unterschieden sich in der Oberflächenbeladung und der für die Antikörperanbindung zu erwartenden Signalthöhe. Für parallelisierte kinetische Messungen ist hier zwischen einer guten Signalintensität, wie sie bei AMD50 erhalten wird und

einer niedrigen Oberflächenbeladung im Falle von PEG abzuwägen. Für die abschließende Auswahl des geeigneten Polymers muss außerdem noch das Verhalten der beiden Polymere beim Spotten untersucht werden. Dies wird in Kapitel 4.3 diskutiert.

4.1.3 Spezifität der Anbindung

In einem weiteren Schritt wurde die Antikörper-Peptidwechselwirkung auf ihre Spezifität untersucht, ebenso wurden die unspezifischen Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche analysiert. Ein wichtiger Test auf die Spezifität einer Wechselwirkung ist zu zeigen, dass die Wechselwirkung mit der peptidmodifizierten Oberfläche gehemmt werden kann, sofern der Antikörper zuvor mit Peptid in Lösung abgesättigt wurde. Die Bindestellen des Antikörpers sollten dann alle besetzt sein, so dass keine spezifische Wechselwirkung mehr mit dem immobilisierten Peptid stattfinden kann. Für die Messungen wurde eine anti-Transglutaminasekonzentration von 0.3 mg/l mit 1 μ g Peptid 7 versetzt und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vermessen. Abbildung 4.5 zeigt, dass die Hemmbarkeit der Wechselwirkung auf beiden Polymeroberflächen gegeben ist. Der leichte Anstieg des Signals bei der PEG-Oberfläche ist eher auf Druckschwankungen zu Beginn der Probeninjektion zurückzuführen.

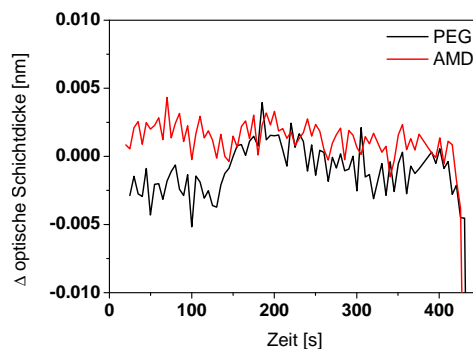


Abbildung 4.5: Hemmbarkeit der Peptid-Antikörperwechselwirkung auf AMD50 und PEG: Die Bindestellen des Antikörpers wurden zuvor in Lösung mit Peptid abgesättigt, so dass dieser nicht mehr an das Peptid auf der Transduceroberfläche binden kann. Die Hemmbarkeit der Anbindung ist ein Hinweis auf eine spezifische Interaktion der beiden Bindungspartner

Die unspezifische Wechselwirkung der Oberfläche wurde auf zweifache Weise untersucht. Zum einen wurde die Wechselwirkung der Peptidoberfläche mit 1 g/l Ovalbumin (OVA), einem Testprotein, untersucht, zum anderen die Wechselwirkung mit unverdünntem fötalem Kälberserum (FCS). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 gezeigt.

Beide modifizierten Polymere zeigen praktisch keine Wechselwirkung mit OVA in der eingesetzten Konzentration. Bei AMD50 ist eine geringe Änderung der Schichtdicke erkennbar, was entweder auf eine geringe Wechselwirkung schließen lässt oder durch ein

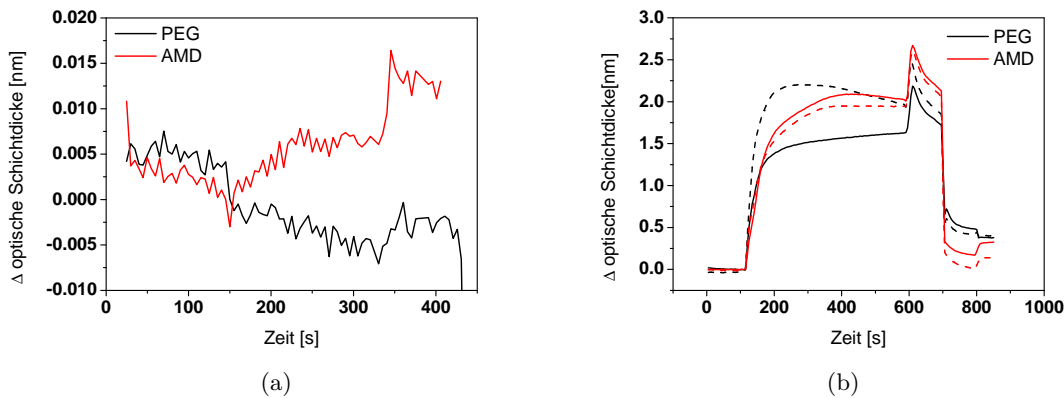


Abbildung 4.6: Vergleich der unspezifischen Wechselwirkungen verschiedener proteinhaltiger Lösungen auf den beiden modifizierten Polymeren PEG und AMD50. (a) Test der Anbindung einer OVA-Lösung (1 g/l). (b) Test der Anbindung von reinem FCS. Dargestellt sind hier je zwei Messungen (gestrichelte und durchgezogene Linie) auf beiden Polymeren.

verstärktes Aufquellen von AMD50 in der Gegenwart von Proteinen hervorgerufen wird (Piehler, 1997). Bei PEG ist ein leichter Drift des Signals zu erkennen. Die geringe Wechselwirkung der beiden modifizierten Polymere steht im Einklang zu vorhergehenden Untersuchungen, wo beide Polymere sehr geringe Wechselwirkungen mit OVA aufwiesen (Piehler, 1997). Auch andere Gruppen beschreiben die Eignung von z.B. PEG-Oberflächen für die Herstellung von Antikörper-Arrays mit guten Signalintensitäten und niedrigen Detektionsgrenzen (Angenendt u. a., 2003).

Dagegen zeigen beide Oberflächen deutliche Wechselwirkungen mit unverdünntem FCS. Die in die Sättigung laufenden Bindungssignale sind typisch für unspezifische Wechselwirkungen. Im Mittel unterscheiden sich die beiden Signale hinsichtlich ihrer Wechselwirkungsfähigkeit nicht. Bei den hier gezeigten Messungen streuen die Bindungssignale auf PEG tendenziell stärker als auf AMD50. Denkbar ist, dass die Präparation der AMD50-Transducer in wässriger Phase einheitlichere Oberflächenschichten liefert, als die Präparation von PEG Oberflächen mit leichtflüchtigem DCM.

Neben einer optimierten Oberflächenchemie, stellen Referenzierungsverfahren eine Möglichkeit dar, die unspezifischen Anteile des Bindungssignals zu berücksichtigen. Sie erlauben dennoch Messungen in Serum oder anderen komplexen Matrices durchzuführen. Zur Signalauswertung wird das Signal eines Referenzspots mit einberechnet und so eine optimale Auswertung der Daten ermöglicht (Frostell-Karlsson u. a., 2000 und Rich und Myszka, 2000).

Zusammenfassung der Versuche zur Spezifität der Anbindung

Für beide Oberflächen konnte eine Inhibition gezeigt werden. Die Bindestellen des Antikörpers sind blockiert und können nicht mehr an die peptidmodifizierte Oberfläche binden. Darüber hinaus kann keine unspezifische Wechselwirkung des Antikörpers mit der Oberfläche detektiert werden. Desweiteren ist die unspezifische Wechselwirkung mit OVA gering. Für Messungen in komplexen Matrices muss gegebenenfalls auf Referenzierungsverfahren zurückgegriffen werden. Die endgültige Wahl des Polymers erfolgte, nachdem die Eignung beider Polymere für den Spottingprozess zur Herstellung ortsaufgelöster Oberflächen untersucht wurde (siehe Kapitel 4.3).

4.2 Wahl der geeigneten Transducer für das iRIfS-System

Hinsichtlich der Messungen mit dem iRIfS-System, einem 1λ -Gerät, ist desweiteren eine optimale Wahl des zu Grunde liegenden Transducersystems nötig. Um eine optimale Auswertung der Bindungssignale zu erreichen, sollte ein praktisch linearer Zusammenhang zwischen gemessener Reflektivität und optischer Schichtdicke gelten. Dieser Bereich ist wellenlängenabhängig und ist um den Wendepunkt zwischen den alternierenden Minima und Maxima gegeben. Diese Voraussetzung für den optimalen Messbereich muss bei 1λ -Messungen für jedes Interaktionssystem überprüft werden. (Nopper, 2000).

4.2.1 Simulation der Reflektivitätsänderung in Abhängigkeit der Schichtdicke

Zum Abschätzen der zur Auswertung geeigneten Wellenlänge wurde eine Simulation des entsprechenden Glassubstrates mit der Software FilmWizard durchgeführt. Dabei wurde die Schichtdicke von 0-100 nm variiert. Eine Dextranschicht quillt auf ca. 30 nm im feuchten Zustand. Bindet Protein an das Dextran, quillt das Polymer nochmals auf eine Gesamtdicke von 60 nm (Hearty u. a., 2012). Bei PEG ist eine Dicke von 30 nm zu erwarten (Duburcq u. a., 2004). Hinzu kommen Schichtdickenänderungen durch die Anbindung der Biomoleküle (Streptavidin, Peptid und Antikörper) um ca. 20 nm. Dabei fließen folgende Größenabschätzungen mit in die Rechnung ein: Abmessungen von Streptavidin: ca. 5 nm (Arakaki u. a., 2004), Länge der Peptidkette mit 15 Aminosäuren entlang der Amidbindungen max. 3 nm, Größe eines Antikörpers: ca. 10 nm. Damit ergibt sich, dass eine Linearität von ca. 30 nm bis 80 nm gewährleistet sein sollte.

In Abbildung 4.7 sind Simulationen über die erwartete Reflektivitätsänderung für Schichtdicken zwischen 0 und 100 nm bei RIfS- und Goetheglas dargestellt.

Die Simulation zeigt, dass bei unterschiedlichen Wellenlängen eine lineare Abhängigkeit im gewünschten Schichtdickenbereich für die beiden Glassubstrate erhalten wird. Bei RIfS-Glas ist sie im blauen Bereich bei ca. 455 nm zu finden, bei Goetheglas bei längeren Wellenlängen (520-530 nm) im grünen Spektralbereich. Die jeweils anderen simulierten Wellenlängen sind zur Auswertung nicht geeignet, da im erwarteten Schichtdickenbereich

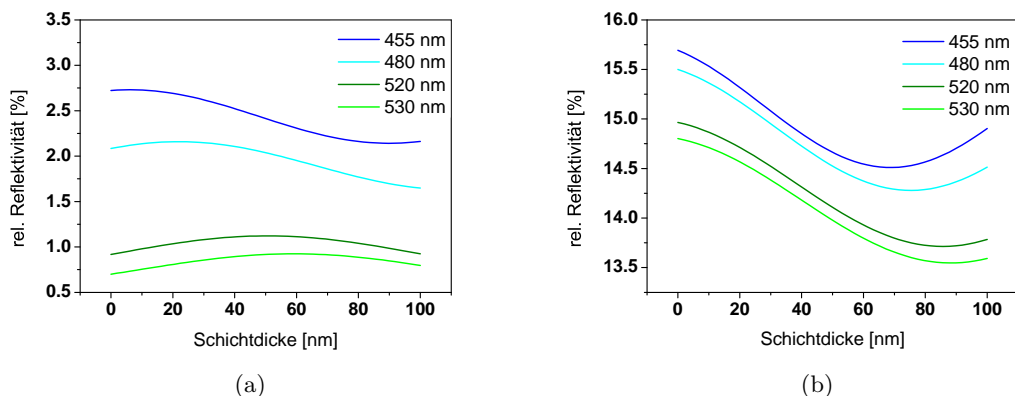


Abbildung 4.7: Vergleich der Reflektivitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen in Abhängigkeit der Schichtdickenänderung von 0 bis 100 nm für RIfS-Glas (a) und Goetheglas (b)

ein Extrempunkt durchschritten wird. Die Simulationen zeigen auch, dass mit den zur Verfügung stehenden Transducern maximal eine Schichtdickenänderung von ca. 50 nm erfasst werden kann. Bei beiden Systemen würden größere Änderungen bedeuten, dass die Reflektivität bei dem simulierten Wellenlängenbereich einen Extrempunkt erreicht oder überschreitet.

Die Simulationen zeigen zudem, dass bei der Verwendung von Goetheglas generell höhere Reflektivitäten als bei RIfS-Glas erhalten werden. Dadurch kann man ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erzielen (Markovic, 2008). Desweiteren ist beim Goetheglas eine höhere Sensitivität im Bereich des linearen Verlaufs der Reflektivität gegeben, da die Steigung der Kurve um den Wendepunkt für Goetheglas höher ist, als für RIfS-Glas.

4.2.2 Experimentelle Untersuchung zur Eignung von Goetheglas als Transducermaterial und Vergleich mit RIfS-Glas

Die Eignung von Goetheglas als Glassubstrat zur Detektion der anti-Transglutaminase-Peptidwechselwirkung für die 1 λ -Messungen wurde nochmals im Spektralen-RIfS überprüft. Dazu wurden Messungen auf Goetheglastransducern im Spektralen-RIfS durchgeführt. Es erfolgte eine Online-Immobilisierung von 4 μg Streptavidin mit 0.48 μg Peptid 7 (Probenvolumen 1 ml) und eine anschließende Messung mit 0.8 mg/l anti-Transglutaminaseantikörper. Die Auswertung der Messdaten erfolgte bei einer Wellenlänge von 518 nm aus den *measure*-Daten. Verglichen wurden die Bindungssignale des Streptavidin-Peptidkomplexes, sowie des anti-Transglutaminaseantikörper auf den Polymeren AMD50 und PEG auf Goetheglas und RIfS-Glas. Die Bindungsdaten sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Für Goetheglas wurden die Bindungssignale invertiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

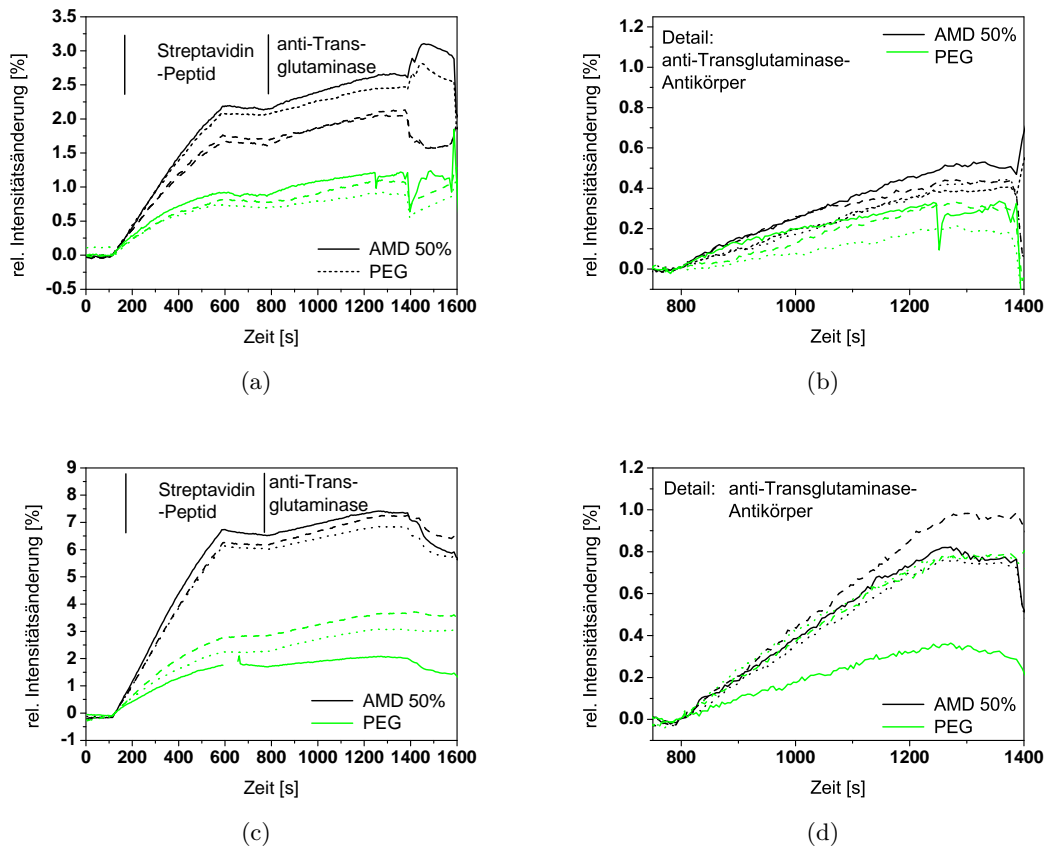


Abbildung 4.8: Vergleich der Bindungssignale auf Goetheglas (a und b) sowie RfS-Glas (c und d). Es wurden die beiden Oberflächenpolymeren AMD50 und PEG verwendet. Dargestellt sind jeweils die Online-Immobilisierung des Streptavidin-Peptidkomplexes (a und c) und die Antikörperanbindung (b und d). Bindungskurven gleicher Farbe repräsentieren Dreifachmessungen. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 518 nm ausgewertet und die Signale auf Goetheglas invertiert.

Die Versuche ergaben, dass Messungen auf Goetheglas als Transducermaterial möglich sind und sowohl die Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes, als auch die des Antikörpers bei einer Wellenlänge von 518 nm detektiert werden können.

Für die Online-Immobilisierung des Streptavidin-Peptidkomplexes auf PEG wird, wie erwartet, auch auf Goetheglas ein geringeres Bindungssignal als auf AMD50 erhalten. Auch werden tendenziell geringere Bindungssignale für die Antikörperanbindung detektiert als auf RfS-Glas, wobei die Signale auf RfS-Glas stärker variieren.

Generell fällt auf, dass die erzielten relativen Signaländerungen auf Goetheglas geringer

sind als auf RIfS-Glas. Jedoch ist auch das Rauschen des Signals auf Goetheglas geringer als bei den Messungen auf RIfS-Glas. Dies führt zu einem vergleichbaren Signal-Rauschverhältnis der beiden Transducer.

Die niedrigeren relativen Signale auf Goetheglas können darin begründet liegen, dass durch die schichtweise Immobilisierung der einzelnen Komponenten Schichtdicken im Bereich von ca. 80 nm erreicht werden, wenn AMD50 als Polymer verwendet wird. Vergleicht man diesen Wert mit der Simulation aus Abbildung 4.7 sieht man, dass der Kurvenverlauf für den Zusammenhang zwischen der Reflektivität und der Schichtdicke auf ein Minimum zuläuft und nur geringere Änderungen des Signals in Abhängigkeit der Schichtdicke zu erwarten sind.

Jedoch sollte dieser Effekt geringer ausgeprägt sein, wenn PEG als Polymer verwendet wird. Da dieses Polymer im Vergleich zu AMD50 weniger stark quillt, wäre dann ein höheres Signal für Antikörperanbindung zu erwarten gewesen. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden. Gemäß der Simulationen (Kapitel 4.2.1) sind auch für das Bindungsverhalten auf RIfS-Glas negative Bindungssignale zu erwarten, die in den Messungen nicht nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 4.7).

Diese Unterschiede zwischen Simulation und Experiment zeigen, dass Annahmen und Simulationen durch Messungen zu überprüfen sind. Die in Kapitel 4.2.1 angenommenen Schichtdicken für die einzelnen Schichten und das Quellverhalten können nur Richtwerte sein. Aufgrund der Messdaten ist es möglich, dass die realen Schichtdickenänderungen tatsächlich geringer sind. Möglicherweise sind auch Unterschiede in der Beschichtungseffizienz von Goethe- und RIfS-Glas verantwortlich für die Unterschiede in den relativen Signalen.

Zusammenfassung der Versuche zur Wahl der geeigneten Transducer für die 1λ -RIfS

Aufgrund der in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Vorteile von Goetheglas in Kombination mit einer LED im grünen Spektralbereich für 1λ -Messungen, und der erfolgreich detektierten Anbindung des Streptavidin-Peptidkomplexes und des Antikörpers wurde dieses System zur Detektion verwendet. Dieses System wurde gewählt, auch wenn eine Schichtdicke von 80 nm bei AMD50 als Beschichtung im Grenzbereich der detektierbaren Schichtdicken liegt. Durch nachfolgende Messungen wurde die Reproduzierbarkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Signale auf Goetheglas gezeigt, was die Eignung der Transducer zur Detektion bestätigt. Die Versuche und die Simulationen zeigen, dass das System zur Auswertung von 1λ - Messungen sorgfältig gewählt und die Ergebnisse der Simulation anhand von Messungen überprüft werden müssen.

4.3 Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation

Zur Analyse von Protein- oder Peptidarrays muss die Oberflächenmodifikation, insbesondere die Anbindung des entsprechenden Liganden, ortsaufgelöst erfolgen. Dazu stehen verschiedene Spottingssysteme zur Verfügung, die unterschiedliche Verfahren anwenden, um kleine Volumina im Nanoliterbereich auf die Transduceroberfläche aufzubringen. Generell unterscheidet man zwischen Kontakt- und Nichtkontaktdruckern (Müller und Röder, 2004).

Die Nichtkontaktdrucker arbeiten mit dem Injektverfahren der Tintenstrahldrucker, wobei mit Hilfe von Piezokristallen Pulse erzeugt werden, durch die Tropfen aus der Düse des Druckers gelöst werden. Die Vorteile dieses Druckverfahrens sind z.B. die hohen Geschwindigkeiten von bis zu 6000 Tropfen pro Sekunde, eine regelmäßige und reproduzierbare Spotmorphologie, sowie Spotvolumina im Picoliterbereich. Nachteilig ist, dass eine genaue Kalibrierung erfolgen muss und die Gefahr besteht, dass die Düsen verstopfen.

Das Kontaktdrucken ist das gebräuchlichere Verfahren. Die Kontaktdrucker arbeiten mit einer Nadel aus Keramik oder Stahl, die aus einem Vorratsgefäß Probe aufnimmt. Diese wird anschließend beim Kontakt der Nadel mit der Transducer-Oberfläche dort abgesetzt. Dabei stehen verschiedene Nadelsysteme zur Auswahl.

Die sogenannte *solid pin* stellt eine massive Nadel dar. Diese muss jedes Mal, bevor sie eine Probe auf dem Transducer absetzen kann, Lösung aus dem Vorratsgefäß aufnehmen. Kapillarnadeln haben, ähnlich eines Füllfederhalters, im Inneren eine Kapillare. In diese wird die Probe durch Kapillarkräfte aufgesaugt. Das erlaubt das Spotten von mehreren Spots hintereinander, ohne neue Probe aufnehmen zu müssen. Dies erspart Zeit, birgt aber die Gefahr, dass die Nadel verstopft.

In einem dritten System dem *ring pin system* wird die Lösung von einer Öse aufgenommen und ein Film in der Ösenöffnung gespannt. Dieser wird mit einer Nadel durchstoßen und so die Probe auf den Transducer aufgebracht. Hiermit können bis zu 100 Spots in einem Durchgang gespottet werden (Müller und Röder, 2004). In dieser Arbeit kam, wie in 3.2.3 beschrieben, ein Kontaktdrucker mit *solid pin* zum Einsatz.

Zur Analyse von Microarrays ist es essentiell, eine homogene und reproduzierbare Oberflächenmodifikation zu erhalten (Dugas u. a., 2005). Wesentliche Einflussfaktoren homogener Spotmorphologien sind Grenzflächenkräfte und hydrodynamische Parameter in Folge von Instabilitäten der Grenzfläche. Dabei kann es durch den sogenannten Maragnon-Effekt zu ungleichmäßigen Verteilungen der Stoffe in einer Probe kommen (Dugas u. a., 2005). Für die Spotmorphologie scheinen vor allem zwei Parameter ausschlaggebend zu sein: Zum einen die Evaporation von den Spoträndern und zum anderen das Anhaften von Material an der äußeren Spotgrenze „*contact line pinning*“ (Deegan u. a., 2000). Die Evaporation ist abhängig von den Oberflächeneigenschaften des Transducers, der Zusammensetzung der (Spotting)-Lösung und Umweltfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftdruck (Dugas u. a., 2005).

Das Spotting wird aber auch von den Eigenschaften und der Konzentration des zu dru-

ckenden Protein selbst beeinflusst. Einflussfaktoren können sein: Hydrophobie und Hydrophilie der Proteinoberfläche, Größe des Proteins sowie der jeweilige isoelektrische Punkt.

Für das Drucken der Arrays wurde der Einfluss der Umweltfaktoren im Vorfeld untersucht. Dabei stellte sich eine relative Luftfeuchtigkeit von 55% als geeignet heraus. Bei höherer Luftfeuchtigkeit konnte festgestellt werden, dass die Lösung beim Aufsetzen auf die Transduceroberfläche leicht spritzte. Dennoch kam es zu geringen Schwankungen der Luftfeuchtigkeit ($\pm 5\%$) und der Spottingkammertemperatur durch Variationen in den Umgebungsbedingungen, da kein vollklimatisierter Raum zur Verfügung stand. Die Temperatur des Kühlmittels im Spotter wurde auf $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt, was zu einer Temperatur in der Spottingkammer von ca. 18°C führte. Diese Temperaturen wurden gewählt, um zu vermeiden, dass die Proteine denaturieren.

In dieser Arbeit sollen vor allem die Ergebnisse vorgestellt werden, die durch die Variation verschiedener Spottinglösungen erhalten wurden. Dabei wurden verschiedene Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen untersucht. Desweiteren wurde die Art der Detergenzien und ihre Konzentration, sowie die Proteinkonzentration variiert.

Als Detergenzien kamen in dieser Arbeit verschiedene Stoffe zum Einsatz, die auch in der Molekularbiologie verwendet werden. Sie verbessern die Benetzbarkeit der Oberfläche und stabilisieren folglich den Tropfen beim Austrocknen. Somit können sie die Spotmorphologie verbessern und den Einfluss der Umgebungsbedingungen verringern (Dugas u. a., 2005).

- **Tween[®]20:** ein nichtionisches Detergenz aus der Gruppe der Polysorbate
- **CHAPS:** ein zwitterionisches Detergenz, das auch zur Aufreinigung von Membranproteinen verwendet wird
- **Octylglucosid:** ein nichtionisches Detergenz, das ebenfalls auch zur Aufreinigung von Membranproteinen verwendet wird
- **Triton[®] X-100:** ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate
- **Natriumdeoxychololat:** ein anionisches Tensid, das zur Zellyse und zur Solubilisierung von Membranproteinen verwendet wird

Um optimale Spottingergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Tests zuerst mit dem Modellprotein BSA und anschließend mit Streptavidin durchgeführt. Als Transduceroberflächen standen AMD50- und PEG-Oberflächen zur Verfügung. Die Immobilisierung der Proteine erfolgte entweder kovalent über Aktivesterchemie im Falle von BSA oder affinitätsvermittelt über Biotin im Falle von Streptavidin.

Die Spots wurden über den Zusatz von geringen Mengen (0.24 mg/l) Cy5 gelabeltem BSA sichtbar gemacht. Damit sind zwar nur indirekte Rückschlüsse auf die Proteinverteilung in der Probe zu treffen, dennoch erlaubt diese Methode eine erste Auswahl geeigneter Bedingungen, die dann in nachfolgenden Versuchen gegebenenfalls noch optimiert werden können.

4.3.1 Test verschiedener Spottingbedingungen für das Modellprotein BSA Einfluss der Proteinkonzentration und der Detergenzien

Ein wichtiger Parameter der Spottinglösung ist die verwendete Proteinkonzentration. Sie verändert die Viskosität (Auburn u. a., 2005). Übliche Konzentrationen liegen im Bereich von 1 g/l bis 0.1 g/l, zum Teil aber auch darunter (MacBeath und Schreiber, 2000, Kusnezow u. a., 2003).

In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Proteinkonzentration zwischen 0.1 g/l und 1 g/l BSA in PBS variiert. Desweiteren wurden vier Detergenzien (Tween[®]20, CHAPS, Octylglucosid und Triton[®] X-100) in einer Konzentration von 0.001% getestet. Gespottet wurden jeweils sechs Replikate pro Probe auf AMD50- und PEG-Oberflächen in jeweils 2 Arrays auf 2 Transducern. Aufgrund der guten Inter- und Intrachipreproduzierbarkeit ist jeweils nur ein Array gezeigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

Generell fällt auf, dass die Benetzbarkeit der PEG-Oberfläche im Vergleich zum AMD50 geringer ist. Insbesondere, wenn Tween[®]20 und Triton[®] X-100 in Kombination mit niedrigen Proteinkonzentrationen verwendet werden. Diese beiden Detergenzien sind für das Spotten auf PEG ungeeignet, da keine homogenen Spots entstehen.

CHAPS ergibt gleichmäßige Spots ab einer Proteinkonzentration von 0.25 g/l. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen kommt es zur „Donutbildung“. Für dieses Phänomen gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum einen können diese entstehen, wenn das Abtrocknen der Spots ungleichmäßig oder zu rasch erfolgt (Deegan u. a., 1997). Alternativ wird folgender Zusammenhang diskutiert: An der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit akkumuliert das Protein. Von dort aus kommt es zu einem Transport an den Rand des Tropfens und damit zu einer erhöhten Proteinkonzentration an den Spoträndern (Deng u. a., 2006).

Octylglucosid ist für alle verwendeten Proteinkonzentrationen geeignet. Mit zunehmender Proteinkonzentration ist eine Zunahme des Spotdurchmessers zu bemerken. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Reduktion der Oberflächenspannung mit höherer Proteinkonzentration zurückzuführen und steht im Gegensatz zu anderen Beobachtungen, bei denen eine Reduktion des Spotdurchmessers bei höherer Proteinkonzentration aufgrund erhöhter Viskosität beschrieben ist (Auburn u. a., 2005).

4.3 Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation

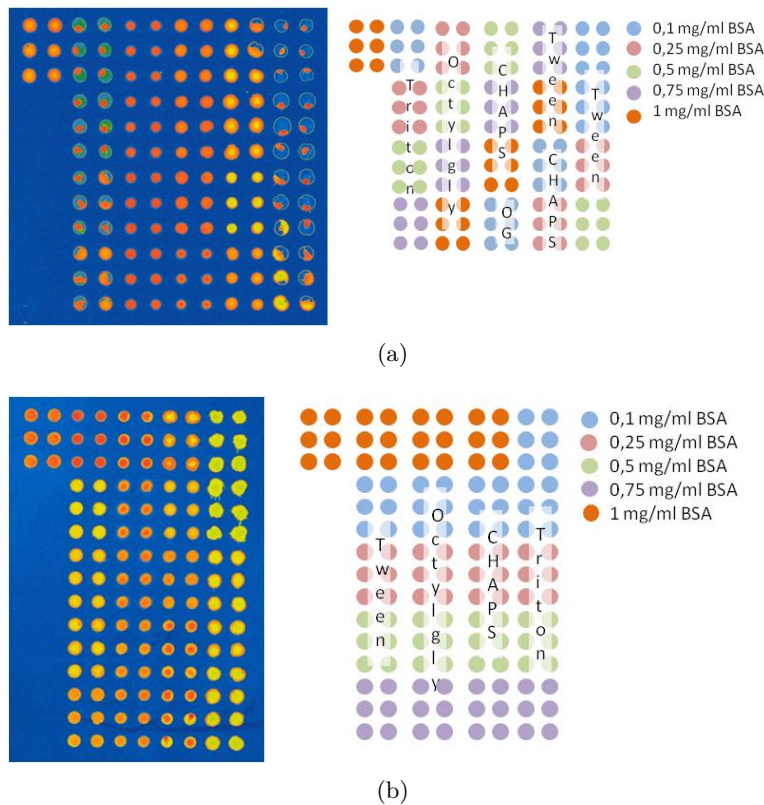


Abbildung 4.9: Variation der BSA-Proteinkonzentration sowie die Art des Detergenz: Die Proteinkonzentration wurde zwischen 0.1 g/l und 1 g/l BSA in PBS variiert. Desweiteren wurden vier Detergenzien (Tween[®]20, CHAPS, Octylglucosid und Triton[®] X-100) in einer Konzentration von 0.001% getestet. Gespottet wurde in jeweils sechs Replikaten pro Probe auf (a) PEG-Oberflächen und (b) AMD50-Oberflächen .

Bei AMD50 führt die Verwendung von Triton[®] X-100 ebenfalls zu unregelmäßigen Spots mit Donutbildung. CHAPS ergibt im Bereich kleiner Proteinkonzentrationen von 0.1-0.25 g/l regelmäßige Spots. Bei höheren Proteinkonzentrationen kommt es zur Aufkonzentration in der Spotmitte. Dieser Effekt geht ebenfalls auf ein ungleichmäßiges Abtrocknen der Spots zurück.

Octylglucosid und Tween[®]20 ergeben beide regelmäßige Spots. Bei der Verwendung von Octylglucosid ist zum Teil eine leichte Aufkonzentration in der Spotmitte zu bemerken, bei Tween[®]20 eine leichte Donutbildung ab Proteinkonzentrationen von 0.25 g/l.

Zusammenfassung der Versuche zum Einfluss der Proteinkonzentration und der Detergenzien

Für das Spotten auf PEG und AMD50 sind prinzipiell CHAPS und Octylglucosid geeignet. Für AMD50 kann auch Tween[®]20 verwendet werden. Triton[®] X-100 ist bei

4 Ergebnisse und Diskussion

beiden Oberflächen nicht geeignet. Die genaue Auswahl des Detergenz kann von der zu spottenden Proteinkonzentration abhängen. Generell war zu beobachten, dass der Spottedurchmesser mit zunehmender Proteinkonzentration und, im Falle von PEG als Oberflächenpolymer, auch die Benetzbarkeit der Oberfläche zunimmt.

Einfluss der Detergenzien- und Proteinkonzentration auf die Spotmorphologie beim Spotten von BSA

Neben dem reinen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Spotmorphologie wurde auch die Variation der Detergenzienkonzentration in Kombination mit der Proteinkonzentration untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Detergenzienkonzentrationen (0.005%, 0.01% und 0.02%) an Tween[®]20, CHAPS, Octylglucosid und Triton[®] X-100 ausgewählt und jeweils mit 0.1 g/l, 0.25 g/l sowie 0.5 g/l BSA getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 gezeigt.

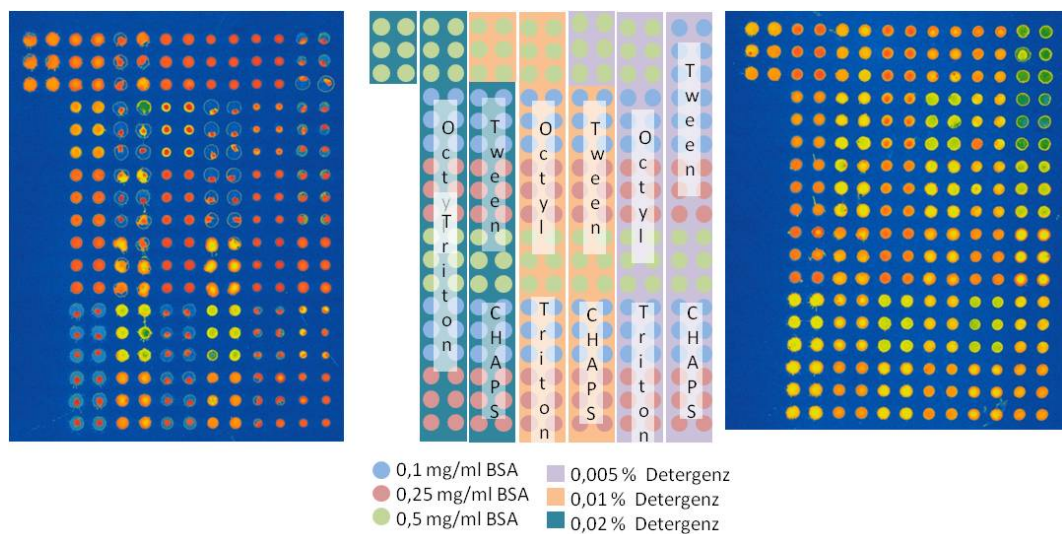


Abbildung 4.10: Einfluss der Detergenzien- und Proteinkonzentration auf die Spotmorphologie beim Spotten von BSA: In diesem Versuch wurden drei verschiedene BSA-Konzentrationen (0.1 g/l, 0.25 g/l und 0.5 g/l) mit jeweils drei verschiedenen Detergenzienkonzentrationen kombiniert. Wie im vorherigen Versuch kamen Tween[®]20, CHAPS, Octylglucosid und Triton[®] X-100 als Detergenzien zum Einsatz. Links sind die Ergebnisse auf PEG, rechts auf AMD50 dargestellt. In der Mitte ist das Spotting-Schema gezeigt.

Für PEG als Oberflächenpolymer ergeben niedrige Detergenzienkonzentrationen von 0.005% in Kombination mit höheren Proteinkonzentrationen von 0.5 g/l BSA gute Spotttingergebnisse.

Im Fall mittlerer Detergenzienkonzentrationen von 0.01% ergeben sich bei der Verwendung von Tween[®]20 mit allen Proteinkonzentrationen ungleichmäßige Spots zum Teil

mit Donutbildung. CHAPS ergab eine gute Spotmorphologie ab einer Proteinkonzentration von 0.5 g/l BSA und Octylglucosid ab einer Proteinkonzentration von 0.25 g/l.

Bei niedrigeren Konzentrationen kommt es zu einer Aufkonzentrierung in der Spotmitte. Triton[®] X-100 ist in dieser Konzentration insgesamt nicht geeignet, da es zu einer sehr inhomogenen Spotmorphologie kommt.

Detergenzienkonzentrationen von 0.02% sind auf PEG insgesamt nicht geeignet, da die Spots inhomogen werden und zum Teil ineinander verlaufen.

Mit AMD50 als Oberflächenpolymer erhält man, wie im Falle von PEG, ein zufriedenstellendes Spottingergebnis, wenn hohe Proteinkonzentrationen mit niedrigen Detergenzienkonzentrationen kombiniert werden. Dies gilt insbesondere wenn Tween[®]20 und Octylglucosid verwendet werden. Mit der mittleren Detergenzienkonzentration von 0.01% werden mit folgenden Kombinationen gute Ergebnisse erzielt: 0.01% Tween[®]20 und 0.5 g/l BSA, 0.01% CHAPS und 0.1 g/l, sowie 0.25 g/l BSA, 0.01% Triton[®] X-100 und 0.25 g/l BSA. Bei der Verwendung von Octylglucosid kommt es zu einer Aufkonzentrierung der Proteinkonzentration in der Spotmitte. Werden 0.02% Detergenz verwendet, steigt die Tendenz, dass die Spotform ungleichmäßig wird oder die Spottinglösung beim Aufsetzen der Nadel spritzt. Möglich ist die Kombination von 0.02% CHAPS mit 0.25 g/l BSA.

Zusammenfassung der Versuche zum Einfluss der Detergenzien und Proteinkonzentration

Die Ergebnisse zeigen, dass eine gezielte Auswahl und Kombination von gewünschter Protein- und Detergenzienkonzentration die Spotqualität deutlich verbessern kann. Tendenziell sind bei kleinen Proteinkonzentrationen höhere Detergenzienkonzentrationen besser geeignet. Zu hohe Detergenzienkonzentrationen können zu ungleichmäßigen Spots führen.

Einfluss verschiedener Puffer auf die Spotmorphologie

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss verschiedener Puffer auf die Spotmorphologie untersucht (siehe Abbildung 4.11). Dazu wurden Puffer bei verschiedenen pH-Werten verwendet. PBS bei pH7.4, MES bei pH6, HEPES bei pH7.4 und pH8. Desweiteren wurde der Zusatz von 150 mM NaCl zu den Puffern MES und HEPES untersucht. Die Ionenstärke spielt besonders bei Transduceroberflächen eine Rolle, bei denen das Protein nur adsorptiv angebunden wird, dennoch sind auch in Bezug auf die Spotmorphologie gegebenenfalls Effekte zu erwarten, wenn das Protein kovalent angebunden wird. Desweiteren beeinflusst die Salzkonzentration die Geschwindigkeit, mit der ein Spot austrocknet, wobei eine hohe Salzkonzentration zu schnellerem Austrocknen führt (Auburn u. a., 2005). Zusätzlich wurden auch hier die Detergenzien variiert. Die verwendete BSA-Konzentration betrug 0.25 g/l.

Generell konnte beobachtet werden, dass der pH-Wert der Spottinglösung einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Spotqualität hat. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kusnezow et al. (Kusnezow u. a., 2003). Dennoch kann der pH-Wert einen Einfluss auf die Kopplungseffizienz bei kovalenter Anbindung haben. So beschleunigen

4 Ergebnisse und Diskussion

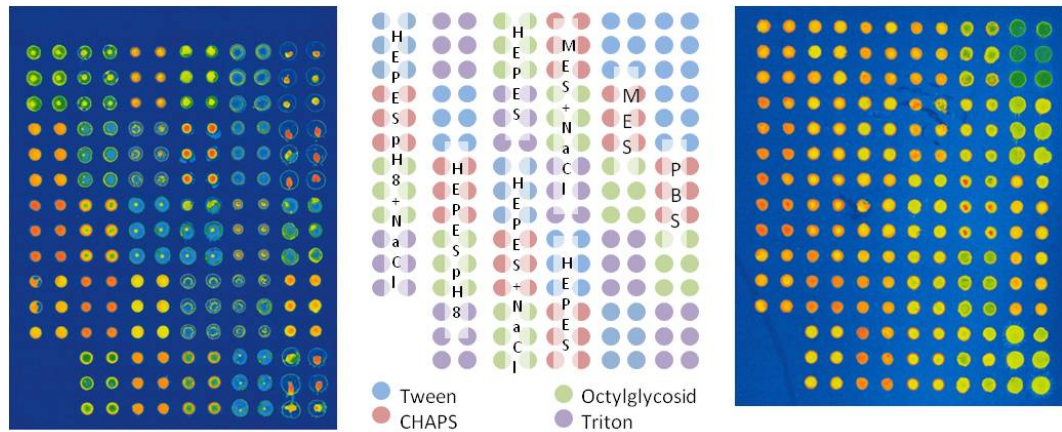


Abbildung 4.11: Einfluss verschiedener Puffer (PBS pH7.4, MES pH6, HEPES pH7.4 und pH8) mit und ohne Zusatz von 150 mM NaCl auf die Spotmorphologie beim Spotten von BSA. Variiert wurde zudem die Art des Detergenz (Tweent[®]20, CHAPS, Octylglucosid, alle 0.01%). Die Ergebnisse des Spottings auf PEG beschichteten Transducern sind links, die Ergebnisse auf AMD50 rechts gezeigt. Die Abbildung in der Mitte gibt ein Überblick über das Spottingschema.

höhere pH-Werte die unerwünschte Hydrolyse der gebildeten Aktivester (Hermanson, 2008). Die hier vorgestellten Versuche lassen allerdings keine Aussage über die Kopplungseffizienz des jeweiligen Proteins zu, sondern erlauben nur Aussagen über die Spotmorphologie. Die Kopplungseffizienz muss dann für jedes zu immobilisierende Protein angepasst werden.

Bei den Ergebnissen des Spottings auf PEG hat sich generell gezeigt, dass die Benetzbarkeit mit dem Zusatz von 150 mM NaCl zum Spottingpuffer verbessert werden kann. Mit HEPES als Spottingpuffer werden in Kombination mit Octylglucosid und CHAPS gute Ergebnisse erzielt. Triton[®] X-100 und Tweent[®]20 sind hier zum Spotten ungeeignet, da die Proteinverteilung der Spots unregelmäßig ist.

Mit PBS kann gegebenenfalls mit Octylglucosid gespottet werden, jedoch kommt es hierbei zu einer Konzentration des Proteins in der Spotmitte.

MES-Puffer ergibt unbefriedigende Spotttingergebnisse, da es entweder zur Donutbildung oder zur Aufkonzentration in der Spotmitte kommt. Ob dies an der Puffersubstanz MES oder am pH-Wert liegt, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Auch dieser Versuch bestätigt die bessere Benetzbarkeit von AMD50 im Vergleich zu PEG unter den gegebenen Bedingungen.

Bei der Verwendung von AMD50 als Oberflächenpolymer können in Abhängigkeit der Salzkonzentration nur bei MES Unterschiede in der Spotmorphologie festgestellt werden. Beim MES-Puffer bewirkt der Zusatz von 150 mM NaCl eine etwas homogenere Proteinverteilung in den Spots. Dennoch ergibt dieser Puffer nur in Kombination mit

CHAPS ein zufriedenstellendes Spottingergebnis.

Auch hier zeigt sich, dass HEPES-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gut zum Spotten geeignet ist. Es werden mit allen Detergenzien weitgehend homogene Spots erhalten. Lediglich mit Triton[®] X-100 kommt es zu einer leichten Donutbildung.

PBS ergibt auch hier homogene Spots in Kombination mit CHAPS und Octylglucosid.

Zusammenfassung der Versuche zum Einfluss verschiedener Puffer: Bei PEG zeigt sich eine Verbesserung der Benetzbarkeit durch den Zusatz von 150 mM NaCl zu den verschiedenen Spottingpuffern. Bei AMD50 ist dieser Effekt hingegen nur schwach ausgeprägt. Der pH-Wert spielt für die Spotmorphologie eine untergeordnete Rolle. Mit HEPES werden sowohl auf PEG, als auch AMD50 gute Spottingergebnisse erzielt. MES-Puffer scheint eher ungeeignet. PBS ergibt gute Ergebnisse mit bestimmten Detergenzien.

4.3.2 Test verschiedener Spottingbedingungen für das Modellprotein Streptavidin

Neben den Spottingversuchen mit dem Modellprotein BSA wurden im Folgenden Spottingversuche mit Streptavidin durchgeführt. Zur Herstellung von Peptidarrays soll am Ende ein Streptavidin-Peptidkomplex auf die Transduceroberfläche aufgebracht werden. Hierfür wurden zuerst geeignete Spottingbedingungen für das Streptavidin ermittelt und verschiedene Parameter, wie verschiedene Puffer, verschiedene Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen und die Streptavidinkonzentration variiert. Die so optimierten Bedingungen wurden anschließend überprüft, indem Streptavidin-Peptidkomplexe gespottet wurden.

Da sich in den vorangegangenen Versuchen mit BSA gezeigt hat, dass AMD50 unempfindlicher gegenüber den verschiedenen Spottingeinflüssen war als PEG, wurde als Oberflächenpolymer zum Spotten AMD50 verwendet. Um das reale System abzubilden, wurden für diese Versuche biotinylierte AMD50-Transducer verwendet.

Einfluss des Puffers und der Detergenzienkonzentration auf die Streptavidin-Spots

In einem ersten Versuch wurden die beiden verschiedenen Puffer 10 mM MES + 150 mM NaCl, pH6.0 sowie 10 mM PBS pH7 in Kombination mit verschiedenen Detergenzien untersucht (siehe Abbildung 4.12). Als Detergenzien wurden Tween[®]20, Triton[®] X-100, Natriumdeoxycholat, Octylglucosid und CHAPS in den Konzentrationen 0.005%, 0.01% und 0.05% verwendet. Die Streptavidinkonzentration betrug 0.25 g/l.

Der Puffer MES wurde getestet, obwohl die vorhergehenden Versuche mit BSA keine zufriedenstellenden Spottingergebnisse zeigten. Dennoch kam dieser Puffer zum Einsatz, da der isoelektrische Punkt von Streptavidin ungefähr in diesem Bereich liegt. Damit konnte überprüft werden, ob gegebenenfalls die Ladung des Proteins die Benetzungseigenschaften und somit die Spotmorphologie beeinflusst, und der Puffer mit Streptavidin bessere Ergebnisse erzielt als mit BSA.

4 Ergebnisse und Diskussion

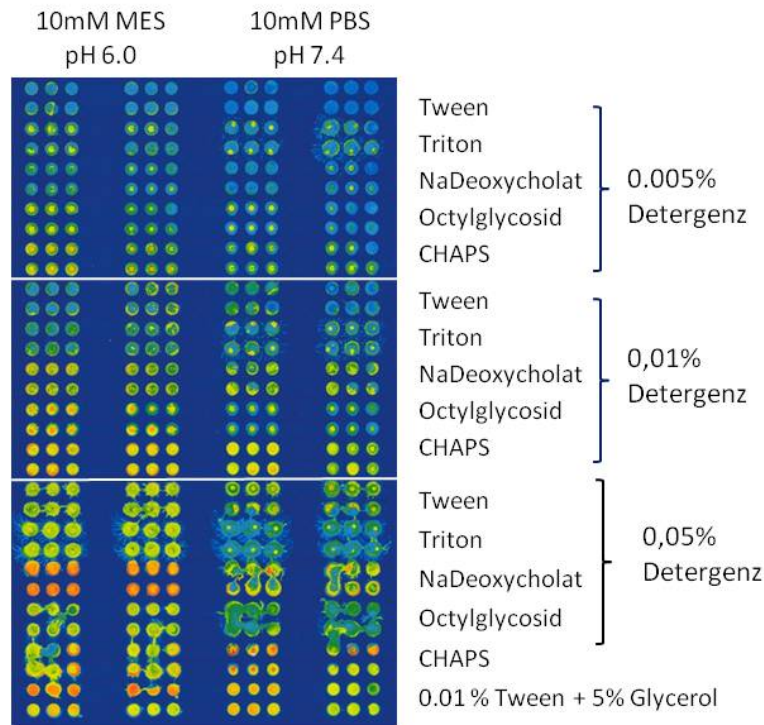


Abbildung 4.12: Einfluss des Puffers und der Detergenzienkonzentration auf die Spotmorphologie beim Spotten von Streptavidin: Als Spottingpuffer dienten PBS pH7 und MES pH6. Variiert wurde zu dem die Art des Detergenz (Tween[®]20, Triton[®] X-100, Natriumdeoxycholat, Octylglucosid und CHAPS) sowie deren Konzentration (0.005%, 0.01%, 0.05%). In der letzten Probe wurde der Zusatz von 5% Glycerol zum Spottingpuffer getestet. Die Proben wurden jeweils in sechs Replikaten auf AMD50 gespottet.

Die Spottingversuche ergaben, dass der eingesetzte Puffer keinen wesentlichen Einfluss auf die Spotmorphologie hat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Versuche weiterhin PBS verwendet, dessen pH-Wert dem physiologischen pH-Wert am nächsten liegt und mit BSA bessere Ergebnisse ergab. Bei den niedrigen Detergenzienkonzentrationen kam es bei allen Detergenzien zu einer Aufkonzentration der Proteinkonzentration in der Spotmitte. Bei der Verwendung von Triton[®] X-100 spritzte die Spottinglösung beim Aufbringen auf den Chip.

Für eine Detergenzienkonzentration von 0.01% konnten mit CHAPS vergleichsweise homogene Spots erzielt werden. Bei den anderen Detergenzien kam es zu einer Aufkonzentration in der Spotmitte.

Bei der Verwendung von 0.05% Detergenz kam es bei vielen Detergenzien zu einem Verlaufen der Spots, was eine zuverlässige Auswertung erschwerte. Tendenziell ist aber eine Detergenzienkonzentration von 0.05% zu hoch, um gleichmäßige Spots zu erhalten.

In der letzten Probe wurde zum Spottingpuffer mit Tween[®]20 noch 5% Glycerol hinzugefügt. Dieser Versuch wurde aufgrund verlaufender Spots nochmals getestet.

Zusammenfassung: Einfluss des Puffers und der Detergenzienkonzentration

Aufgrund der hier gefundenen Ergebnisse wurden in den weiteren Versuchen CHAPS mit einer Konzentration von 0.01% als Detergenz in PBS verwendet.

Einfluss des Puffers und der Proteinkonzentration auf die Streptavidin-Spots

Aufgrund der vorangegangenen Versuche wurden nun Spottingtests von verschiedenen Streptavidinkonzentrationen in 0.1 g/l, 0.25 g/l und 0.5 g/l Streptavidin mit 0.01% CHAPS durchgeführt. Daneben wurde der Zusatz von je 2% und 5% Glycerol im Spottingpuffer getestet (siehe Abbildung 4.13). Da die Spotmorphologie bei niedrigen Proteinkonzentrationen mit einer Detergenzienkonzentration von 0.01% nicht optimal war, wurde dem Spottingpuffer der 0.1 g/l Streptavidinlösung noch 0.25 g/l BSA zugesetzt. Durch die Verwendung von biotinylierter Oberflächen kommt es nur zur Anbindung von Streptavidin und nicht von BSA, so dass nur die Morphologie des Spots, nicht aber die Proteinkonzentration auf der Oberfläche beeinflusst wird.

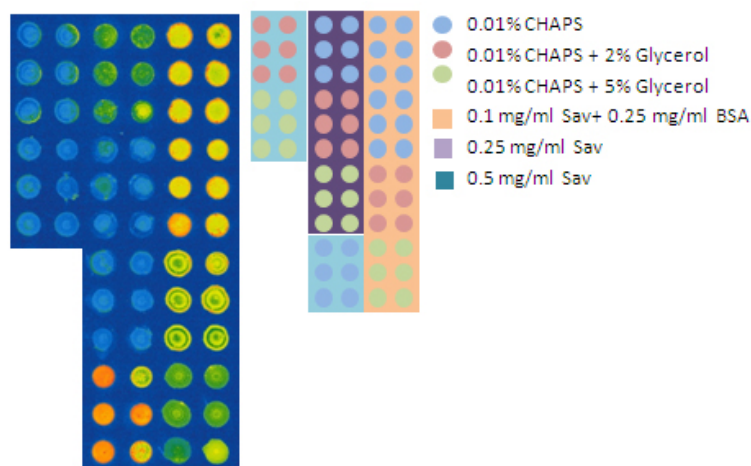


Abbildung 4.13: Einfluss des Puffers und der Proteinkonzentration auf die Spotmorphologie beim Spotten von Streptavidin (Sav). Es wurden drei verschiedene Streptavidinkonzentrationen gespottet (0.1g/l, 0.25 g/l und 0.5 g/l Streptavidin). Der niedrigsten Streptavidinkonzentration wurde noch 0.25 g/l BSA zugesetzt, um auch bei niedrigeren Streptavidinkonzentrationen homogene Spots zu erhalten. Desweiteren wurde der Zusatz von 2% und 5% Glycerol zum PBS-Puffer mit 0.01% CHAPS getestet.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.13 zeigen, dass mit dem Zusatz von 0.01% CHAPS bei den verschiedenen Proteinkonzentrationen ein akzeptables Spottingergebnis zu erreichen ist. Der Zusatz von 2% und 5% Glycerol führt zu einer ungleichmäßigeren Spotmorphologie.

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten aus Kusnezow et al. (Kusnezow u. a., 2003). Anderen Arbeitsgruppen dagegen arbeiten mit Spottinglösungen, die bis zu 40% Glycerol enthalten (MacBeath und Schreiber, 2000). Die hohe Glycerolkonzentration wird dort eingesetzt, um das Austrocknen der Spots zu verhindern. In den hier vorgestellten Versuchen ist festzustellen, dass das Waschen zwischen den Proben bei höher viskosen Lösungen, wie sie mit Glycerol erhalten werden, nicht ganz ausreicht, um Rückstände zu entfernen. Darauf können Inhomogenitäten in den Spots von 0.25 g/l Streptavidin mit 0.01% CHAPS zurückgeführt werden. Ebenso zeigen die Spots mit Glycerol geringere Signalintensitäten. Kusnezow et al. beschreiben, dass Glycerol auf den Farbstoff quenchend wirken kann (Kusnezow u. a., 2003).

Zusammenfassung: Einfluss des Puffers und der Proteinkonzentration

Die Verwendung von 0.01% CHAPS in PBS ist mit Proteinkonzentrationen zwischen 0.1 g/l und 0.5 g/l Streptavidin möglich. Der Zusatz von Glycerol ist bei den hier vorgestellten Versuchen nachteilig.

Spotting von Streptavidin-Peptidkomplexen unter Variation der Streptavidin-Konzentration

Für die Analyse von Peptidarrays soll nicht alleine das Streptavidin auf die Transduceroberfläche aufgebracht werden, sondern ein Streptavidin-Peptidkomplex. Um zu überprüfen, dass sich auch der Streptavidin-Peptidkomplex mit denen im vorangegangenen Abschnitt ermittelten Bedingungen gespottet werden kann, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Dabei wurden die Komplexe mit 0.5 g/l Streptavidin und 0.25 g/l Streptavidin jeweils mit einem 4-fachen molaren Überschuss an Peptid gespottet. Der Lösung mit 0.25 g/l Streptavidin wurde noch 0.25 g/l BSA zugesetzt. Gespottet wurde in PBS mit dem Zusatz von 0.01% CHAPS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

Der Versuch ergab keine wesentlichen Unterschiede im Spottingverhalten der verschiedenen Streptavidin-Peptidkomplexe. Dies stützt die These von Andresen et al. (Andresen u. a., 2006), dass die Spottingeigenschaften vorwiegend vom größeren Streptavidin und weniger von den kleineren Peptiden beeinflusst werden.

Die Versuche ergaben gute Spottingergebnisse für 0.25 g/l Streptavidin-Peptid, wenn 0.25 g/l BSA zugesetzt wurde. Die Spots sind für alle Peptide homogen. Das Spotten von 0.5 g/l Streptavidin-Peptid ergab leichte Inhomogenitäten beim Spotten. Dabei war aber keine eindeutige Tendenz zur Donutbildung oder Aufkonzentration in der Spotmitte festzustellen.

Zusammenfassung: Spotting von Streptavidin-Peptidkomplexen

Die Übertragung der Spottingbedingungen für Streptavidin auf das Spotten der Streptavidin-Peptidkomplexe ist möglich, so können die Spottingbedingungen mit geringerem Materialaufwand angepasst werden.

Die letztendliche Optimierung der Spottingbedingungen hat aber gegebenenfalls durch Messungen im iRiFS zu erfolgen. Die hier vorgestellten Versuche können jeweils nur Vor-

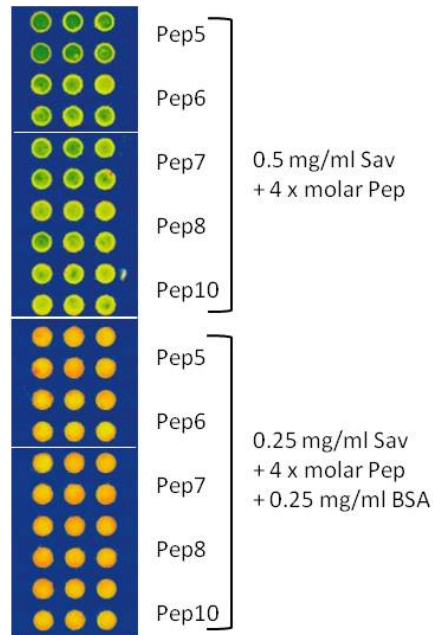


Abbildung 4.14: Spotting von Streptavidin (Sav)-Peptidkomplexen (Pep) in unterschiedlicher Streptavidinkonzentration. Gespottet wurden alle Streptavidin-Peptidkomplexe, die der spätere Array enthalten soll. Aufgrund vorangegangener Versuche wurde als Spottingpuffer PBS mit 0.01% CHAPS gewählt. Die Spottingkonzentration des Streptavidins betrug 0.5 g/l bzw. 0.25 g/l. Für die niedrigere Streptavidinkonzentration wurde getestet, wie sich der Zusatz von 0.25 g/l BSA zur Spottinglösung auf die Spotmorphologie auswirkt.

tests darstellen, da mit dem Zusatz von Cy5-markiertem BSA zur Visualisierung der Spots zwar eine Aussage über die Spotmorphologie, aber keine Aussage über die Funktionalität der Arrays getroffen werden kann. Ob die Antikörperanbindung möglich ist und die Funktionalität des Peptids bzw. Liganden nach dem Spotten noch gegeben ist, kann nur in einer Messung zum Beispiel mit dem iRIS-System überprüft werden, das die direkte Beobachtung der Peptid-Antikörperwechselwirkung erlaubt.

Zusammenfassung der Versuche zum Spotten von BSA und Streptavidin

Generell zeigen die beiden Versuchsreihen, dass für jede Transduceroberfläche und jedes Protein die entsprechenden Spottingbedingungen untersucht werden müssen. Aufgrund der komplexen Einflussfaktoren ist es nur schwer möglich, eine generelle Aussage über die Eignung eines bestimmten Spottingpuffers zu machen. Die Anpassung muss mit dem zu spottenden System durchgeführt werden (Auburn u. a., 2005).

4 Ergebnisse und Diskussion

Mit den hier gefundenen optimalen Spottingbedingungen für Streptavidin-Peptidkomplexe wurden im Folgenden Peptidarrays zur kinetischen Analyse der Peptid-anti-Transglutaminasewechselwirkung hergestellt und vermessen.

4.4 Auswahl geeigneter Messbedingungen zur kinetischen Analyse

Wie in Kapitel 2.3.1 dargestellt, hängt es von verschiedenen Faktoren ab, ob eine Anbindung eines Rezeptors an einen Liganden an der Oberfläche kinetisch oder diffusionskontrolliert verläuft. Die wichtigsten Einflussfaktoren wurden in dieser Arbeit untersucht: die Höhe der Diffusionsgrenzschicht, die über die Flussgeschwindigkeit und die Abmessungen des Flusskanals bestimmt wird, die Ligandkonzentration an der Oberfläche und die Analytkonzentration in Lösung.

Bevor die Peptid-anti-Transglutaminasewechselwirkung kinetisch analysiert wurde, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um geeignete Bedingungen für die kinetische Analyse wählen zu können. Dazu wurden die obengenannten Faktoren angepasst und optimiert.

4.4.1 Einfluss der Flusszellegeometrie

Für die Messungen am iRiFS-System standen zwei verschiedene Flusszellen zur Verfügung. Beide Flusszellen wiesen das gleiche 2D Profil auf. Es ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Die Flusszellen unterschieden sich jedoch im Material und entsprechend auch in der Art und Weise ihrer Abdichtung. Die Flusszelle aus PDMS wurde durch Andrücken im Randbereich des Transducers abgedichtet, während die Flusszelle aus PMMA mittels eines O-Rings abgedichtet wurde. Die Höhe des Flusskanals der PDMS-Flusszelle betrug circa $100\ \mu\text{m}$. Durch die Verwendung des O-Rings ergab sich eine größere Höhe der PMMA-Flusszelle im Vergleich zur PDMS-Flusszelle. Die Volumina der beiden Flusszellen wurden manuell, mit Hilfe einer Pipette, auf ca. $40\ \mu\text{L}$ für die PDMS-Flusszelle und ca. $350\ \mu\text{L}$ für die PMMA-Flusszelle geschätzt. Die Volumina unterscheiden sich um Faktor 8.75. Somit ist für die PMMA-Flusszelle bei sonst gleichen Abmessungen, eine Höhe des Flusskanals von circa $850\ \mu\text{m}$ anzunehmen.

Die beiden Flusszellen wurden auf ihre Eignung für kinetisch kontrollierte Messungen hin überprüft. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Vermessen wurden je Flusszelle zwei Transducer in Duplikatmessungen. Die Transducer waren mit einem Array aus 10×10 Spots des Peptids 7 mit einer Streptavidinkonzentration von $0.25\ \text{g/l}$ bespottet. Vermessen wurden die Arrays mit einer Antikörperkonzentration von $3\ \text{mg/l}$ anti-Transglutaminaseantikörper.



(a)



(b)

Abbildung 4.15: Vergleich der beiden Flusszellen: (a) Aufbau der PDMS-Flusszelle. (b) Aufbau der PMMA-Flusszelle

4 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 4.16 sind die Quotientenbilder (Grauwerte des Bildes zum Zeitpunkt 650 s durch Grauwerte zum Zeitpunkt 0 s) je einer Messung mit den beiden Flusszellen gezeigt. Die Bilder wurden für den Zeitpunkt 650 s erstellt, was dem Ende der Injektionsphase entspricht. Für die PDMS-Flusszelle sind per Auge keine Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Spots zu erkennen, während bei der PMMA-Flusszelle schon per Auge ein Intensitätsgradient von Einlassport (unten) zu Auslassport (oben) festzustellen ist.



Abbildung 4.16: Quotientenbilder der Anbindungssignale zum Zeitpunkt 650 s der beiden Flusszelle. (a) Messung mit der PDMS-Flusszelle. (b) Messung mit der PMMA-Flusszelle

Der deutliche Intensitätsgradient wird bestätigt, vergleicht man die Intensitätsprofile in Abbildung 4.17. Zur Erstellung dieser Profile wurden die Intensitätswerte je Spot im Zeitraum 900 s bis 920 s gemittelt. Dieser Zeitpunkt liegt am Ende der Dissoziationsphase, wenn nur noch geringe Änderungen in der Signalintensität zu beobachten sind. Somit können die Intensitäten der einzelnen Spots gut über einen Zeitraum von 20 sec gemittelt werden. Anschließend wurde der Mittelwert aller Spots über den gesamten Array gebildet und für jeden Spot die prozentuale Abweichung zu diesem Mittelwert aufgetragen. Diese Auswertung wurde für jede Flusszelle für jeweils zwei Messungen pro zwei Transducer, das heißt für insgesamt vier Messungen, durchgeführt. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Auswertung einer Messung.

Diese Auswertung bestätigte den Intensitätsgradienten für die PMMA-Flusszelle und ergab aber auch für die PDMS-Flusszelle Intensitätsunterschiede über den Array hinweg. Dennoch sind die prozentualen Abweichungen der Spotintensitäten vom Mittelwert bei der PDMS Flusszelle mit Werten zwischen +22% und -25% geringer als bei der PMMA-Flusszelle (+90% bis -60%). Bei den PMMA-Flusszellen konnte dieser Intensitätsabfall in Richtung Auslass der Flusszelle für alle vier Messungen bestätigt werden. Für die PDMS-Flusszelle hingegen konnte keine Regelmäßigkeit in den Schwankungen der Intensitätsverteilung für die vier Replikamessungen festgestellt werden. Die Bindungskurven

4.4 Auswahl geeigneter Messbedingungen zur kinetischen Analyse

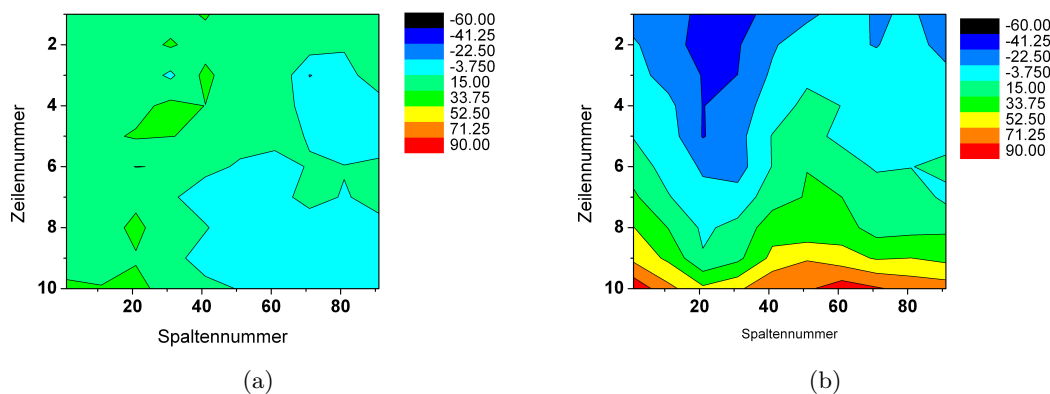


Abbildung 4.17: Prozentuale Abweichung der Intensitätswerte der Arrays zwischen den Zeitpunkten 900 und 920 s für (a) die PDMS-Flusszelle, sowie (b) die PMMA-Flusszelle

der PDMS-Flusszelle zeigen unregelmäßige Schwankungen aufgrund von inhomogenen Flussbedingungen.

Ursache dieses Gradienten in der PMMA-Flusszelle sind vermutlich Verarmungseffekte in der Diffusionsschicht. Diese ist bei der PMMA-Flusszelle um ca. Faktor vier höher, als bei der PDMS-Flusszelle. Bei der PMMA-Flusszelle nimmt die Konzentration des Antikörpers mit zunehmender Kontaktzeit mit der Arrayoberfläche ab, da immer mehr Antikörper an den Spots gebunden und über die Diffusion nur geringere Mengen an Antikörper nachgeliefert werden.

Bei der PDMS-Flusszelle sind diese Effekte aufgrund der geringeren Höhe nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse sind nach Gleichung (2.9) zu erwarten, da die Höhe des Flusskanals quadratisch in die Gleichung für die Höhe der Diffusionsschicht eingeht.

Hinsichtlich kinetisch-kontrollierter Messungen war es ebenfalls interessant, die Flussprofile der Bindungskurven in beiden Flusszellen miteinander zu vergleichen. Diese sind in Abbildung 4.18 beispielhaft für Spot 5 in Spalte 5 des Arrays in jeweils einer Messung mit der PMMA und der PDMS-Flusszelle gezeigt.

Die Flussprofile der beiden Flusszellen unterscheiden sich deutlich. Die Messungen mit der PMMA-Flusszelle weisen im unteren Bereich konkav verlaufende Bindungskurven auf. Dieser Effekt resultiert aus Verdünnungseffekten zu Beginn der Probeninjektion. Wenn die Probenfront auf den Laufpuffer trifft, kann es zu Verdünnungseffekten kommen, die diese Kurvenform ergeben. Bei der PDMS-Flusszelle ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier wird der Laufpuffer schnell genug durch die Probe verdrängt, so dass es nicht zur Durchmischung und damit zur Verdünnung kommt.

4 Ergebnisse und Diskussion

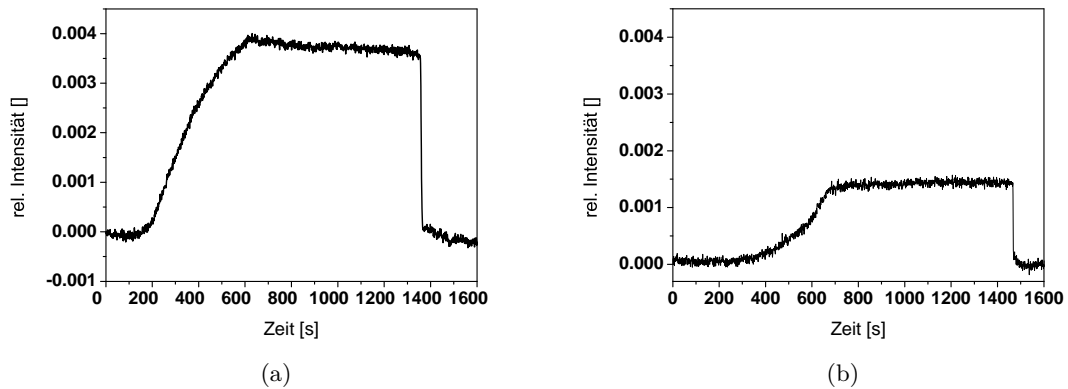


Abbildung 4.18: Vergleich der Flussprofile beider Flusszellen: (a) PDMS-Flusszelle und (b) PMMA-Flusszelle. Verglichen wird beispielhaft Spot 5 in Spalte 5 des Arrays. Die Nummerierung der Spalten erfolgte vom Auslass- zum Einlassport, die der Spots von links nach rechts.

Im weiteren zeitlichen Verlauf der Messung beobachtet man bei der PMMA-Flusszelle ein Flussprofil, das auf diffusionskontrollierte Bedingungen hinweist. Bei der PDMS-Flusszelle dagegen, findet bei der eingesetzten Antikörperkonzentration schon ein Übergang zu kinetisch kontrollierten Bedingungen statt.

Durch den Verdünnungseffekt und die diffusionskontrollierten Bedingungen in der PMMA-Flusszelle werden nur relative Intensitätsänderungen von 1,5% erreicht, während die Messung mit der PDMS-Flusszelle bei gleicher Antikörperkonzentration höhere Bindungssignale von ca. 3,5% ergibt.

Zusammenfassung: Einfluss der Flusszellgeometrie

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die PDMS-Flusszelle aufgrund der geringeren Höhe des Flusskanals besser für kinetische Messungen geeignet ist. Es kann mit deutlich niedrigerer Antikörperkonzentration gemessen werden, was den Materialverbrauch und damit die Kosten einer Messung senkt. Das Konzentrationsprofil in Abbildung 4.17 zeigt aber, dass die Fließbedingungen in der Flusszelle hinsichtlich eines einheitlichen Flusses noch optimiert werden können. Schwierig hierbei sind die nicht reproduzierbaren Schwankungen. Dieser Einfluss auf die Messungen kann aber zum Teil durch Mittelung über mehrere Spots und Replikamessungen vermindert werden. Bezüglich der Optimierung von Flusszellgeometrien zeigt ein Blick in die Fachliteratur, dass systematische Untersuchungen zum Einfluss der Flusszellegeometrie noch ausstehen (Pike u. a., 2013). Dieselben Autoren haben Untersuchungen zur Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen in drei unterschiedlichen Flusszellgeometrien untersucht. Dabei wurden gute

Ergebnisse mit einer runden und einer sogenannten iCell erhalten. Für hohe Flussraten ca. 2 ml/min kam es teilweise zu Verwirbelungen der Lösung und somit zu einer ungleichmäßigen Verteilung des Farbstoffs. Generell sind die Versuche aber nur bedingt auf die Bedingungen der iRifS-Flusszellen zu übertragen, da der Flusskanal im Artikel eine Höhe von 1.5 mm betrug und die Flussraten wesentlich höher waren. Losic et al. untersuchten ebenfalls verschiedenen Flussparameter und haben dabei nur einen geringen Einfluss der Flusszellhöhe auf das Sensorsignal gefunden (Losic u. a., 2003).

4.4.2 Einfluss der Flussgeschwindigkeit und Oberflächenkonzentration des Peptids, sowie der Antikörperkonzentration in Lösung

In einem weiteren Versuch wurden der Einfluss der Flussgeschwindigkeit und der Oberflächenkonzentration des Peptids untersucht, um die optimalen Messbedingungen für kinetische Messungen des Peptid-anti-Transglutaminasesystems mittels iRifS zu ermitteln. Die an der Transduceroberfläche gebundene Menge an Streptavidin-Peptidkomplex (Oberflächenkonzentration) kann über die Konzentration des Streptavidin-Peptidkomplexes in der Spottinglösung (Spottingkonzentration) eingestellt werden. Je höher die eingesetzte Spottingkonzentration, desto höher die Oberflächenkonzentration des Peptids, vorausgesetzt, dass die Anbindungskapazität der Oberfläche noch nicht erreicht ist.

Es wurde ein Array aus den in Kapitel 3.1.1 genannten fünf Streptavidin-Peptidkomplexen in je drei unterschiedlichen Konzentrationen (0.05 g/l; 0.1 g/l und 0.25 g/l Streptavidin) gespottet. Der Array wurde mit drei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten (30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 120 $\mu\text{L}/\text{min}$) mit einer Antikörperkonzentration von 1 mg/l vermessen. In Abbildung 4.19 sind die entsprechenden Ergebnisse für eine Variation der Flussgeschwindigkeit und der Spottingkonzentration des Peptids dargestellt.

Der Einfluss der Antikörperkonzentration wurde dann anschließend untersucht. Dazu wurden auf oben beschriebenem Transducer weitere Messungen mit einer erhöhten Antikörperkonzentration (1.5 mg/l) bei den entsprechenden drei Flussgeschwindigkeiten durchgeführt. In Abbildung 4.20 sind die Bindungskurven für Peptid 6 bei einer Spottingkonzentration von 0.25 g/l Streptavidin gezeigt.

Einfluss der Flussgeschwindigkeit

Vergleicht man den Einfluss der Flussgeschwindigkeit, so findet man, dass bei niedrigen Spottingkonzentrationen (0.05 und 0.1 g/l Streptavidin) die Anfangssteigung unabhängig von der Flussgeschwindigkeit ist (siehe Abbildung 4.19). Hier liegen unter allen untersuchten Geschwindigkeiten kinetisch-kontrollierte Bedingungen vor.

Mit einer Spottingkonzentration von 0.25 g/l Streptavidin jedoch, ist die Anfangssteigung deutlich von Flussgeschwindigkeit abhängig. Mit steigender Flussgeschwindigkeit steigt die Anfangssteigung hier stark an.

Besonders deutlich wird dies bei der Erhöhung der Flussgeschwindigkeit von 60 $\mu\text{L}/\text{min}$

4 Ergebnisse und Diskussion

auf $120 \mu\text{L}/\text{min}$. Durch die Verringerung der Dicke der Diffusionsschicht steht mehr Antikörper zur Anbindung an der Oberfläche zur Verfügung. Somit liegen für eine Flussgeschwindigkeit von $30 \mu\text{L}/\text{min}$ und $60 \mu\text{L}/\text{min}$ nicht vollständig kinetisch kontrollierte Bedingungen vor, obwohl die Bindungskurven eine Krümmung aufweisen.

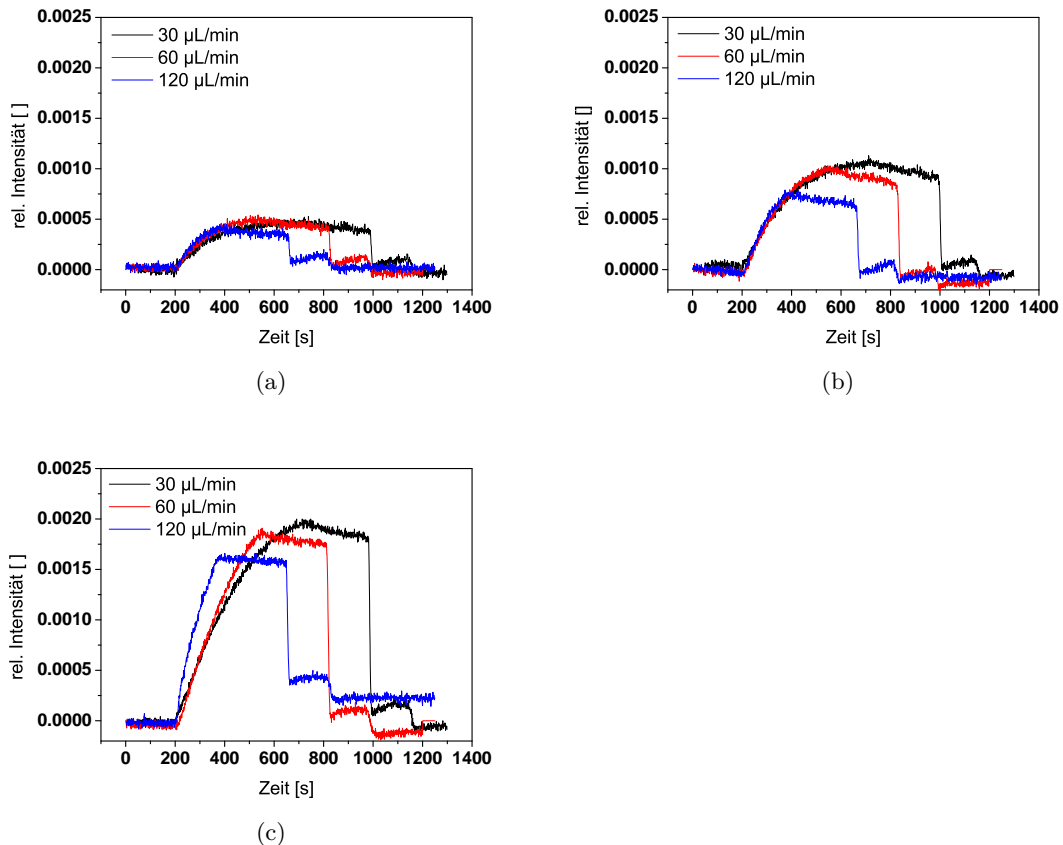


Abbildung 4.19: Vergleich der Bindungssignale des anti-Transglutaminaseantikörpers an Peptid 6 bei drei unterschiedlichen Spottingkonzentrationen und drei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten: (a) Spottingkonzentration von 0.05 g/l Streptavidin, (b) Spottingkonzentration von 0.1 g/l Streptavidin und (c) Spottingkonzentration von 0.25 g/l Streptavidin

Dieser Effekt kann auch durch eine mit der Zeit entstehende Verarmung der Antikörperkonzentration an der Oberfläche entstehen. Glaser beschreibt die Entstehung solcher Bindungskurven (Glaser, 1993). Dieser Effekt kann durch eine Erhöhung der Antikörperkonzentration oder der Flussrate ausgeglichen werden. Entsprechend findet man für die Anfangssteigung der Bindungskurve der höchsten Flussgeschwindigkeit in Kombination mit der höchsten Spottingkonzentration, dass diese deckungsgleich mit den Bindungskurven

4.4 Auswahl geeigneter Messbedingungen zur kinetischen Analyse

niedriger Spottingkonzentrationen verläuft, was auf kinetisch-kontrollierte Bedingungen hinweist (Sikavitsas u. a., 2002).

Einfluss der Oberflächenkonzentration

Die Versuche zeigen, dass die Oberflächenkonzentration des Streptavidin-Peptidkomplexes im gewählten Konzentrationsbereich von der Spottingkonzentration abhängt. Das heißt, desto höher die Spottingkonzentration ist, desto höher ist auch die Oberflächenkonzentration, da bei höherer Spottingkonzentration höhere Bindungssignale erhalten werden. Entsprechend lässt sich aus diesen Versuchen (siehe Abbildung 4.19) der Einfluss der Oberflächenkonzentration anhand der eingesetzten Spottingkonzentration ermitteln. Die Versuche zeigen, dass höhere Oberflächenkonzentrationen höhere Bindungssignale für die Gleichgewichtsbeladung ergeben. Die Messungen ergeben 0.05% relative Intensitätsänderung bei 0.01 g/l Streptavidin und 0.155% relative Intensitätsänderung bei 0.25 g/l Streptavidin. Entsprechend steigt auch das Signal-Rausch-Verhältnis für höhere Oberflächenkonzentrationen. Da für alle Messungen das gleiche Probenvolumen eingesetzt wurde, wird bei hoher Oberflächenkonzentration und hoher Flussgeschwindigkeit zum Teil die Gleichgewichtsbeladung nicht erreicht, da sich eine kürzere Interaktionszeit des Antikörpers mit dem Peptid ergibt. Dies kann durch eine höhere Antikörperkonzentration oder eine Erhöhung des Probenvolumens ausgeglichen werden.

Einfluss der Antikörperkonzentration in Lösung

Der Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Anfangssteigung der Bindungskurven bei einer Spottingkonzentration von 0.25 g/l Streptavidin wurde ebenfalls untersucht. Die Messungen (siehe Abbildung 4.20) ergaben, dass sich die Anfangssteigung bei zunehmender Flussgeschwindigkeit und Antikörperkonzentration einem Maximalwert annähert. Dieser wird für eine Flussgeschwindigkeit von 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ schon bei der höheren Antikörperkonzentration von 1.5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ erreicht. Auch bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ nimmt die Anfangssteigung bei höherer Antikörperkonzentration zu. Um jedoch in den kinetisch kontrollierten Bereich zu gelangen, müssen bei dieser Flussgeschwindigkeit noch höhere Antikörperkonzentrationen verwendet werden.

Zusammenfassung: Einfluss der Flussgeschwindigkeit, Oberflächenkonzentration und der Antikörperkonzentration

Für kinetische Messungen sind hinsichtlich eines guten Signal-Rausch-Verhältnisses Spottingkonzentrationen von 0.1 und 0.25 g/l Streptavidin geeignet. Gemessen werden sollte mit Flussgeschwindigkeiten zwischen 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 60 $\mu\text{L}/\text{min}$, um eine genügend lange Interaktionszeit der Probe mit der Oberfläche zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen muss die Antikörperkonzentration sorgfältig gewählt werden, um sicher zu stellen, dass kinetisch kontrollierte Bedingungen vorliegen.

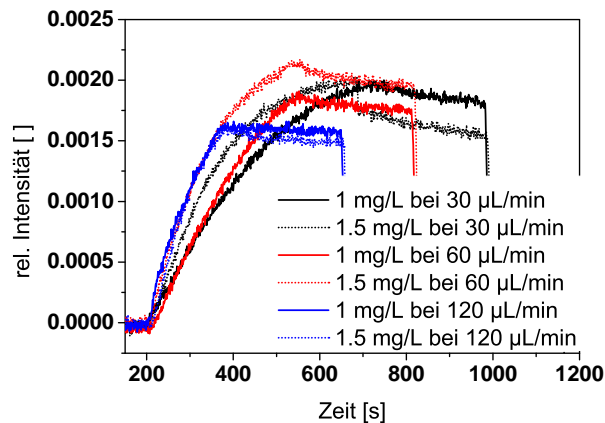


Abbildung 4.20: Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Einstellung kinetischer Messbedingungen. Im Vergleich werden die Bindungskurven mit 1 und 1.5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ anti-Transglutaminaseantikörper bei den drei Flussgeschwindigkeiten 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 120 $\mu\text{L}/\text{min}$ dargestellt.

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

Aufgrund der zuvor ermittelten Messbedingungen wurden nun kinetische Messungen der fünf verschiedenen Transglutaminasepeptide durchgeführt. Die Peptide 5-8 wurden gewählt, da sie den Bereich des Antikörperepitops abdecken und man deshalb Interaktionen erwartet. Peptid 10 liegt schon außerhalb des Bereichs und man erwartet keine Interaktion. Es wurde ein Array mit den Streptavidin-Peptidkomplexen gespottet. Die Konzentration des Streptavidins in der Spottinglösung betrug 0.1 g/l und 0.25 g/l. Der Satz an fünf Peptiden wurde mit beiden Konzentrationen jeweils doppelt gespottet (in Abbildung 4.21 bezeichnet mit Array 1 und Array 2). Die Peptide wurden dabei jeweils in 4 Replikaten gedruckt. Der Array wurde im Anschluss an einen Test auf unspezifische Bindung mit 1 g/l BSA mit folgenden Konzentrationen anti-Transglutaminaseantikörper vermessen: 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 100 nM und 200 nM. Ein Quotientenbild der 100 nM Messung sowie das Spot-Ausleserater und die Spotzuordnung sind in Abbildung 4.21 gegeben.

Die Bindungssignale der kinetischen Messungen der 0.25 g/l und 0.1 g/l Streptavidinspottkonzentration sind in Abbildung 4.22 bzw. Abbildung 4.23 gezeigt. Alle Messungen sind Mittelwerte aus vier Replikaten des Array 1 mit entsprechenden Standardabweichungen.

Die Messungen weisen im Allgemeinen eine gute Reproduzierbarkeit und eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Nur für Peptid 8 des 0.25 g/l Arrays und Peptid 5 des 0.1 g/l Arrays wurde höhere Standardabweichungen erhalten. Diese Abweichungen können in Unregelmäßigkeiten des Flusses begründet liegen, da die Spots dieser beiden Peptide in

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

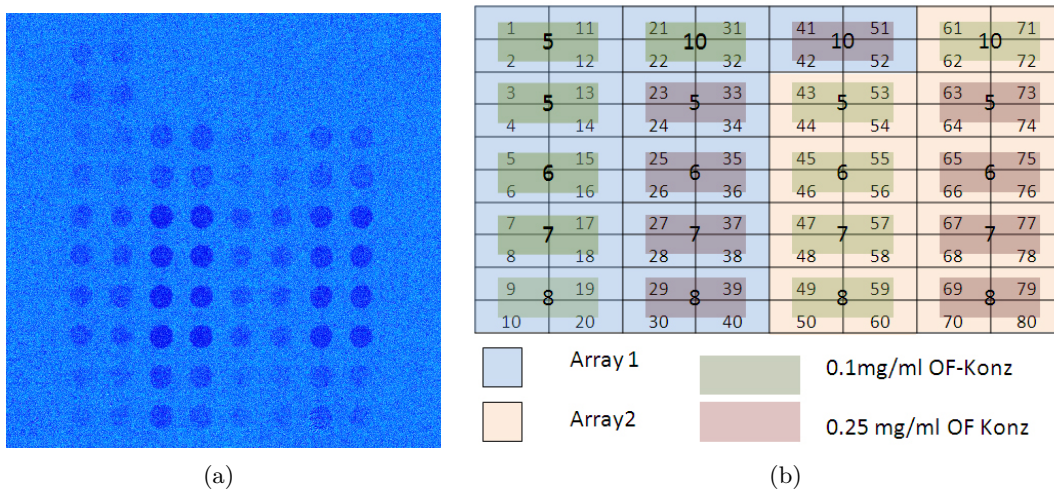


Abbildung 4.21: Array aus Transglutaminasepeptiden zur kinetischen Auswertung. (a) Quotientenbild des Arrays bei einer Antikörperkonzentration von 100 nM zum Zeitpunkt 600 s. (b) Spottingschema des Arrays mit entsprechender Zuordnung der Spots

den Randlagen des Arrays liegen und sich diese Abweichungen in den Messungen der jeweils anderen Spottingkonzentration nicht wiederfinden.

Die einzelnen Peptide unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten. So ergeben bei beiden Spottingkonzentrationen Peptid 6 und Peptid 7 die höchsten relativen Bindungssignale, während an Peptid 10 keine Bindung mehr detektierbar ist. Auch unterscheiden sich die Bindungskurven in der Form der Assoziationsphase und der Dissoziationsphase. Diese Unterschiede können durch die kinetische Auswertung im Anschluss quantifiziert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

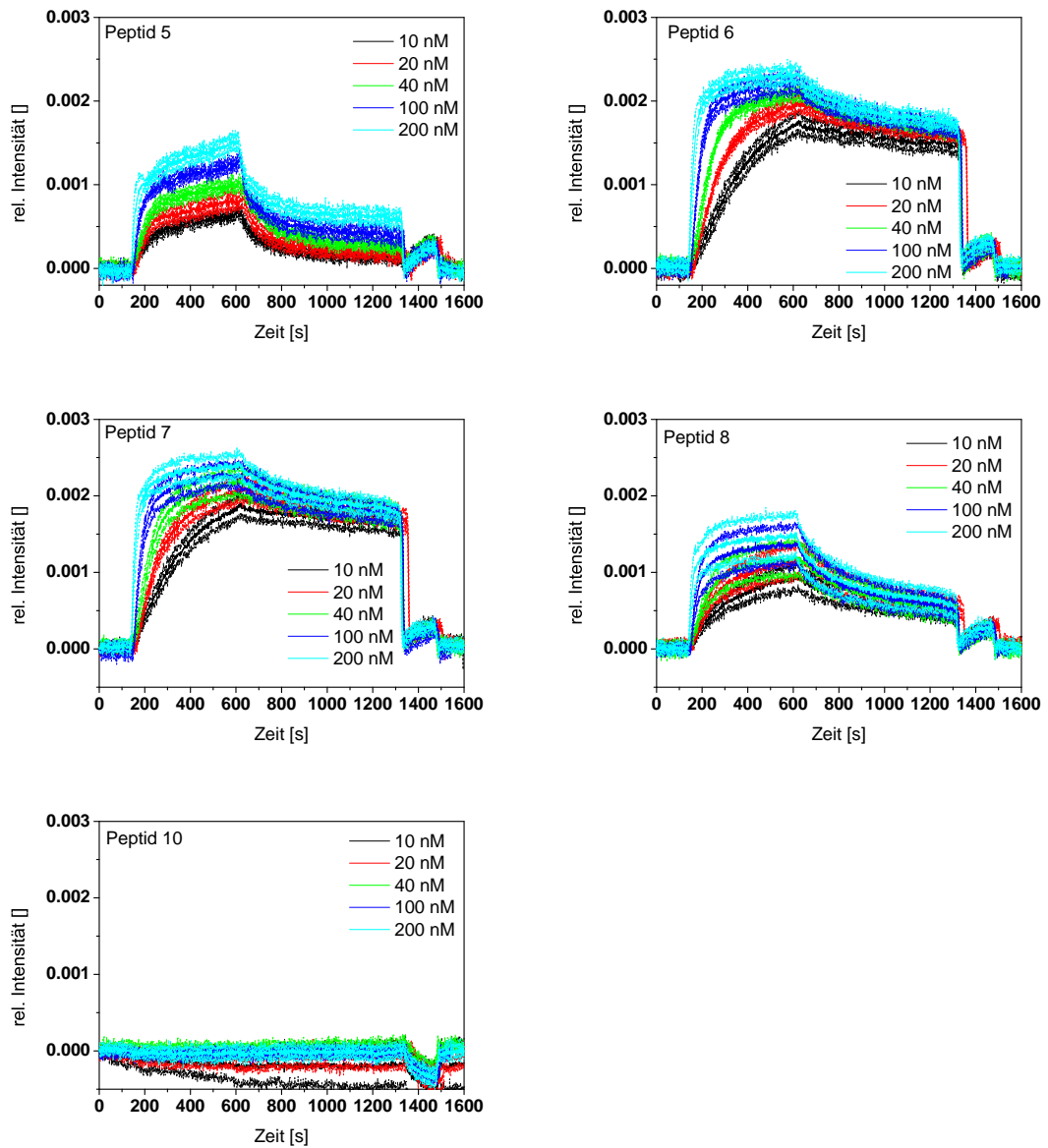


Abbildung 4.22: Bindungskurven der kinetischen Messungen aller fünf Peptide bei einer Spottingkonzentration von 0.25 g/l Streptavidin. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Spots

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

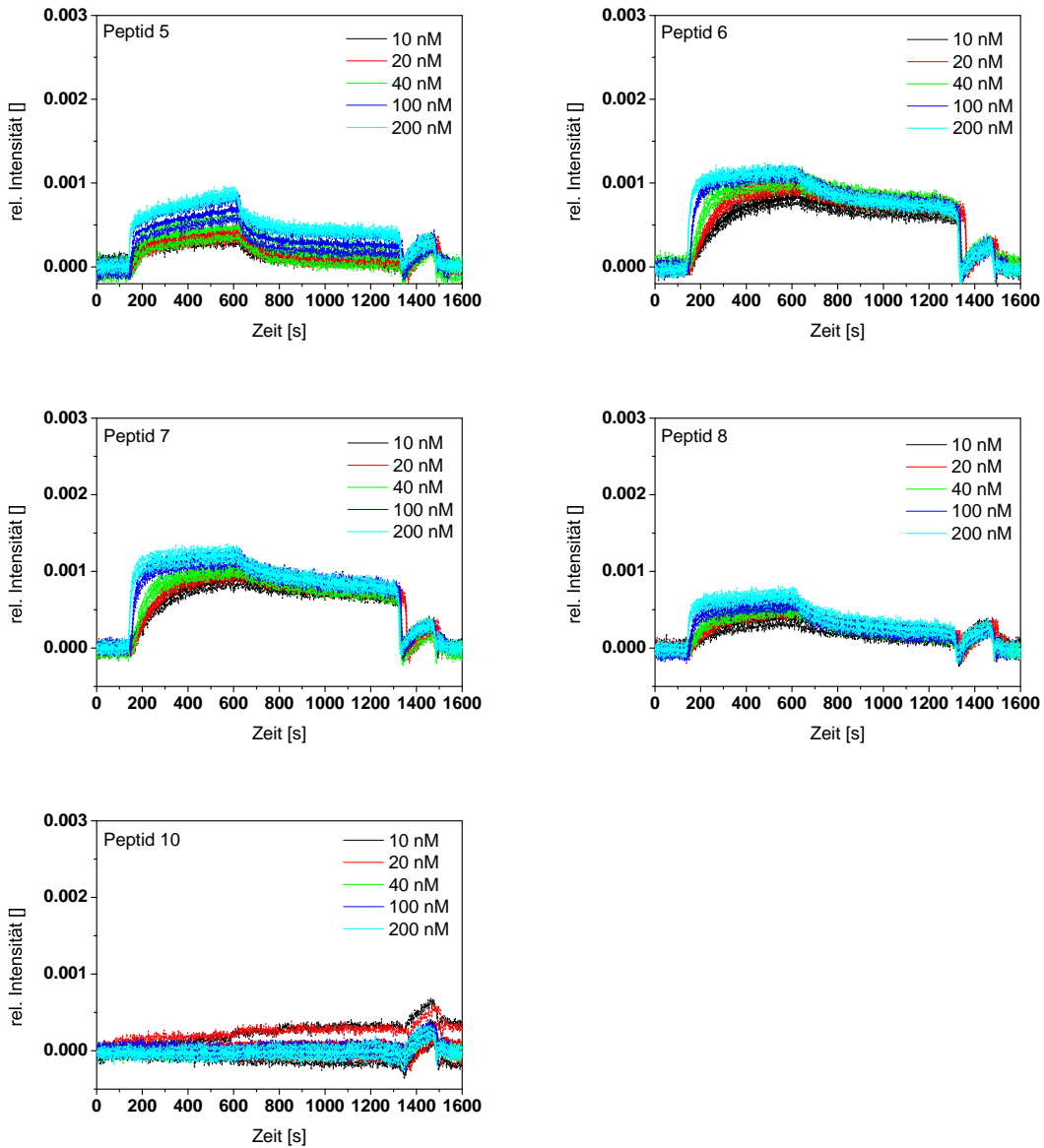


Abbildung 4.23: Bindungskurven der kinetischen Messungen aller fünf Peptide bei einer Spottingkonzentration von 0.1 g/l Streptavidin. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Spots

4.5.1 Variation des Auswertebereichs zur Anpassung der scheinbaren Ratenkonstante

Um kinetische Auswertungen durchzuführen, wurden verschiedene Auswertintervalle in der Assoziationsphase daraufhin überprüft, wie gut der Fit die Messdaten widerspiegelt. Dazu wird die Exponentialfunktion (Gleichung (3.2)) an den Krümmungsbereich der einzelnen Konzentrationsmessungen angepasst. Dabei wurden die Anzahl der angefitzten Datenpunkte variiert und somit der Einfluss der Größe des Fitintervalls getestet. Untersucht wurden ein Intervall von 60 und 100 Datenpunkte (DP), sowie ein Fit über die gesamte Assoziationsphase. Die entsprechenden Fits für Peptid 6 über die Konzentrationen 20, 40, 100 und 200 nM, sowie die ermittelten k_s -Werte sind in Abbildung 4.24 gezeigt. In Tabelle 4.1 sind die k_s -Werte und die R^2 -Werte der Fits aufgeführt.

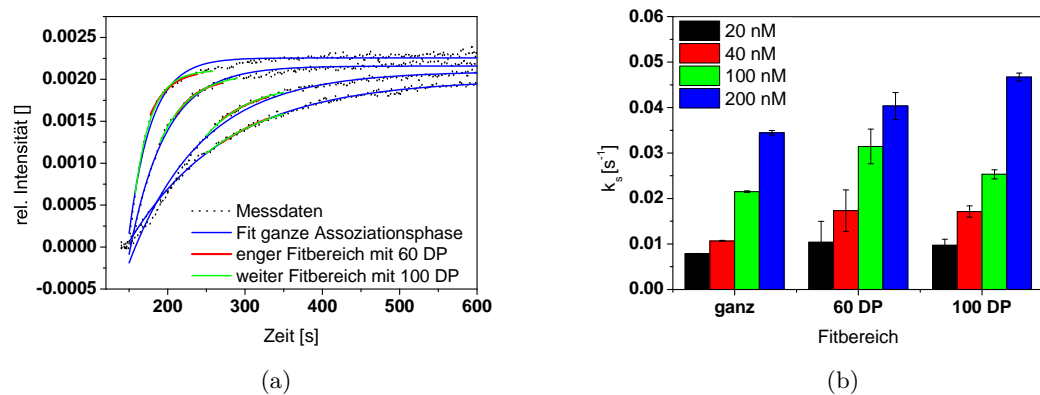


Abbildung 4.24: Vergleich verschiedener Auswertintervalle zur Ermittlung von k_s bei verschiedenen Konzentrationen für Peptid 6. (a) Anpassungen der Exponentialfunktion über 60 und 100 DP, sowie der gesamten Assoziationsphase, gezeigt sind die Messkurven für 20, 40, 100 und 200 nM von unten nach oben. (b) Vergleich der verschiedenen k_s -Werte für die einzelnen Anpassungen

Für alle Anpassungen ergibt sich, wie erwartet, ein steigender k_s -Wert mit zunehmender Antikörperkonzentration. Bei der Anpassung über die gesamte Assoziation wird die Anpassung an die Krümmung mit zunehmender Antikörperkonzentration schlechter. Trotz guter R^2 -Werten und geringen Fehlern bildet der Fit für 100 und 200 nM die Krümmung der Kurve schlechter ab, als für kleinere Fitbereiche (vergleiche Abbildung 4.24 a). Insgesamt ergeben sich aber für alle Konzentrationen die geringsten Standardfehler für k_s .

Tabelle 4.1: k_s - und R^2 -Werte über verschiedener Fitbereiche

Fitintervall	Konzentration	k_s [s^{-1}]	Kor. R-Quadrat
ganze Assoziation	20 nM	(7.87 ± 0.05) * 10^{-3}	1.0
	40 nM	(1.07 ± 0.01) * 10^{-2}	0.99
	100 nM	(2.15 ± 0.02) * 10^{-2}	0.99
	200 nM	(3.45 ± 0.05) * 10^{-2}	0.98
60 DP	20 nM	(1.0 ± 0.5) * 10^{-2}	0.93
	40 nM	(1.7 ± 0.5) * 10^{-2}	0.93
	100 nM	(3.2 ± 0.4) * 10^{-2}	0.96
	200 nM	(4.0 ± 0.3) * 10^{-2}	0.98
100 DP	20 nM	(9.7 ± 1.3) * 10^{-3}	0.97
	40 nM	(7.1 ± 0.1) * 10^{-2}	0.98
	100 nM	(2.5 ± 0.1) * 10^{-2}	0.99
	200 nM	(4.67 ± 0.09) * 10^{-2}	0.99

Bei der Anpassung über 60 DP passen sich die ermittelten Fitfunktionen für alle Konzentrationen dem Kurvenverlauf an. Allerdings ist eine geeignete Auswahl des Fitbereichs aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten schwierig. Dies zeigt sich auch in kleineren R^2 -Werten und größeren Fehlern der ermittelten Werte.

Die Anpassungen über 100 DP weisen geringere Fehler und höhere R^2 -Werte auf als die Anpassung mit 60 Datenpunkten. Für 200 nM ist der R^2 -Wert bei der Verwendung von 100 DP höher als bei dem Fit über die gesamte Assoziation. Desweiteren sind die k_s -Werte der höheren Konzentrationen (ab 40 nM) höher, als bei der Anpassung über alle Datenpunkte.

Die Vergleiche zeigen, dass die Größe des Anpassungsintervalls einen Einfluss auf Größe und Güte der bestimmten k_s -Werte haben. Bei niedrigen Konzentrationen ergeben sich ungenaue Werte, wenn der Fitbereich zu eng gewählt wird. Bei hohen Konzentrationen, das heißt einem stark gekrümmten Kurvenverlauf, sind die Abweichungen bei weiten Fitbereichen am größten. Soll für die Anpassung aller Kurven eine gleiche Intervallgröße verwendet werden, bieten sich mittlere Intervallgrößen von hier 100 Datenpunkten an. Dies wird auch bestätigt, wenn man eine lineare Anpassung der ermittelten k_s -Werte gegen die Antikörperkonzentration zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a aufträgt (Daten nicht gezeigt).

4.5.2 Auswertung der kinetischen Messungen

Auswertung der kinetischen Messungen des 0.25 g/l-Arrays

Die in dem Kapitel 4.5.1 gewonnen Erkenntnisse über geeignete Auswertebereiche für kinetische Messungen fließen im Weiteren in die Auswertung der kinetischen Analyse des Peptid-anti-Transglutaminasesystems mit ein.

4 Ergebnisse und Diskussion

Aus Messdaten der Peptide 5, 6, 7 und 8 wurden die kinetischen Daten ermittelt. In einem ersten Schritt wurde die Dissoziationsratenkonstante k_d über einen globalen Fit aller Konzentrationen ermittelt (siehe Kapitel 3.2.10). Die so ermittelte Ratenkonstante stimmte im Rahmen statistischer Genauigkeit mit dem k_d -Wert über ein, wenn dieser aus dem Mittelwert aller einzeln, für jede Konzentration berechneten k_d -Werte bestimmt wird. Der global ermittelte Wert wies jedoch einen geringeren Standardfehler auf (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Rückbindung während der Dissoziation wurde im Modell über einen Offsetparameter abgebildet. Dieser wird null, wenn keine Rückbindung vorliegt und nimmt einen Wert größer null an, für den Fall, dass Rückbindung stattfindet. Die Assoziationsratenkonstante k_a wurde, wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse des linearen Fits zur Bestimmung von k_a sind in Abbildung 4.25 gezeigt.

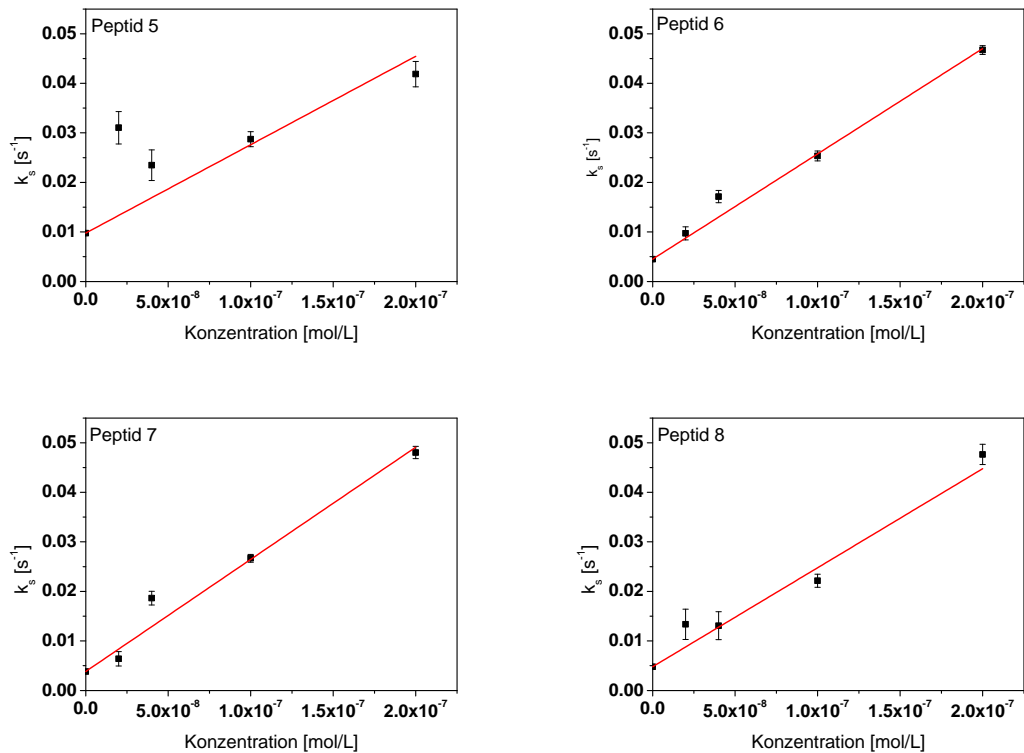


Abbildung 4.25: Bestimmung von k_a aus dem linearem Fit für den 0.25 g/l Array

Für die Peptide 6-8 lässt sich die Konzentrationsabhängigkeit der scheinbaren Ratenkonstante gut in einem linearen Fit abbilden. Die R^2 -Werte der Anpassungen liegen zwischen 0.99 für Peptid 6 und 7 und 0.98 für Peptid 8. Für Peptid 5 ergeben sich deutliche Schwankungen. Hier ist die Bestimmung von k_a mit einem größeren Fehler be-

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

haftet. Die Schwankungen können zum einen in niedrigeren Signalintensitäten begründet liegen, zum anderen in Schwierigkeiten bei der Anpassung der Exponentialfunktion an die Assoziationsphase. In Abbildung 4.22 weisen die Messkurven des Peptids 5 im Bereich der Gleichgewichtsbeladung einen Drift des Bindungssignals auf. Damit kann es zu Schwierigkeiten bei der Anpassung der Asymptote und somit zu größeren Ungenauigkeiten der ermittelten Werte kommen. Aus den beiden Ratenkonstanten wurde dann abschließend die Affinitätskonstante K_{aff} ermittelt. Die Werte der Ratenkonstanten und Affinitätskonstanten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Kinetische Konstanten und Affinitätskonstante des Arrays mit 0.25 g/l Spottingkonzentration

	k_d [s^{-1}]	k_a [$L * mol^{-1} * s^{-1}$]	K_{aff} [$L * mol^{-1}$]
Peptid 5	$(9.75 \pm 0.09) * 10^{-3}$	$(1.8 \pm 0.3) * 10^5$	$(1.8 \pm 0.3) * 10^7$
Peptid 6	$(4.49 \pm 0.08) * 10^{-3}$	$(2.1 \pm 0.8) * 10^5$	$(4.7 \pm 0.2) * 10^7$
Peptid 7	$(3.82 \pm 0.08) * 10^{-3}$	$(2.3 \pm 0.1) * 10^5$	$(5.9 \pm 0.3) * 10^7$
Peptid 8	$(4.79 \pm 0.05) * 10^{-3}$	$(2.0 \pm 0.1) * 10^5$	$(4.2 \pm 0.3) * 10^7$

Die Werte der Dissoziationsratenkonstante unterscheiden sich zwischen allen Peptiden. Peptid 5 weist mit Abstand die höchste Dissoziationsratenkonstante mit einem Wert von $(9.75 \pm 0.09) * 10^{-3} s^{-1}$ auf. Die anderen Dissoziationsratenkonstanten sind vergleichsweise ähnlich, wobei Peptid 7 mit $(3.82 \pm 0.08) * 10^{-3} s^{-1}$ die niedrigste Dissoziationsratenkonstante besitzt. Die Assoziationsratenkonstanten der Peptide unterschieden sich im Rahmen der statistischen Genauigkeit nicht und bewegen sich in einem Bereich zwischen $1.8 * 10^5$ und $2.3 * 10^5 L * mol^{-1} * s^{-1}$. Aus dem Quotienten der beiden Ratenkonstanten berechnet sich die Affinitätskonstante.

Im Vergleich der Ratenkonstanten ergibt sich, dass der Wert von k_d häufig ausschlaggebend für die Affinitätskonstanten K_{aff} ist, während sich die Assoziationsratenkonstanten nur geringfügig unterscheiden. Dieses Verhalten wurde auch in der Literatur beispielsweise von Kumagai und Piehler (Kumagai und Tsumoto, 2001 und Piehler, 1997) beschrieben.

Die Berechnungen ergaben die höchste Affinitätskonstante für Peptid 7 mit $(5.9 \pm 0.3) * 10^7 L * mol^{-1}$ und die niedrigste für Peptid 5 mit $(1.8 \pm 0.3) * 10^7 L * mol^{-1}$. Die Affinitätskonstanten von Peptid 6 und 8 sind im Rahmen der statistischen Genauigkeit praktisch gleich. Diese Auswertung zeigt auch, dass allein aus dem Bindungssignal, wie in Abbildung 4.22 gezeigt, nicht auf die Affinität geschlossen werden kann. Peptid 8 weist ein niedrigeres Bindungssignal als Peptid 6 und 7 auf, dennoch ist der Quotient aus Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante der drei Peptide praktisch gleich und somit entsprechen sich die berechneten Affinitätskonstanten der Peptide. Unter der Bedingung, dass k_a , die Konzentration des Antikörpers und die Flussgeschwindigkeit gleich sind, würde man aber für alle drei Peptide ein ähnlich hohes Signal für die Gleichgewichtsbeladung erwarten. Die Unterschiede in der Gleichgewichtsbeladung können in

4 Ergebnisse und Diskussion

einer geringeren Oberflächenkonzentration für Peptid 8 begründet liegen. Möglicherweise hat dieses Peptid eine schlechtere Immobilisierungseffizienz, eine geringere Konzentration in der Stammlösung durch eine schlechtere Löslichkeit oder eine schlechtere sterische Zugänglichkeit für den Antikörper.

Auswertung der kinetischen Messungen des 0.1 g/l-Arrays

Die Messungen der Arrays mit 0.1 g/l Spottingkonzentration wurden für die Peptide 5, 6 und 7 wie oben beschreiben ausgewertet. Die linearen Anpassungen zur Ermittlung der Assoziationsratenkonstante sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Die ermittelten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten sowie die Affinitätskonstante sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Ein graphischer Vergleich der ermittelten Konstanten der beiden Arrays mit unterschiedlichen Spottingkonzentrationen ist in Abbildung 4.27 gezeigt.

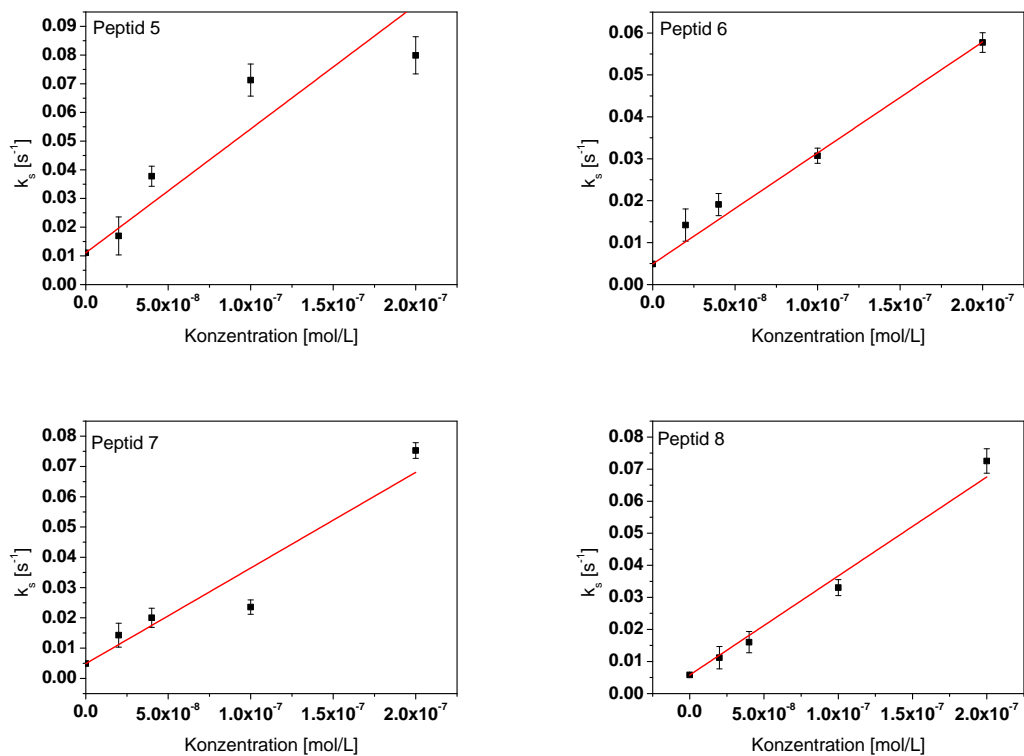


Abbildung 4.26: Bestimmung von k_a aus dem linearem Fit für den 0.1 g/l Array

Der Vergleich der beiden Arrays mit unterschiedlichen Spottingkonzentrationen zeigt, dass, insbesondere für Peptid 5 und 8, bei niedrigeren Spottingkonzentrationen höhere Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten erhalten werden. Die zuvor festgestell-

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

Tabelle 4.3: Kinetische Konstanten und Affinitätskonstante des Arrays mit 0.1 g/l Spottingkonzentration

	k_d [s ⁻¹]	k_a [L* <i>mol</i> ⁻¹ * s ⁻¹]	K_{aff} [L* <i>mol</i> ⁻¹]
Peptid 5	(1.10 ± 0.02) *10 ⁻²	(4.3 ± 0.8) *10 ⁵	(3.9 ± 0.7) *10 ⁷
Peptid 6	(4.90 ± 0.09) *10 ⁻³	(2.7 ± 0.1) *10 ⁵	(5.4 ± 0.2) *10 ⁷
Peptid 7	(4.9 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.2 ± 0.4) *10 ⁵	(6.5 ± 0.8) *10 ⁷
Peptid 8	(5.8 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.1 ± 0.2) *10 ⁵	(5.4 ± 0.3) *10 ⁷

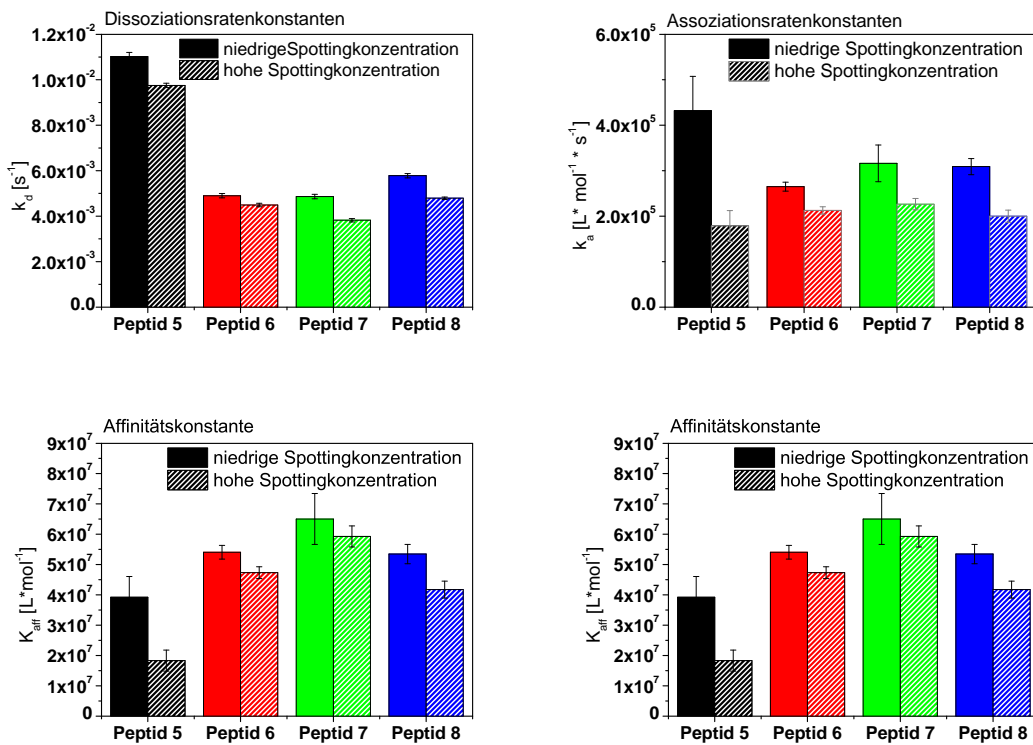


Abbildung 4.27: Vergleich der Ratenkonstanten und der Affinitätskonstante des 0.1 g/l (ausgefüllte Balken) und des 0.25 g/l Arrays (schraffierte Balken)

4 Ergebnisse und Diskussion

ten Unterschiede im Bindungsverhalten der Peptide bleiben aber weitgehend gleich und unterscheiden sich zwischen den einzelnen Spottingkonzentrationen nicht.

Die geringeren Dissoziationsratenkonstanten bei der höheren Spottingkonzentration können durch mögliche Rückbindungseffekte erklärt werden, die bei einer größeren Oberflächenkonzentration an Peptid stärker auftreten können. Dadurch stehen mehr potentielle Bindungsstellen für den Antikörper zur Verfügung, an die die Antikörpermoleküle nach ihrer Dissoziation vom ersten Bindungspartner wieder anbinden können. Aufgrund dessen wird dann eine niedrigere Dissoziationsratenkonstante beobachtet. Ebenso kann der Effekt durch die Dissoziation eines bivalenten Antikörpers hervorgerufen werden (Nieba u. a., 1996). Eine Minimierung der Rückbindung kann durch die Reduktion der Oberflächenkonzentration oder auch durch Zugabe des Peptids in Lösung während der Spülphase erreicht werden. Damit wird eine Rückbindung an die Oberfläche minimiert, da die Antikörper nach der Dissoziation von der Oberfläche an das Peptid in Lösung binden können (Glaser, 1993).

Die niedrigeren Assoziationsratenkonstanten bei der höheren Spottingkonzentration können durch verschiedene Effekte begründet sein. Zum einen ist es möglich, dass trotz sorgfältiger Auswahl der Messbedingungen (vergleiche Kapitel 4.4) ein Einfluss des Massentransports bei höherer Spottingkonzentration des Peptids vorliegt. Zum anderen ist es denkbar, dass es aufgrund der dichteren Belegung mit Peptiden bei höheren Spottingkonzentrationen zu einer sterischen Hinderung der Antikörperanbindung kommt, da die Zugänglichkeit der Peptide für die Antikörper erschwert ist. Die Bestimmung der Assoziationsratenkonstante von Peptid 5 ist auch bei dieser Oberflächenkonzentration schwierig und mit einem großen Fehler behaftet.

Neben den kinetischen Konstanten ergeben sich auch leicht unterschiedliche Affinitätskonstanten. Diese sind bei der niedrigen Spottingkonzentration höher als bei der höheren Oberflächenbelegung. Die geringere Spottingkonzentration hat somit auf die Assoziationsratenkonstante und damit verbundene mögliche Fehlerquellen einen größeren Einfluss als auf die Dissoziationsratenkonstante. Die Abweichungen der ermittelten Affinitätskonstanten liegen für Peptid 6 und 8 im Bereich von 10 %, für Peptid 7 bei 7 %. Desweiteren bleibt aber der Trend von höchster zu niedrigster Affinitätskonstante erhalten.

Die mit dem iRIfS-System erhaltenen Affinitätskonstanten für die Peptide 6, 7 und 8 können mit Affinitätskonstanten verglichen werden, die am spektralen-RIfS in homogener Phase von Kröger et. al (Kröger u. a., 2002) gemessen wurden (siehe Tabelle 4.4).

Der Vergleich zeigt, dass die Affinitätskonstanten, die mittels iRIfS in heterogener Phase bestimmt wurden, im Schnitt um Faktor 3 bis 4 niedriger sind als die, die in homogener Phase mittels Bindungsinhibitionstest bestimmt wurden. In der Literatur werden Abweichungen zwischen Affinitätskonstanten in homogener und heterogener Phase beschrieben, die um Faktor 50 voneinander abweichen (Nieba u. a., 1996).

Abweichungen können durch Diffusionslimitation, Heterogenitäten in der Oberfläche

Tabelle 4.4: Vergleich der Affinitätskonstante des Arrays mit 0.25 g/l und 0.1 g/l Spottingkonzentration, sowie den Affinitätskonstanten, die mittels Bindungsinhibitionstest in homogener Phase bestimmt wurden

	0.25 g/l [L* <i>mol</i> ⁻¹]	0.1 g/l	homogene Phase
Peptid 6	(4.7 ± 0.2) *10 ⁷	(5.4 ± 0.2) *10 ⁷	(1.7 ± 0.5) *10 ⁸
Peptid 7	(5.9 ± 0.3) *10 ⁷	(6.5 ± 0.8) *10 ⁷	(1.8 ± 0.7) *10 ⁸
Peptid 8	(4.2 ± 0.3) *10 ⁷	(5.4 ± 0.3) *10 ⁷	(2.0 ± 0.6) *10 ⁸

oder Aviditätseffekte begründet sein. Desweiteren ist bei Affinitätsbestimmungen von Antikörpern in heterogener Phase ein direkter Einfluss der beiden Bindungsstellen zu erwarten. In homogener Phase erfolgt die Bestimmung der Affinitätskonstanten über die Anzahl freier Bindungsstellen im Gleichgewicht, das sich zuvor eingestellt hat. Entsprechend spielen Unterschiede zwischen den Bindungsstellen eine geringe Rolle. In heterogener Phase hingegen, wird die Kinetik der Reaktion betrachtet und die entsprechenden Konstanten ermittelt. Bindungsvorgänge an der Transduceroberfläche wirken sich somit direkt auf die zu bestimmenden Konstanten aus. Rückbindung und kooperative Effekte bei Anbindung der beiden Bindungsstellen gehen direkt in die Konstanten ein und führen zu Variationen.

In einer groß angelegten Benchmark-Studie wurden kinetische und thermodynamische Konstanten, die mit verschiedenen markierungsfrei arbeitenden Systemen bestimmt wurden, verglichen. Dabei kam es zu Abweichungen der einzelnen Konstanten für das gleiche System, gemessen in verschiedenen Laboren, um bis zu einer Größenordnung (Rich, 2009). Die hier gefundenen Abweichungen könnten durch eine Optimierung des Systems in Bezug auf die oben genannten Kriterien noch verbessert werden. Dennoch befinden sie sich im Rahmen üblicherweise gefundener Abweichungen zwischen zwei Experimenten. So ergeben sich beispielsweise auch Differenzen zwischen Affinitätskonstanten, die im Fluss oder in ruhenden Lösungen bestimmt werden. So beträgt die Affinitätskonstante des anti-Transglutaminase-Antikörpers im Screeningsystem in ruhender Lösung gemessen nur $1.3 \cdot 10^7$ M (Kröger, 2003).

Die Messungen in homogener Phase, die im spektralen RI_{FS} durchgeführt wurden (siehe (Kröger u. a., 2002)), ergaben dass tendenziell Peptid 8 die höchste Affinität zum Antikörper besitzt, in heterogener Phase war dies Peptid 7. Diese Unterschiede können zum einen in unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien der Peptide begründet liegen. Im Falle der Messungen in homogener Phase bei Kröger et al. wurden die Peptide über die Thiolgruppe eines Cysteinrests an die Oberfläche gekoppelt, im Fall der Messungen in heterogener Phase mittels eines biotinyliertem Linkers und Streptavidin. Möglicherweise kommt es dabei zu beeinflussenden Wechselwirkungen. Auch können Flusseffekte bei der größeren Flusszelle des iRI_{FS}-Systems im Vergleich zum spektralen RI_{FS} nicht ganz ausgeschlossen werden.

4.5.3 Globaler Fit zur Anpassung der Assoziationsratenkonstante

In der oben beschriebenen Auswertung wurde die Assoziationsratenkonstante über die Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt, wenn die scheinbare Ratenkonstante gegen die Konzentration aufgetragen wird. Alternativ kann die Assoziationsratenkonstante, wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben, auch direkt aus den Messkurven mit Hilfe eines globalen Fits ermittelt werden. In Abbildung 4.28 sind beispielhaft die Fitkurven des globalen Fits für Peptid 6 gezeigt.

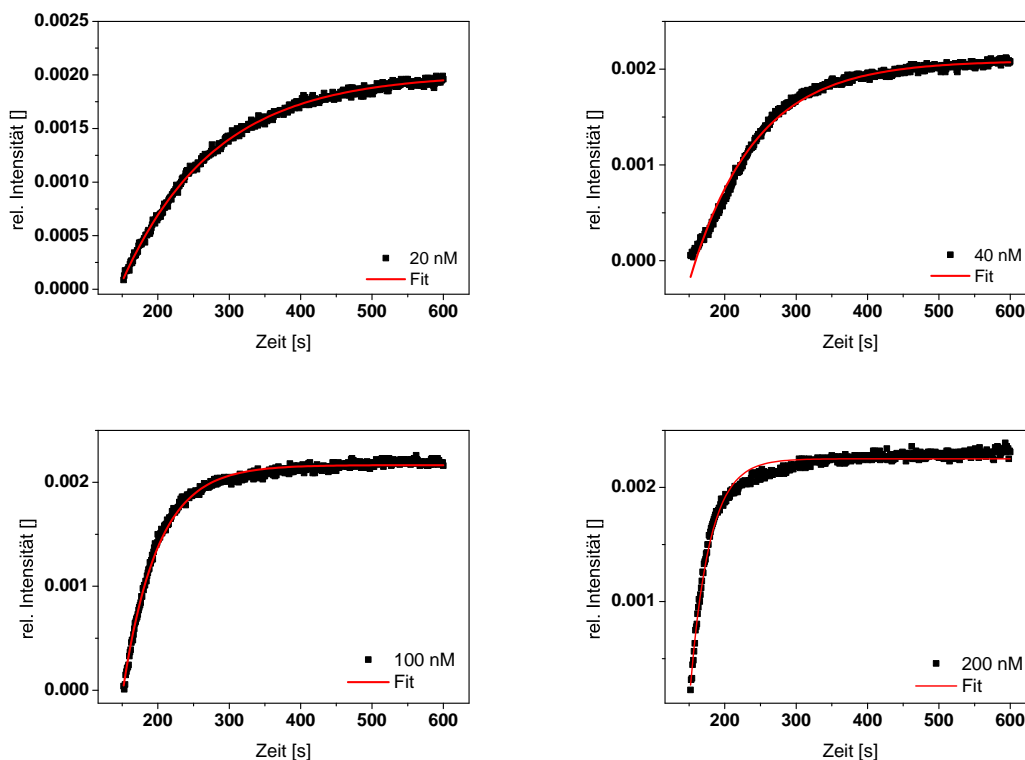


Abbildung 4.28: Bindungskurven von Peptid 6 der Konzentrationen 20, 40, 100 und 200 nM anti-Transglutaminase. Gezeigt sind zudem die Fitkurve für globalen Fit der Assoziationsphase

Der Vergleich von Messdaten und Fitdaten zeigt eine gute Anpassung des Fits an die Messdaten. Dies wird durch einen R^2 -Wert von 0.99 bestätigt. Der Wert der ermittelten Assoziationsratenkonstante liegt bei $(2.12 \pm 0.8) \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ im Vergleich zu einem k_a -Wert von $(2.13 \pm 0.4) \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei der Ermittlung über die Steigung der Ausgleichsgeraden. Somit unterscheiden sich die Werte im Rahmen der statistischen Genauigkeit nicht.

Der Vorteil, wenn k_a mittels des globalen Fits bestimmt wird, liegt darin, dass k_a und damit auch der Fehler von k_a direkt aus Messdaten ermittelt wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Einflüsse auf die Assoziationsratenkonstante, wie sie durch Massentransport oder das Erreichen der Maximalbeladung entstehen, nicht so leicht erkannt werden können. Diese werden stärker ersichtlich, wenn die Auswertung über die Ausgleichsgerade gewählt wird. Dann sind Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen k_s und der Antikörperkonzentration zu erwarten.

4.5.4 Sequentielle kinetische Messungen

In klassischen kinetischen Analysen werden Analytkonzentrationen über einen ausreichend großen Konzentrationsbereich analysiert. Nach jeder Injektion des Analyten erfolgt die Regeneration der Sensoroberfläche. Bei Systemen mit empfindlichen Liganden, die durch die Regeneration denaturiert werden oder wenn die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand sehr hoch ist, versagt diese Methode kinetische Konstanten zu bestimmen. In der Literatur werden verschiedene Methoden vorgestellt, wie über Titrationsserien des Liganden mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen dennoch kinetischen Konstanten ermittelt werden können. Dabei findet keine Regeneration zwischen den Injektionen unterschiedlicher Konzentration statt. Trutnau z. B. schlägt eine Auswertung über die Unterschiede der Anfangssteigungen zwischen einzelnen Messungen unterschiedlicher Konzentration vor. Dazu wird der Quotient der initialen Netto-Assoziationsrate und der Analyt-Netto-Startkonzentration gegen das Assoziations-Startsignal aufgetragen. Aus der Steigung der linearen Ausgleichsgerade kann k_a und aus dem x-Achsenabschnitt die Maximalbeladung R_{max} ermittelt werden (Trutnau, 2001).

Ein relativer Vergleich der Konstanten zur ersten Abschätzung kann auch gemäß der in Abschnitt 3.2.10 vorgestellten Auswertestrategie für sequentielle kinetische Messungen erhalten werden. Sequentielle kinetische Messungen wurden mit den Peptiden 5, 6, 7 und 8 für den anti-Transglutaminase Antikörper durchgeführt.

In Abbildung 4.29 sind die Messkurven der sequentiellen Messungen gezeigt. Vermessen wurde der Array mit 10, 20, 30, 40, 100 und 200 nM. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen 20, 40, 100 und 200 nM herangezogen. Für Peptid 5 war es schwierig aufgrund der Bindungskurven einen zuverlässigen Wert für k_a zu bestimmen. Wie in Kapitel 4.5.2 dargestellt, driftet das Signal im Bereich der Gleichgewichtsladung stark, zudem ergeben sich nur geringe Bindungssignale. Deshalb wurde Peptid 5 bei den weiteren Auswertungen nicht weiter berücksichtigt.

Die Abbildung zeigt, dass mit zunehmender Antikörperkonzentration das Bindungssignal steigt und auch die Krümmung der Bindungskurve wie erwartet steiler wird. Dennoch sind die Signalunterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen deutlich geringer als bei einzelnen, mit Regeneration durchgeführten Messungen. Daraus resultiert auch, dass die Anpassung der Exponentialfunktion an die Assoziationsphase über die gesamte Zeit der Assoziation erfolgte, da der Fit über einen Teilbereich aufgrund der insgesamt kleinen Signalunterschiede zwischen den Einzelmessungen und der geringen Krümmung

4 Ergebnisse und Diskussion

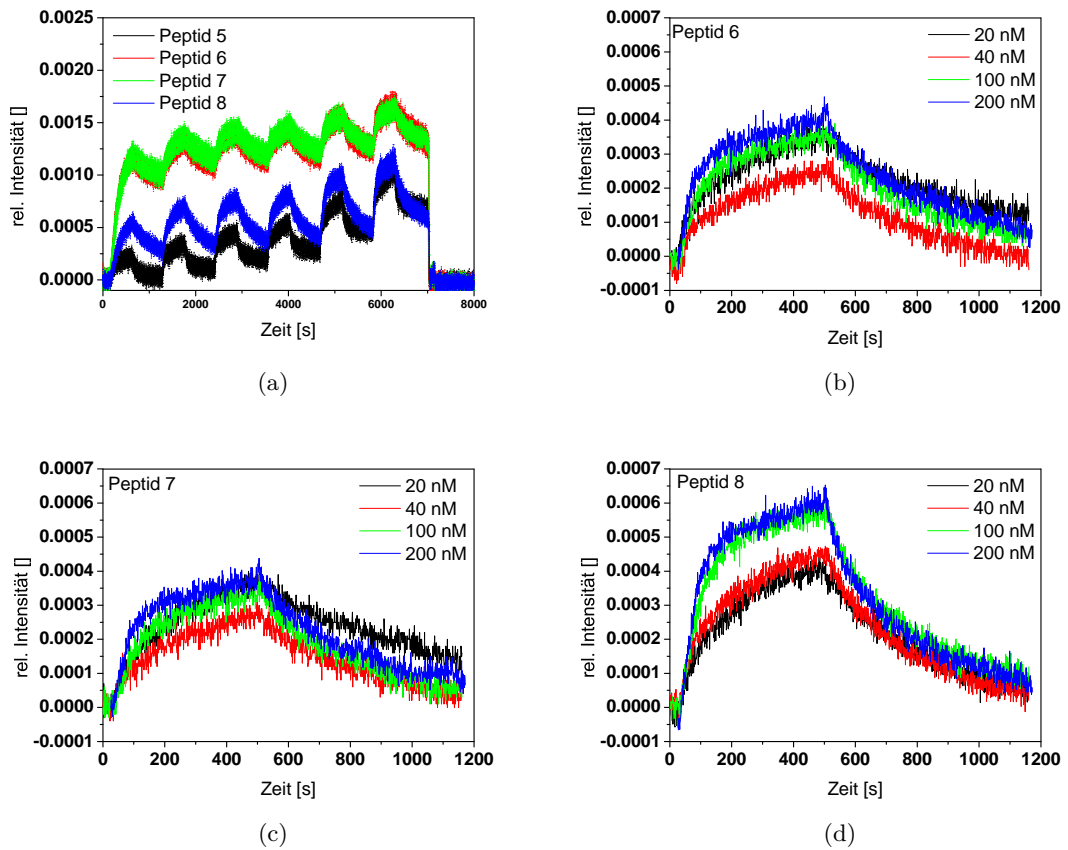


Abbildung 4.29: Bindungskurven der sequentiellen kinetischen Messungen. (a) Messungen der Peptide 5, 6, 7 und 8. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Messspots. (b) - (d) Bindungskurven nach Konzentration der Peptide 6, 7 und 8

zu ungenau war. In Abbildung 4.30 sind die linearen Anpassungen zur Ermittlung der Assoziationsratenkonstante für die Peptide 6, 7 und 8 gezeigt.

Die Anpassungen zeigen eine gute lineare Abhängigkeit der scheinbaren Ratenkonstante k_s von der Konzentration. Die R^2 -Werte der Anpassungen liegen zwischen 0,96 für Peptid 6 und 0,97 für Peptid 8. In Tabelle 4.5 sind die ermittelten Ratenkonstanten und die Affinitätskonstante zusammengefasst.

Ein Vergleich der ermittelten Werte aus den sequentiellen Messungen und den Einzelmessungen des Arrays mit 0,25 g/l Spottingkonzentration zeigt, dass sich die Werte der Dissoziationsratenkonstanten sehr ähnlich sind. Die Abweichungen liegen bei 7-11%, wobei die sequentiell gemessenen Werte alle niedriger sind, als die einzeln gemessenen.

4.5 Kinetische Analyse des Transglutaminasesystems

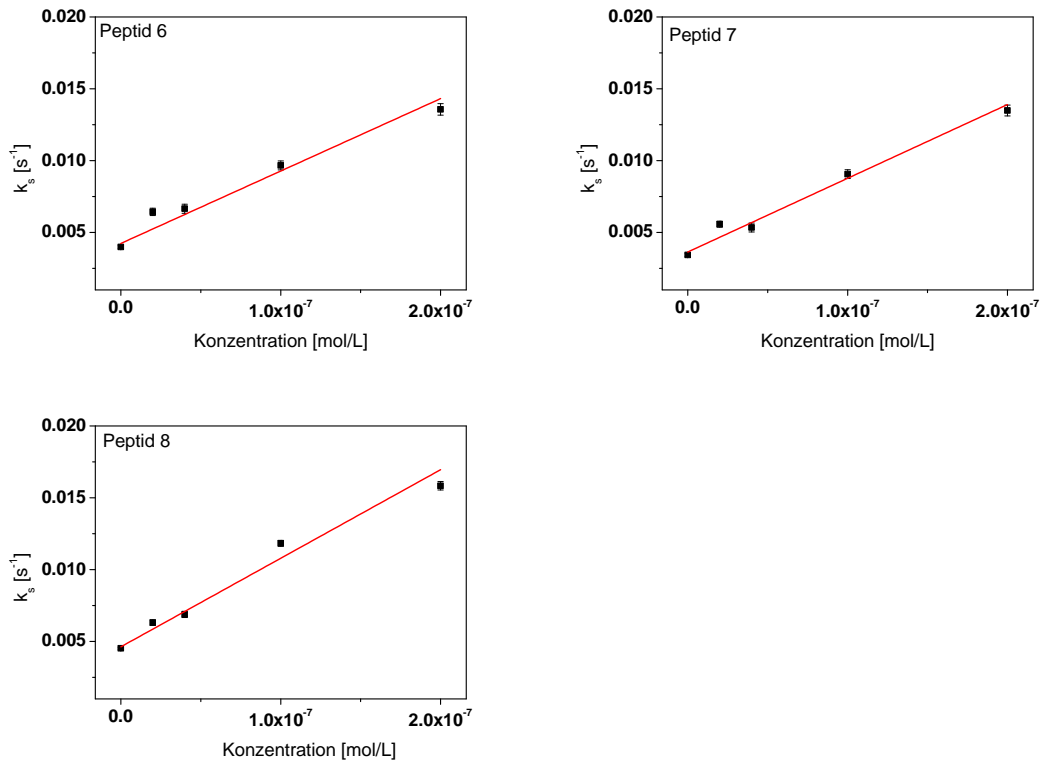


Abbildung 4.30: Bestimmung von k_a aus dem linearem Fit für die sequentiellen kinetischen Messungen

Tabelle 4.5: Kinetische und thermodynamische Konstanten ermittelt aus den sequentiellen kinetischen Messungen

	k_d [s^{-1}]	k_a [$L^*mol^{-1} * s^{-1}$]	K_{aff} [L^*mol^{-1}]
Peptid 6	$(4.0 \pm 0.1) * 10^{-3}$	$(5.0 \pm 0.6) * 10^4$	$(1.3 \pm 0.2) * 10^7$
Peptid 7	$(3.4 \pm 0.1) * 10^{-3}$	$(5.1 \pm 0.5) * 10^4$	$(1.5 \pm 0.2) * 10^7$
Peptid 8	$(4.5 \pm 0.7) * 10^{-3}$	$(6.2 \pm 0.5) * 10^4$	$(1.4 \pm 0.1) * 10^7$

4 Ergebnisse und Diskussion

Mögliche Ursachen können in Unterschieden zwischen den einzelnen Transducern oder in der Fluidik begründet liegen. Dennoch bestätigen die Messungen, dass k_d wenig zwischen den einzelnen Messungen schwankt und relativ genau bestimmt werden kann.

Deutliche Unterschiede ergeben sich jedoch bei den Assoziationsratenkonstanten. Hier liegen die Werte der sequentiellen Messungen um Faktor drei bis vier niedriger als die der Einzelmessungen. Diese liegt sicherlich darin begründet, dass beim sequentiellen Messverfahren die freie Ligandkonzentration auf der Oberfläche nicht konstant bleibt, sondern die Oberflächenbeladung mit steigender Antikörperkonzentration zunimmt und damit die Anzahl der freien Liganden auf der Oberfläche abnimmt. Dem könnte durch eine Anpassung des entsprechenden mathematischen Modells Rechnung getragen werden.

Entsprechend niedriger sind bei dieser Auswertung der sequentiellen Messungen auch die berechneten Affinitätskonstanten. Normiert man jedoch die Absolutwerte der Affinitätskonstanten, in dem man alle ermittelten Werte einer Messung auf den Wert der jeweils höchsten Affinität bezieht (hier die Werte von Peptid 7), können relative Affinitäten bestimmt werden. Ein Vergleich dieser Werte zwischen Einzel- und sequentiellen Messungen ist in Abbildung 4.31 gezeigt.

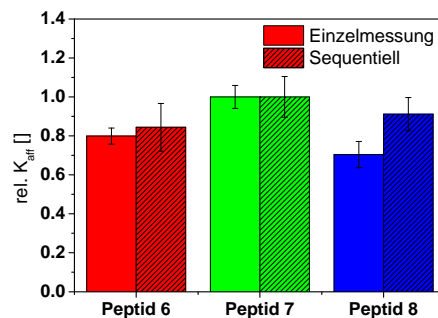


Abbildung 4.31: Vergleich der relativen Affinitätskonstanten von Einzelmessungen und sequentiellen Messungen

Diese Auftragung ergibt eine gute Übereinstimmung der relativen Affinitäten für Peptid 6. Für Peptid 8 sind die Abweichungen größer, dennoch wird in beiden Fällen eine niedrigere relative Affinitätskonstante als bei Peptid 6 und 7 gefunden. Generell zeigen die sequentiellen Messungen größere relative Fehler als die Einzelmessungen. Dennoch ist es möglich relative Affinitäten zwischen verschiedenen Peptiden zu einem Antikörper abzuschätzen. Der k_d -Wert kann zuverlässig bestimmt werden. Beides ist von Vorteil, wenn ein System untersucht werden soll, das keine Regeneration zwischen den einzelnen Messschritten erlaubt.

Zusammenfassung der Ergebnisse der kinetischen Messungen

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass mit dem iRiFS-System kinetische Konstanten von Peptid-Antikörperwechselwirkungen parallel bestimmt werden können. Neben der sorgfältigen Auswahl der Messbedingungen, wie sie in Abschnitt 4.4 festgelegt wurden, spielt der Bereich der Bindungskurve, der zur Bestimmung der kinetischen Konstanten herangezogen wird, eine wichtige Rolle. Um möglichst einheitliche Auswertebedingungen zu erlangen, wurde zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante ein Intervall von 100 Datenpunkten verwendet, dessen Lage auf der Bindungskurve je nach vermessener Antikörperkonzentration variiert wurde. Die Dissoziationsratenkonstante wurde mittels eines globalen Fits über alle gemessenen Antikörperkonzentrationen ermittelt. Ebenso ist es möglich, die Assoziationsratenkonstante mittels eines globalen Fit zu bestimmen. Die Werte, die so erhalten werden, stimmen mit den Werten der Assoziationsratenkonstante überein, wenn diese über einen linearen Fit der scheinbaren Ratenkonstante k_s gegen die Antikörperkonzentration ermittelt werden.

Die kinetischen Konstanten wurden bei zwei unterschiedlichen Spottingkonzentrationen der Peptide bestimmt. Wenn die kinetischen Konstanten für den Array mit niedriger Spottingkonzentration bestimmt wurden, ergaben sich höhere Werte für die kinetischen Konstanten und die Affinitätskonstante als für den Array mit höherer Spottingkonzentration. Somit ist ein gewisser Einfluss von zum Beispiel Rückbindung bei der Dissoziation oder Massentransporteffekte, sowie sterische Hinderungen bei der Assoziation nicht ganz auszuschließen. Vergleicht man die gefundenen Affinitätskonstanten jedoch mit den Werten von Kröger et al. (Kröger u. a., 2002), liegen die gefundenen Werte in dem zu erwartenden Bereich.

4.6 Entwicklung und Test einer halbautomatisierten Software

Die Auswertung komplexerer Peptidarrays, bei denen mehr als fünf Interaktionen untersucht werden sollen, ist manuell kaum zu bewerkstelligen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine halbautomatisierte Software entwickelt, mit welcher auch komplexere Arrays vergleichsweise schnell ausgewertet werden können. Da in Kapitel 4.5.1 gezeigt wurde, dass der Auswertebereich für die Assoziationsphase einen wesentlichen Einfluss auf die Assoziationsratenkonstante haben kann, bietet die vorgestellte Software zudem die Möglichkeit, sowohl die Lage des Fitbereichs als auch dessen Größe zu optimieren. In Abbildung 4.32 ist ein Überblick über die verschiedenen Funktionalitäten der Software gegeben. Es sind die Leistungen der Software sowie der benötigten Angaben des Benutzers dargestellt.

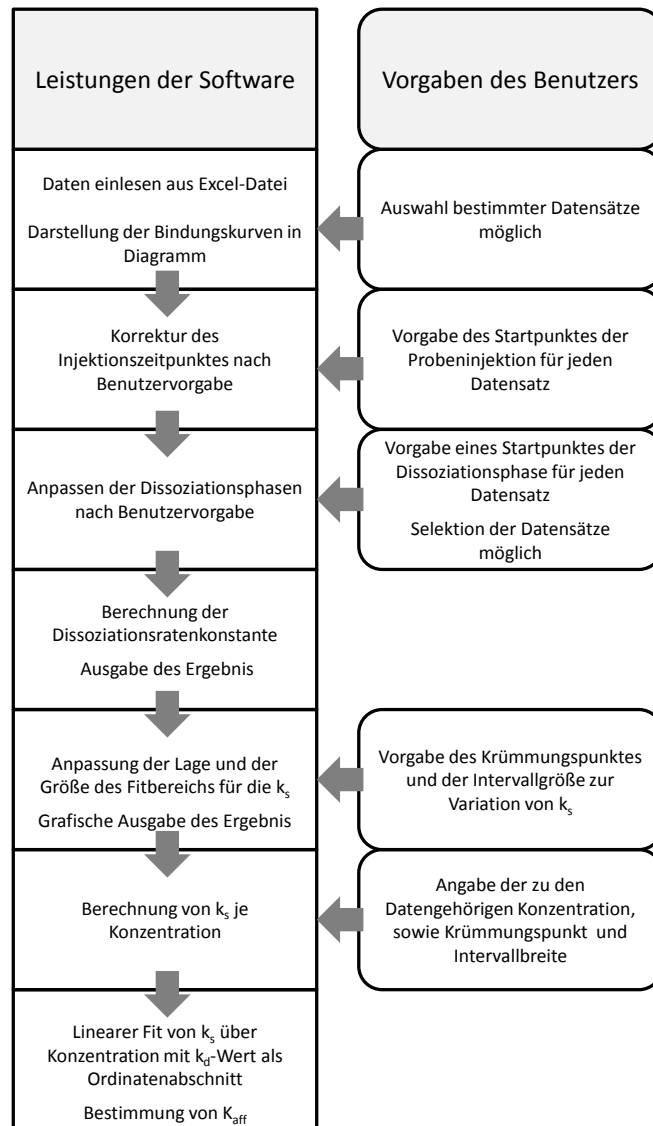


Abbildung 4.32: Übersicht über die Funktionalitäten der Software zur halbautomatisierten Auswertung kinetischer Messungen. Dargestellt sind die von der Software bereitgestellten Funktionalitäten, sowie die vom Benutzer benötigten Angaben

4.6.1 Überblick über die einzelnen Auswerteschritte der Software

Einlesen der Messdaten

Die Software beginnt mit dem Einlesen von Messdaten eines Spots aus einer Exceldatei. Für jede gemessene Konzentration und deren Replikamessungen wird die Messkurve in einem Schaubild dargestellt. Dies erlaubt die Daten zu Beginn der Auswertung zu überprüfen und auszuwählen.

Korrektur des Injektionszeitpunktes

In einem nächsten Schritt kann der Injektionspunkt der Messreihen angeglichen werden (siehe Abbildungen 4.33 und 4.34). Dies ist notwendig, da im verwendeten Messsystem Optik und Fluidik getrennt angesteuert werden, so dass der Beginn der Aufzeichnungen zwischen den Replikamessungen leicht variieren kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

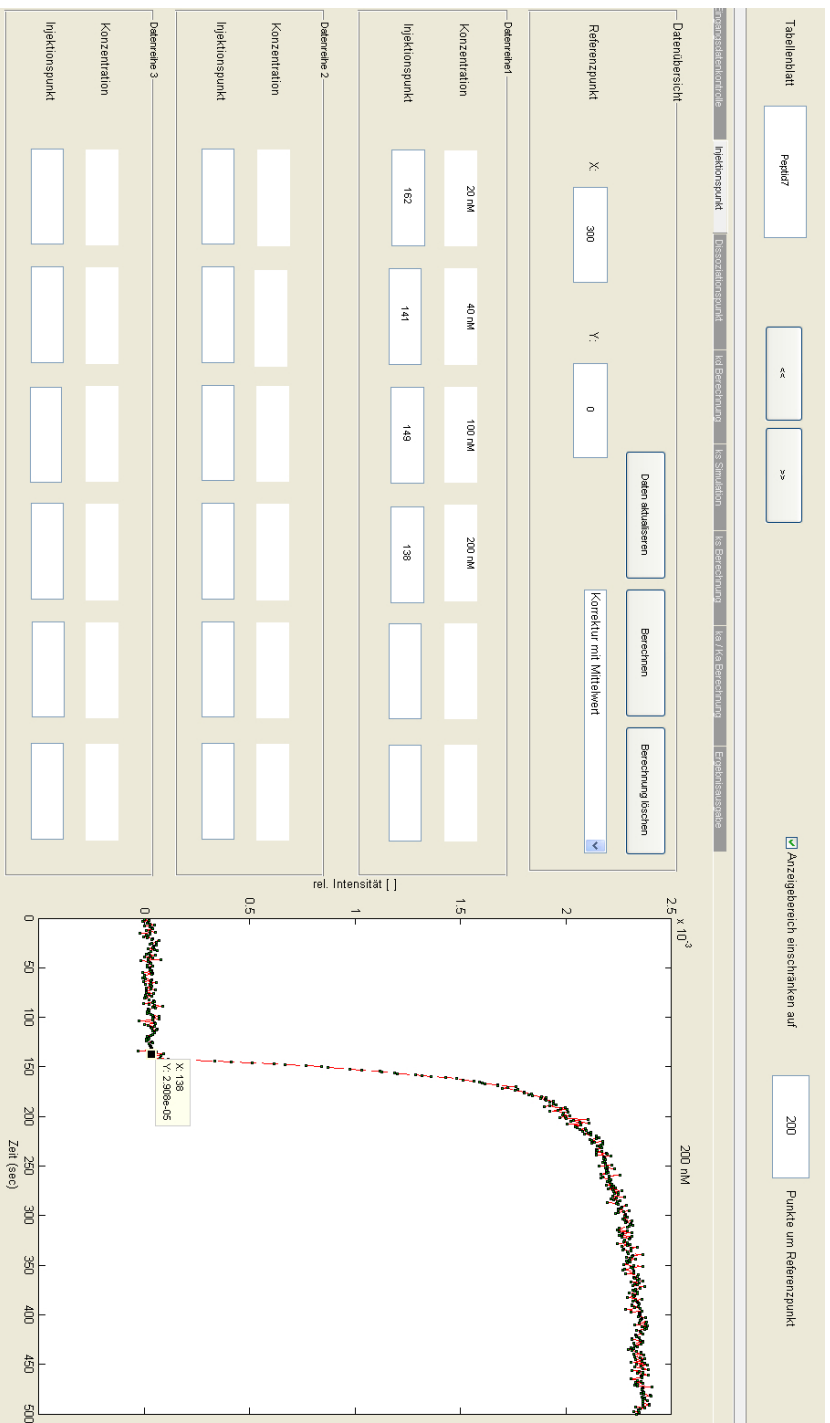


Abbildung 4.33: Anpassung des Injektionspunktes für alle Messungen: Die Software ermöglicht die Auswahl eines individuellen Injektionspunktes für jede aufgenommene Messkurve. Damit können zeitliche Unterschiede ausgeglichen werden, die entstehen, wenn die Messungen zeitlich leicht versetzt gestartet werden.

4.6 Entwicklung und Test einer halbautomatisierten Software

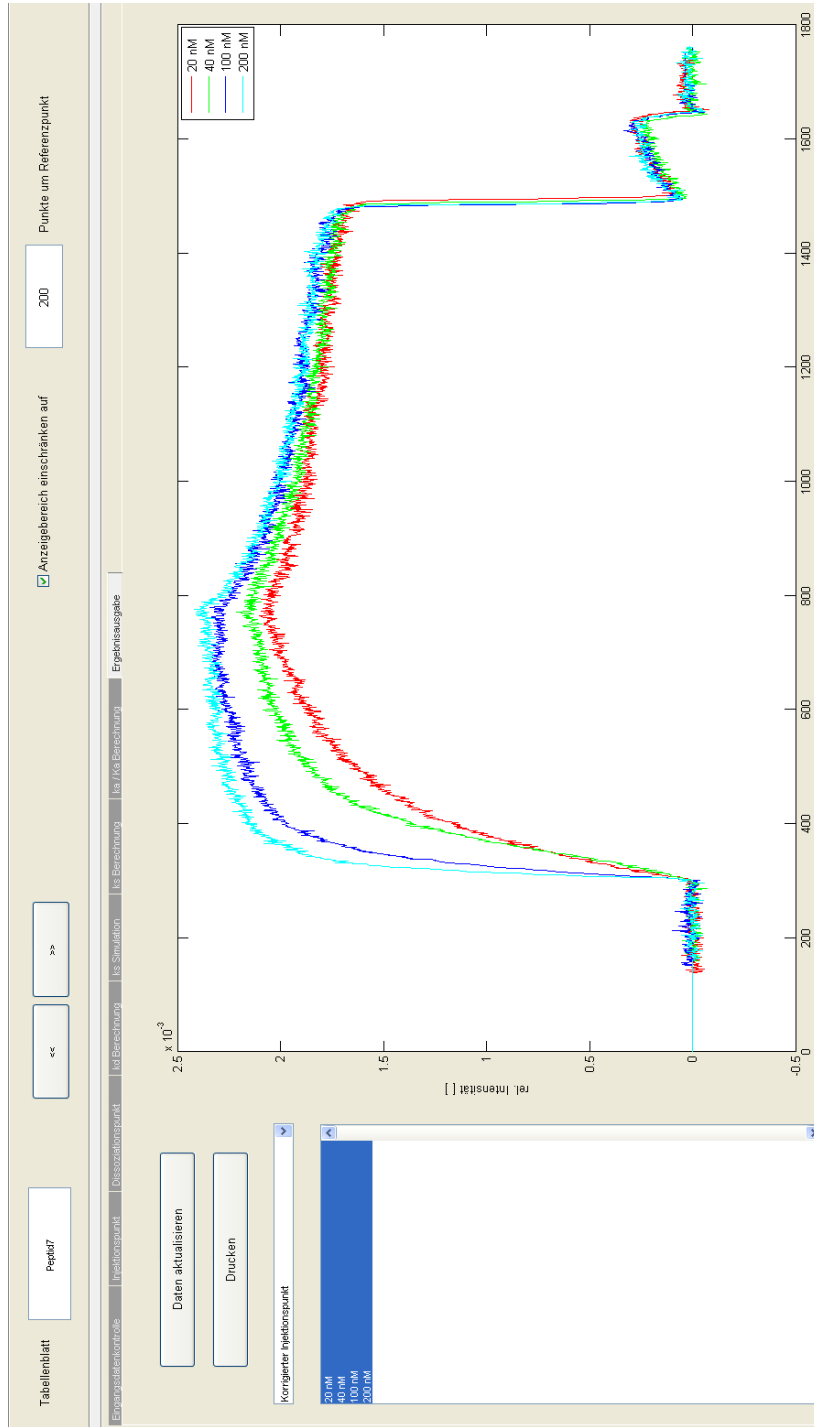


Abbildung 4.34: Korrigierte Messkurven: Die Messdaten werden dann der Eingabe entsprechend zeitlich korrigiert und das Ergebnis der Korrektur kam überprüft werden.

Anpassen der Dissoziationsphasen

In einem nächsten Schritt wird für jede Messreihe der Beginn der Dissoziationsphase ausgewählt und im Anschluss die Dissoziationsratenkonstante ermittelt. Dazu wird für jede ausgewählte Messung ein Vektor über die 600 Datenpunkte ab Beginn der Dissoziation gespeichert. Damit entspricht t_0 in Gleichung (3.1) dem ersten Wert dieses Vektors. Zudem wurde der Parameter B auf null gesetzt. Die Länge des Vektors wurde auf das hier verwendete Messprogramm abgestimmt, kann aber angepasst werden.

Berechnung der Dissoziationsratenkonstante

An diese Datenpunkte wird nun die entsprechende Exponentialfunktion (Gleichung (3.1)) angepasst und so die Dissoziationsratenkonstante ermittelt.

Prinzipiell ist es möglich, k_d über die Krümmung der Exponentialfunktion aus der Dissoziation aller Messungen zu berechnen. Dennoch ist es so, dass der Signalhub zwischen Beginn und Ende der Dissoziationsphase für hohe Konzentrationen höher ist, als für niedrigere. Der Verlauf der Dissoziationsphase bei niedrigen Konzentrationen lässt sich mit dem für höhere Konzentrationen in Übereinstimmung bringen, wenn der erstere zeitlich versetzt angepasst wird. Dies ist in den Abbildungen 4.35 und 4.36 gezeigt. Diese Anpassung hat aber den Nachteil, dass für niedrige Konzentrationen ein Teil der Messpunkte der Assoziationsphase zur Berechnung mit einbezogen werden, was den Wert der Dissoziationsratenkonstante verfälscht. k_d ist in der Anpassung über alle Konzentrationen um eine Größenordnung kleiner. Desweiteren sind die statistischen Parameter für diese Anpassung schlechter (kleinere Fehlerquadratsumme (sse) und kleinere mittlere quadratische Abweichung (rms), sowie höherer R^2 -Wert). Eine Übersicht über die Fitparameter und ihrer statistischen Parameter sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 gegeben. Die Verfälschung der Werte wird vermieden, in dem zur Anpassung der Exponentialfunktion nur die höheren Antikörperkonzentrationen verwendet werden (siehe Abbildungen 4.37 und 4.38). Dies ist zulässig, da k_d unabhängig der Konzentration bestimmbar ist. Auch ist der Einfluss von möglicherweise auftretender Rückbindung geringer, da bei hohen Antikörperkonzentrationen ein Großteil der Bindungsstellen an der Oberfläche besetzt ist und nicht zur Bindung abdissoziierter Antikörpermoleküle zur Verfügung steht.

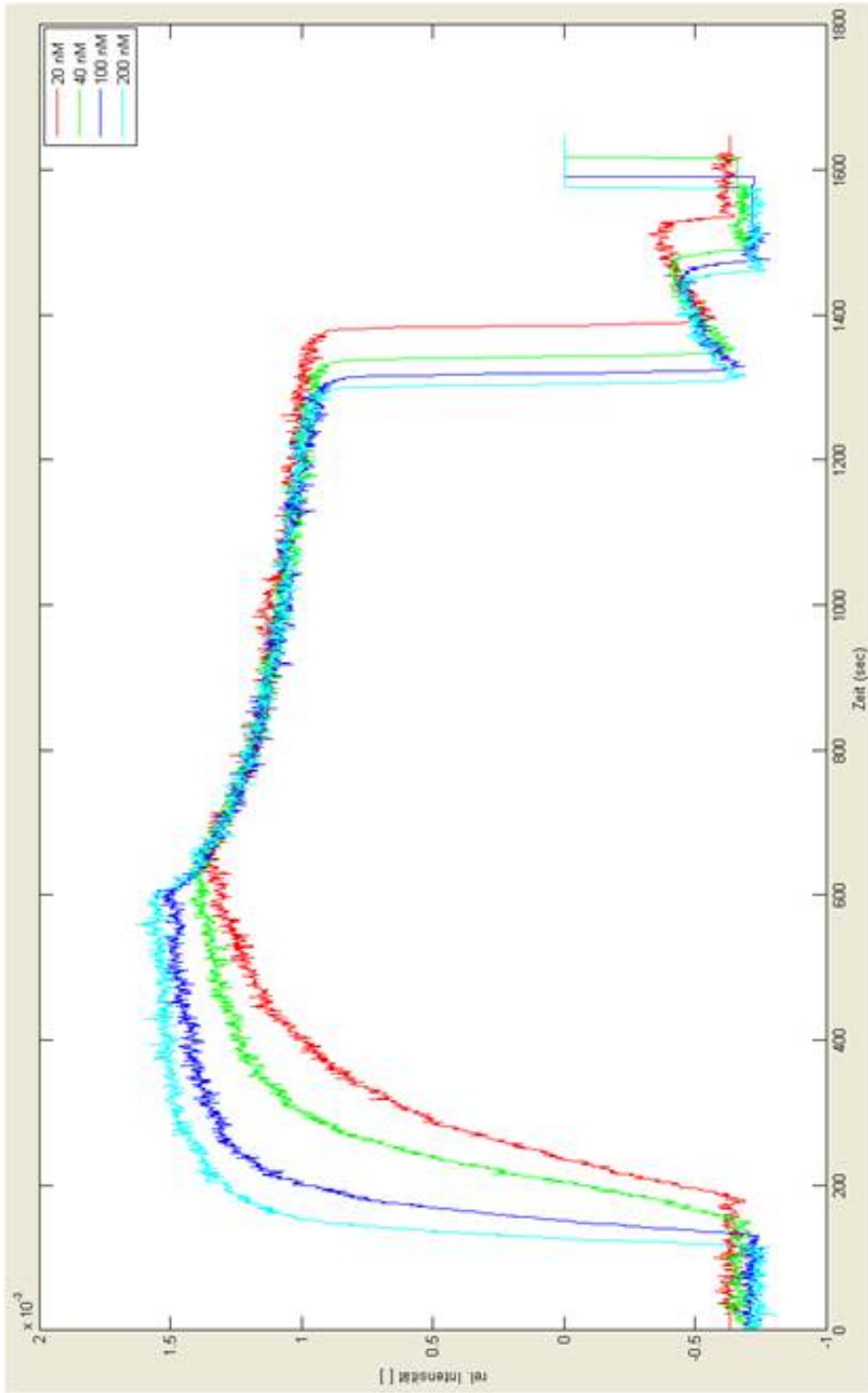


Abbildung 4.35: Bindungskurven für Peptid 6 zur Anpassung der Dissoziationsratenkonstanten über alle gemessenen Konzentrationen: Zur Anpassung der Dissoziationsratenkonstanten werden die Dissoziationsphasen der einzelnen Messkurven so angepasst, dass sie in ihrer Krümmung übereinstimmen. Um eine gute Übereinstimmung der Kurven zu erhalten, werden die Kurven niedrigerer Antikörperkonzentrationen aufgrund geringerer Krümmung zeitlich nach hinten verschoben.

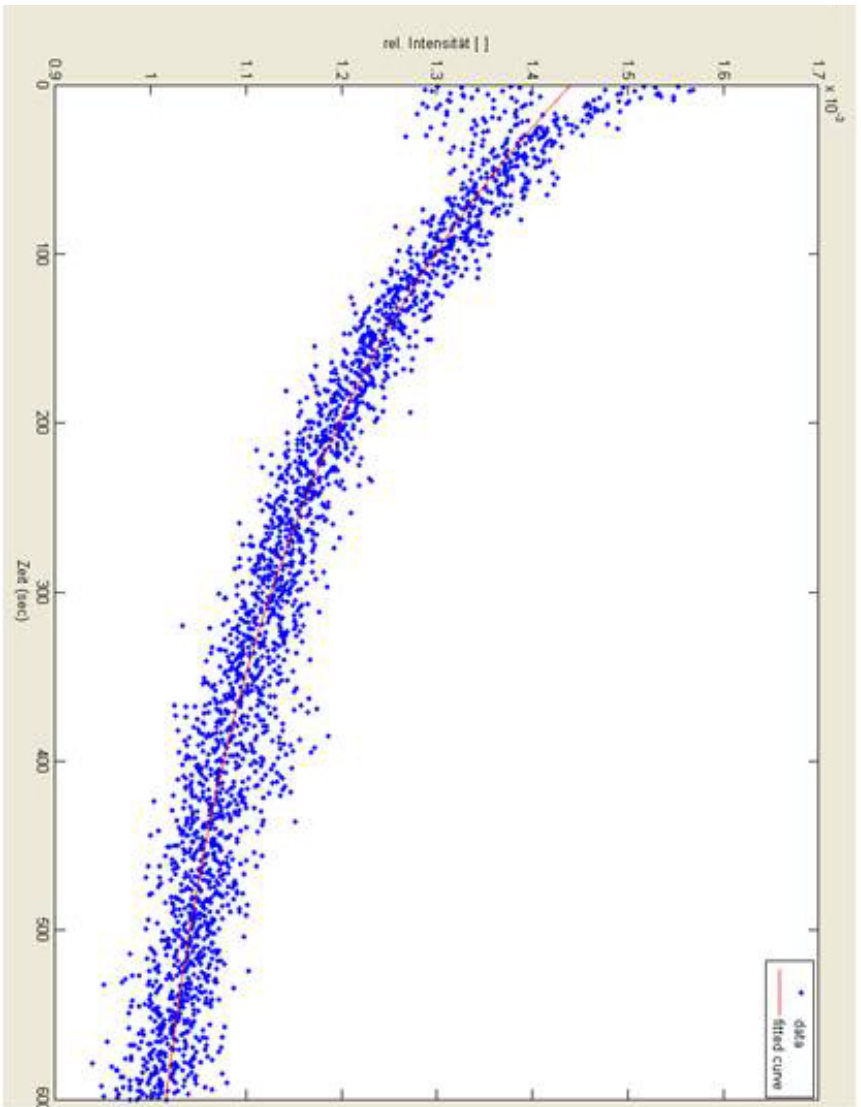


Abbildung 4.36: Fit zur Bestimmung von k_d über alle Konzentrationen: Die Software zeigt den ausgewählten Fitbereich an. Dabei wird ersichtlich, dass durch die zeitliche Verschiebung der Messkurven niedriger Konzentration, Messpunkte in den Fit mit einbezogen werden, die dem Sättigungsbereich der Bindungskurve angehören. Dadurch wird der angepasste k_d -Wert verfälscht.

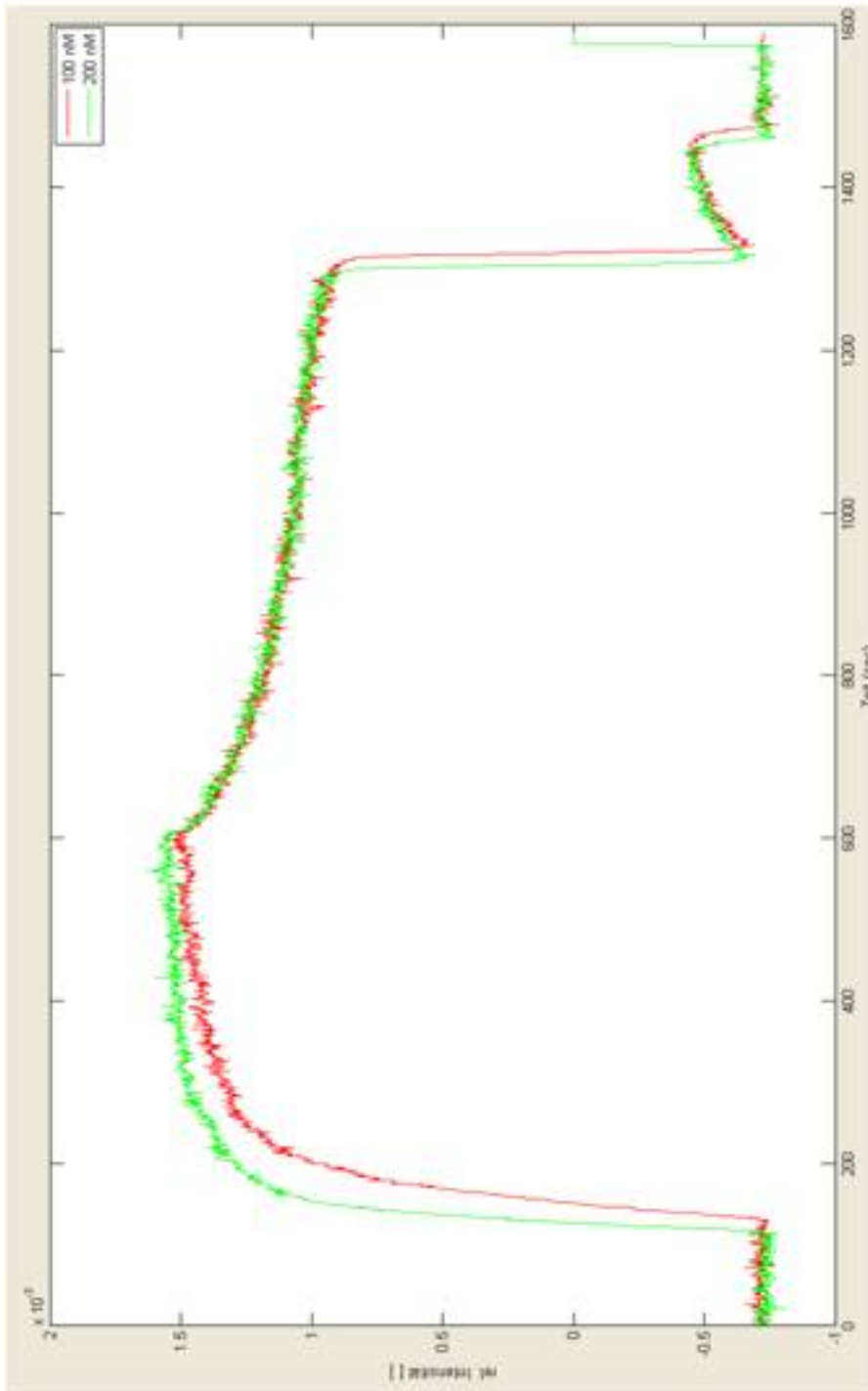


Abbildung 4.37: Bindungskurven für Peptid 6 zur verbesserten Anpassung der Dissoziationsratenkonstanten über 100 und 200 nM: Um die oben beschriebene Verfälschung der Dissoziationsratenkonstante zu umgehen, werden nur die beiden höchsten Antikörperkonzentrationen zur Anpassung von k_d verwendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

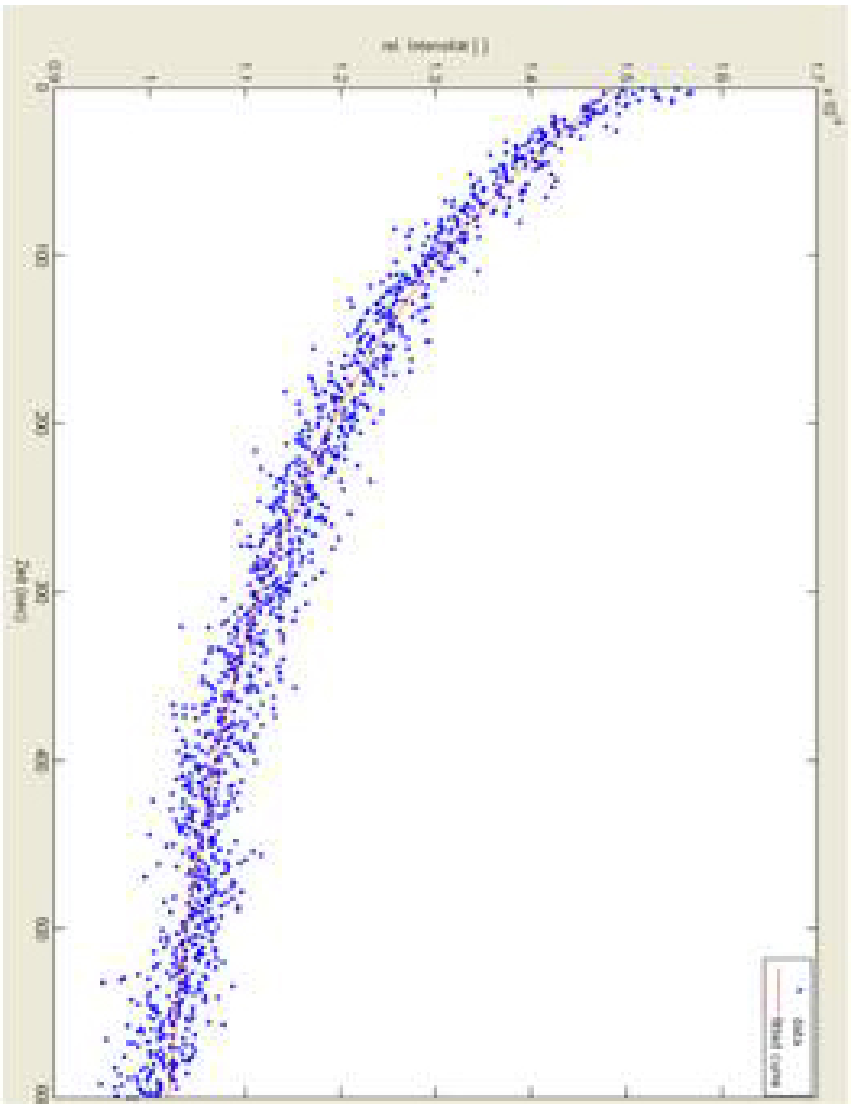


Abbildung 4.38: Fit zur Bestimmung von k_d über 100 und 200 nM: Der Fitbereich zeigt eine einheitliche Krümmung der beiden Messkurven im gewählten Auswertebereich. Entsprechend liefert die Anpassung der Exponentialfunktion zur Bestimmung von k_d zuverlässige Werte.

Tabelle 4.6: Fitparameter für die Anpassung von k_d über alle Konzentrationen und die Genauigkeitswerte des Fits

Koeffizient	Werte
a	$(4.8 \pm 0.05) * 10^{-4}$
c	$(9.6 \pm 0.05) * 10^{-4}$
k_d	$(4.9 \pm 1.4) * 10^{-4}$
Genauigkeitswerte	
sse	$2.077 * 10^{-6}$
rsquare	0.942
rmse	$2.94 * 10^{-5}$

Tabelle 4.7: Fitparameter für die Anpassung von k_d über 100 nM und 200 nM und die Genauigkeitswerte des Fits

Koeffizient	Werte
a	$(5.0 \pm 0.05) * 10^{-4}$
c	$(9.9 \pm 0.05) * 10^{-4}$
k_d	$(4.5 \pm 0.08) * 10^{-3}$
Genauigkeitswerte	
sse	$7.054 * 10^{-7}$
rsquare	0.965
rmse	$2.43 * 10^{-5}$

Alternativ wäre es aber auch möglich, wenn auch aufwendiger gewesen, k_d für jede Konzentration getrennt zu berechnen und dann ein mittleres k_d zu berechnen.

Anpassung der Lage und der Größe des Fitbereichs für die scheinbare Ratenkonstante

Desweiteren bietet die Software die Möglichkeit den Fitbereich für die scheinbare Ratenkonstante k_s zu optimieren (siehe Abbildung 4.39). Dazu wird Gleichung (3.2) an die Assoziationsphase angepasst.

Dabei können sowohl die Größe, als auch die Lage des Fitbereichs unabhängig voneinander optimiert werden. Mit der Größe des Fitbereichs wird festgelegt, über wie viele Datenpunkte die Assoziationsphase gefittet werden soll, um k_s zu ermitteln. Dies wird im Feld „Intervallbreite“ angegeben. Die hier angegebene Anzahl der Datenpunkte entspricht der halben Intervallgröße. Denn ausgehend von einem gewünschten Startwert, dem Krümmungspunkt, wird die Anzahl der Datenpunkte symmetrisch nach unten und oben in den Fit miteinbezogen.



Abbildung 4.39: Optimierung des Fitbereichs für die scheinbare Ratenkonstante k_s . Die Software bietet zwei Optionen:

Zum einen kann die Intervallbreite variiert werden. Dazu wird im entsprechenden Feld die maximale Intervallbreite angegeben und der gewünschte Krümmungspunkt. Wird dann das Feld „Intervallgröße“ variiert gewählt, wird das Intervall zur Anpassung von k_s schrittweise von 40 Datenpunkte auf zweimal die vorgegebene Intervallgröße erweitert. Die zugehörigen Werte (k_s , R^2 -Wert der Funktion und der relative Fehler von k_s) werden anschließend angezeigt.

Zum anderen kann die Lage des Krümmungspunktes variiert werden. Dazu wird bei der vorgegebenen Intervallbreite der Krümmungspunkt um ± 50 Datenpunkte um den vorgegebenen Krümmungspunkt verschoben und die entsprechenden Parameter (k_s , R^2 -Wert der Funktion und der relative Fehler von k_s) angezeigt.

Soll die Lage des Fitbereichs variiert werden, kann das ebenfalls ausgewählt werden. In diesem Fall wird der Krümmungspunkt festgelegt und dieser dann bei einer festen Intervallbreite variiert. Der Krümmungspunkt und mit ihm der Fitbereich wird jeweils um ± 50 Datenpunkte nach links und rechts von dem eingegebenen Krümmungspunkt verschoben. Der jeweils nicht betrachtete Parameter wird dabei jeweils auf einen bestimmten, vorzugebenden Wert festgesetzt.

Als Parameter um k_s zu optimieren, dienen jeweils der R^2 -Wert der Funktion und der relative Fehler von k_s (Fehler von k_s zu k_s -Wert). Daneben wird noch der absolute Fehler des Fits angezeigt. Der Fitbereich von k_s kann über die gleichzeitige Maximierung des R^2 -Wertes und Minimierung des relativen Fehlers gefunden werden. Dieser Bereich kann für jede auszuwertende Konzentration einzeln angepasst werden.

Berechnung der scheinbaren Ratenkonstanten, sowie der Assoziationsratenkonstante und der Affinitätskonstante

Im nächsten Schritt wird für jede Konzentration der k_s -Wert ermittelt und gegen die entsprechenden Konzentration aufgetragen. Daraus ergibt sich dann die Assoziationsratenkonstante, wobei der zuvor ermittelte Wert für k_d als Ordinatenabschnitt festgesetzt wird. In einem letzten Schritt wird nach Gleichung (2.1) die Affinitätskonstante ermittelt und die entsprechenden Daten abgespeichert (siehe Abbildungen 4.40 und 4.41).

Für alle exponentiellen und linearen Anpassungen gibt die Software auch die statistischen Genauigkeitswerte Summe der quadrierten Fehler (sse), R^2 , korrigiertes R^2 und quadratisches Mittel (rmse) aus. Diese erlauben eine Überprüfung der errechneten Anpassung.

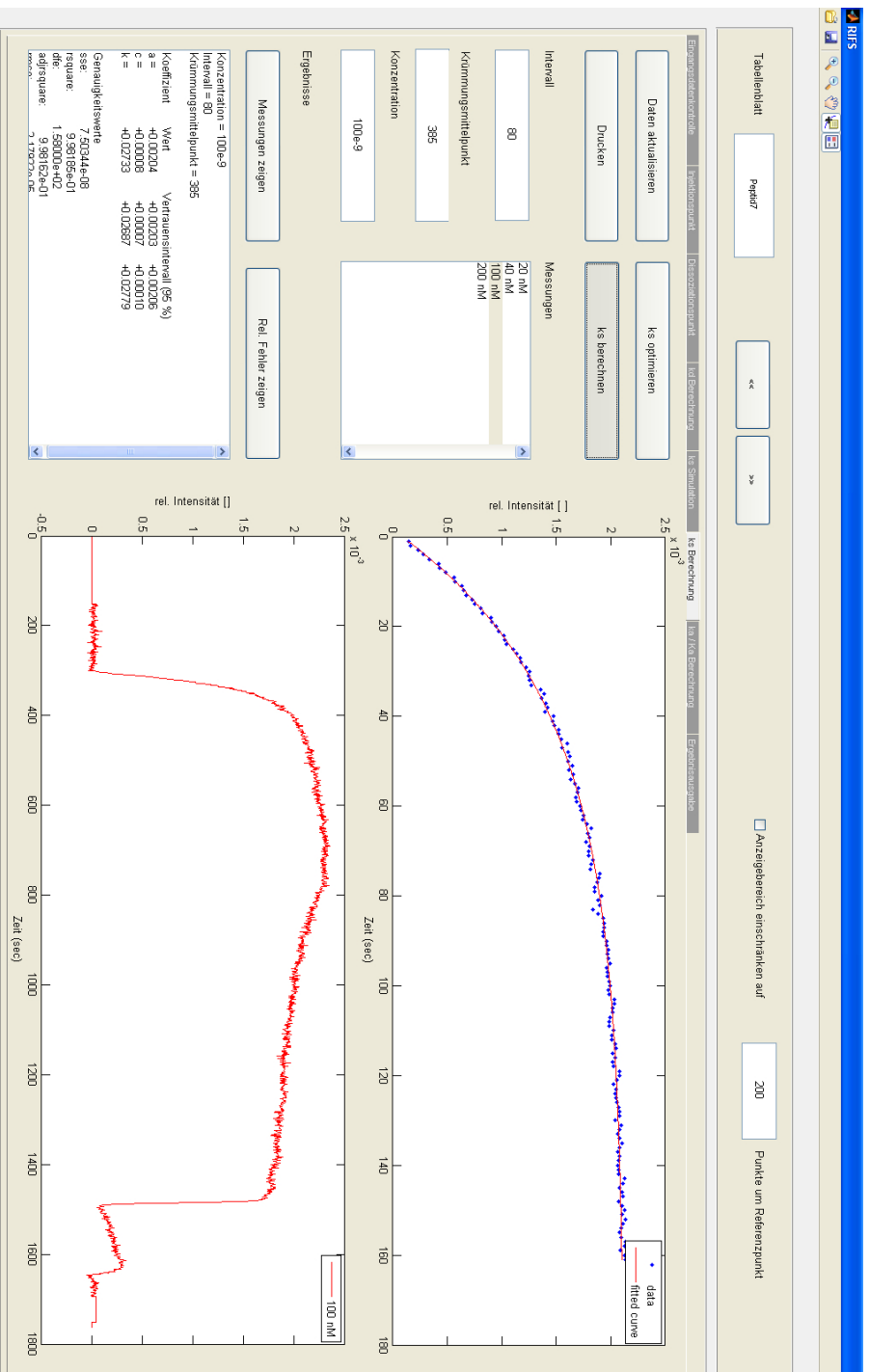


Abbildung 4.40: Berechnung von k_s über Anpassung der Exponentialfunktion: Die Bestimmung von k_s erfolgt je gemessener Antikörperkonzentration. Dazu werden die Intervallgröße und der Krümmungspunkt, sowie die Antikörperkonzentration angegeben. Der jeweilige berechnete k_s -Wert wird intern gespeichert.

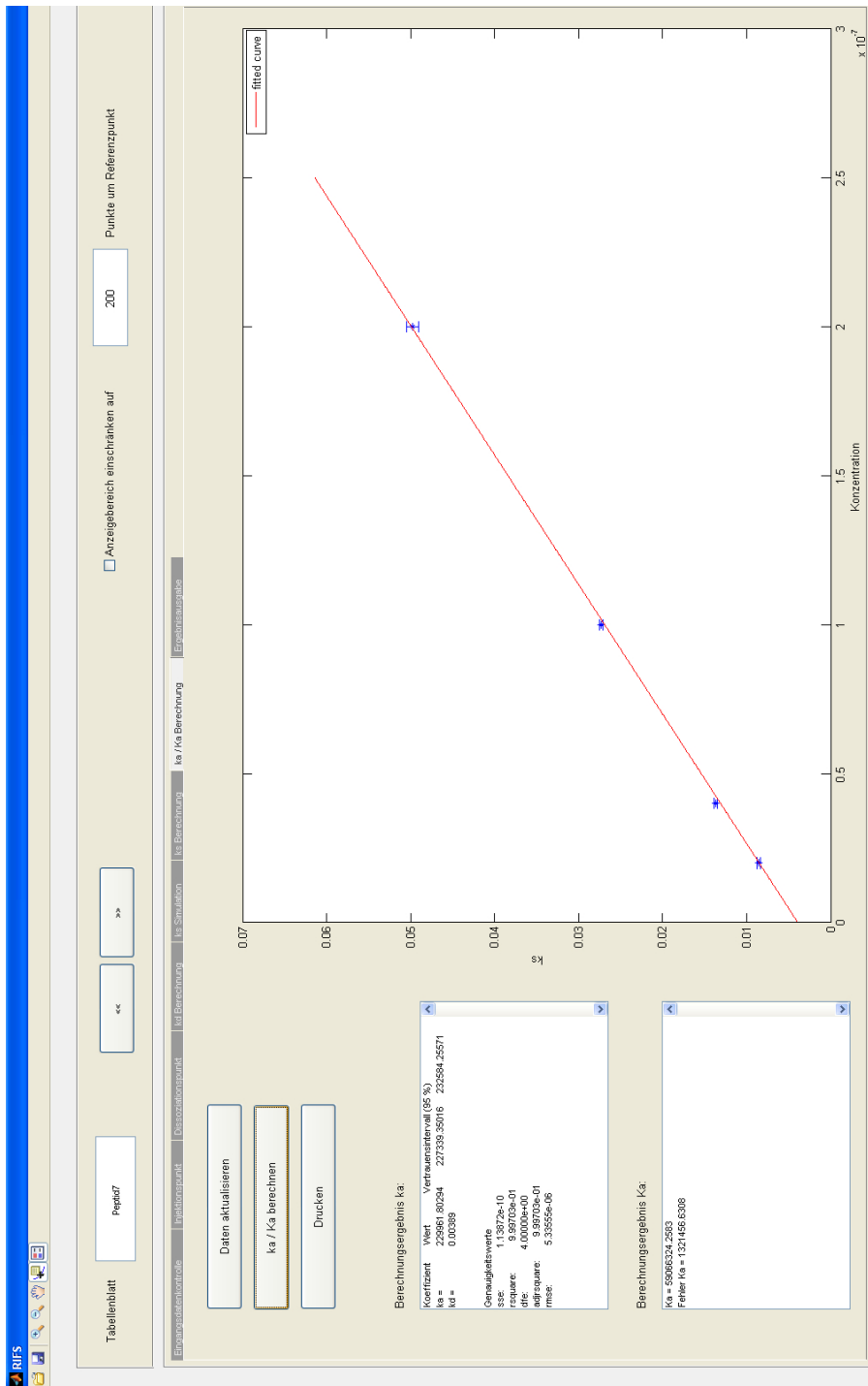


Abbildung 4.41: Berechnung von k_a über eine lineare Anpassung, sowie $K_{a,f}$: Die gespeicherten k_s -Werte werden gegen die zugehörigen Antikörperkonzentration aufgetragen und k_a mittels eines linearen Fits bestimmt. Der zuvor ermittelte k_d -Wert dient dabei als Ordinatenabschnitt. $K_{a,f}$ wird aus dem Quotienten von k_a und k_d bestimmt.

4.6.2 Beeinflussung der scheinbaren Ratenkonstante über die Auswahl der Intervallbreite und dessen Lage

Wie oben bereits erwähnt, erlaubt die Software die systematische Optimierung des Anpassungsbereichs für k_s . Im Folgenden soll die Optimierung der beiden Parameter Intervallbreite und Krümmungspunkt für Peptid 7 bei zwei verschiedenen Antikörperkonzentrationen (20 nM und 200 nM anti-Transglutaminaseantikörper) untersucht und diskutiert werden.

Anpassung für niedrige Antikörperkonzentrationen (20 nM anti-Transglutaminaseantikörper)

In den Abbildungen 4.42 und 4.43 sind die Werte für k_s in Abhängigkeit der Lage des Krümmungspunktes und der Intervallbreite gezeigt.

Bei niedrigen Antikörperkonzentrationen und geringeren Krümmungen der Bindungskurven wird kein ausgeprägtes Maximum für k_s erhalten. Der Wert schwankt über einen weiten Bereich nur gering. Dies spiegelt sich auch in den Werten für den relativen Fehler wieder. Dieser steigt erst bei einer Lage des Krümmungspunktes beim Zeitpunkt 580 sec an. Dies fällt mit einem Abfall der k_s -Werte zusammen. Der R^2 -Wert fällt über den gesamten untersuchten Bereich ab, liegt aber für alle Punkte im Bereich zwischen 0.985 und 0.945. Für niedrige Antikörperkonzentrationen gibt es einen breiten Bereich für die Wahl des Krümmungspunktes, so dass im vorliegenden Fall ein Punkt in der Mitte des betrachteten Bereichs um ca. Datenpunkt 540 gewählt wird.

Die Variation der Intervallbreite ergibt, dass sich der k_s -Wert ab Intervallbreiten von größer 90 Datenpunkten stabilisiert. Dann steigt auch der R^2 -Wert und sinkt der relative Fehler. Generell konnte beobachtet werden, dass bei niedrigeren Antikörperkonzentrationen größere Intervallbreiten für eine gute Anpassung nötig sind, als bei höheren Antikörperkonzentrationen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gill (Gill u. a., 1996). Bei kleineren Intervallbreiten streuen die Werte für k_s insgesamt stärker (Daten nicht gezeigt). Zu beachten ist aber bei kleinen Antikörperkonzentrationen, dass der lineare Bereich zu Beginn der Messung nicht mit in das Intervall zur Anpassung mit einbezogen wird. In diesem Bereich liegen für geringe Antikörperkonzentrationen zum Teil noch massentransportkontrollierte Verhältnisse vor, die die anzupassende Konstante verfälschen würden.

Anpassung für hohe Antikörperkonzentrationen (200 nM anti-Transglutaminaseantikörper)

In den Abbildungen 4.44 und 4.45 sind die Werte für k_s in Abhängigkeit der Lage des Krümmungspunktes und der Intervallbreite gezeigt.

Bei hohen Antikörperkonzentrationen und entsprechend stärker gekrümmten Bindungskurven ergeben sich für die beobachteten Parameter k_s -Wert, rel. Fehler und R^2 -Wert bei der Variation des Krümmungspunktes Extrempunkte, die in einem bestimmten Bereich der Messpunkte liegen und für alle drei Werte zusammenfallen. Der optimale Wert für

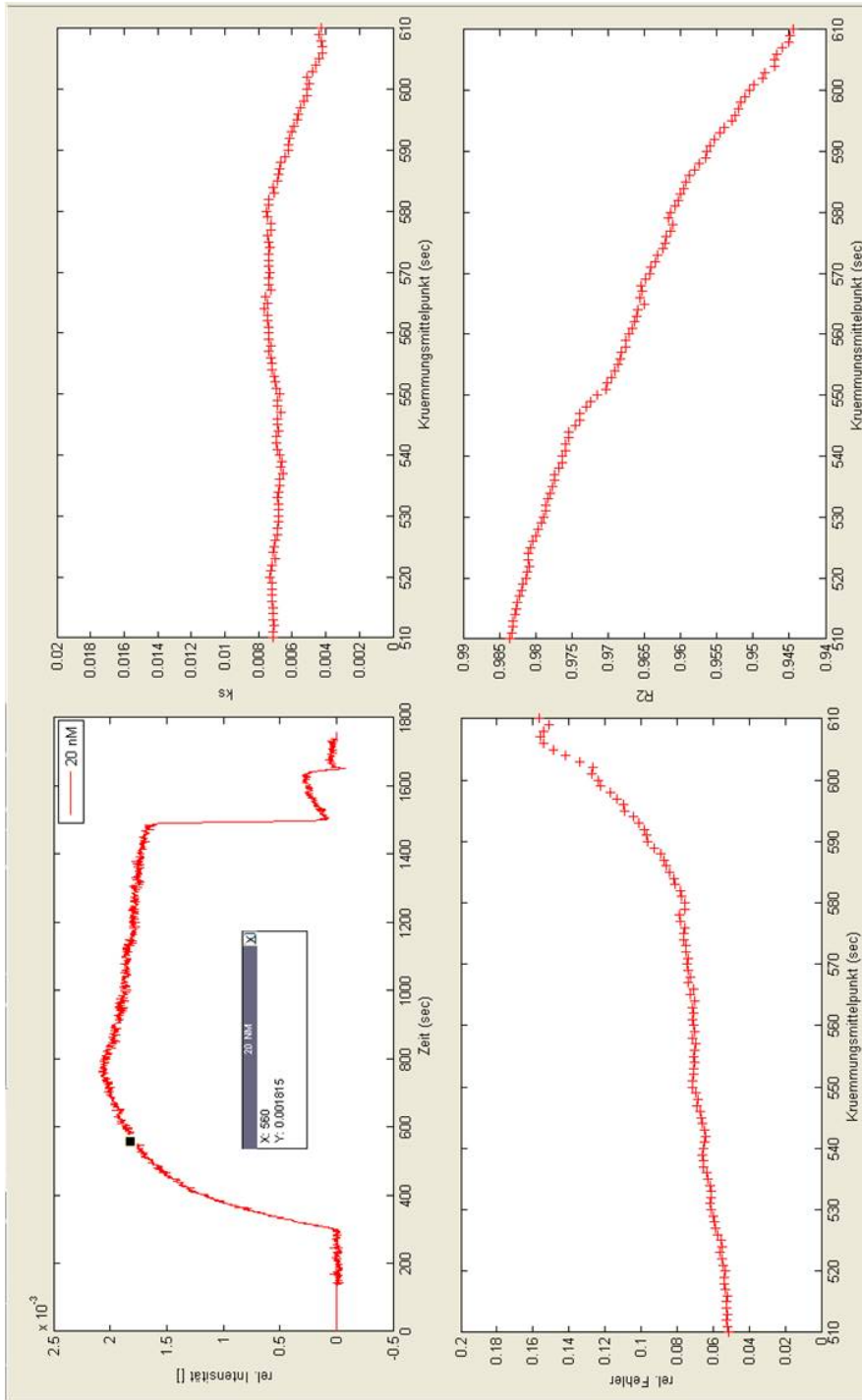


Abbildung 4.42: Variation des Krümmungspunktes für eine niedrige Antikörperkonzentration (20 nM) über 100 Datenpunkte hinweg (560 sec \pm 50 Datenpunkte). Gezeigt ist die Bindungskurve, die entsprechenden k_s -Werte und der zugehörige R^2 -Wert, sowie der relative Fehler von k_s .

4 Ergebnisse und Diskussion

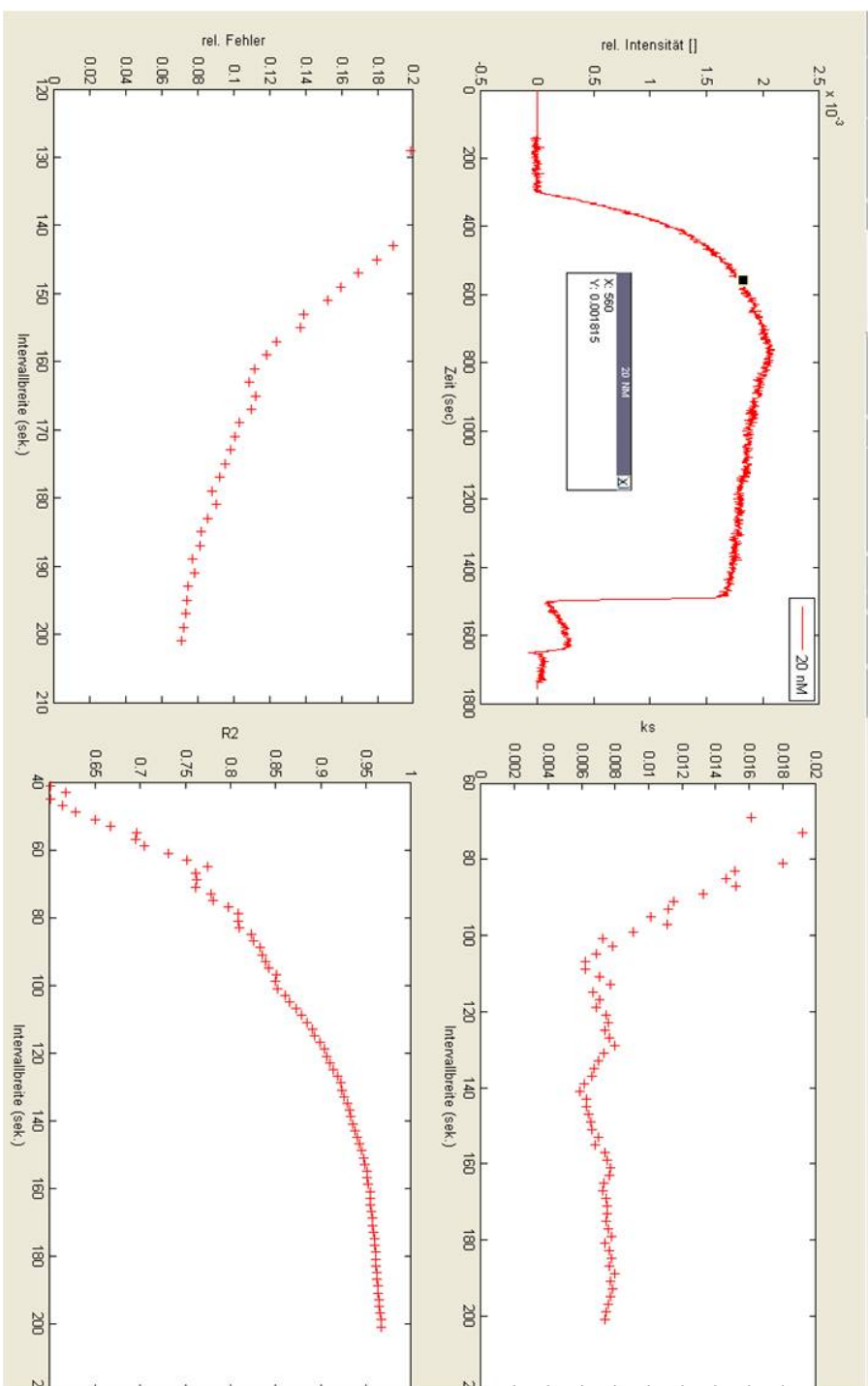


Abbildung 4.43: Variation der Intervallbreite von 40 bis 100 Datenpunkte für eine niedrige Antikörperkonzentration (20 nM). Gezeigt ist die Bindungskurve, die entsprechenden k_s -Werte und der zugehörige R^2 -Wert, sowie der relative Fehler von k_s .

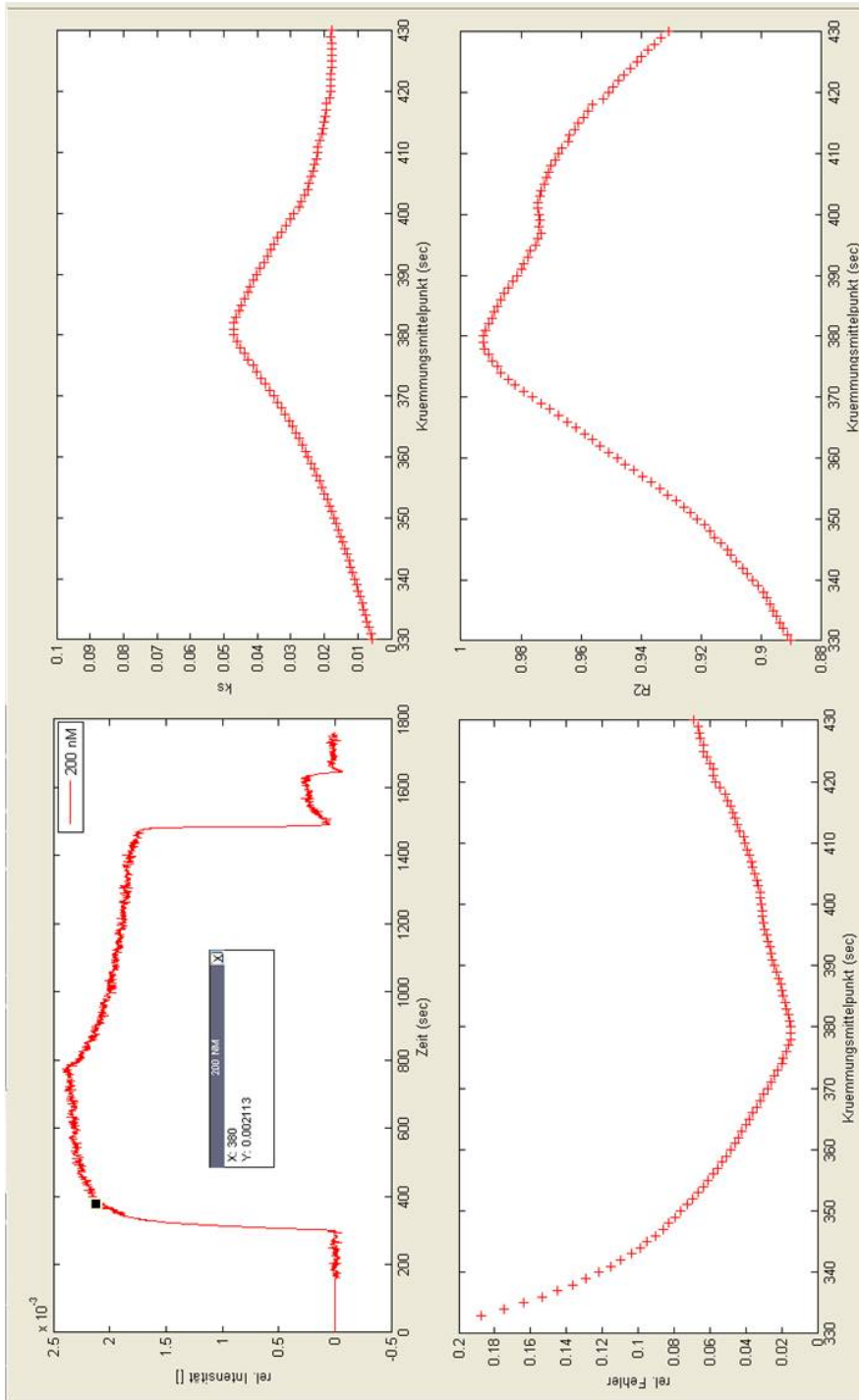


Abbildung 4.44: Variation des Krümmungspunktes für eine hohe Antikörperkonzentration (200 nM) über 100 Datenpunkte hinweg (560 sec \pm 50 Datenpunkte). Gezeigt ist die Bindungskurve, die entsprechenden k_s -Werte und der zugehörige R^2 -Wert, sowie der relative Fehler von k_s .

4 Ergebnisse und Diskussion

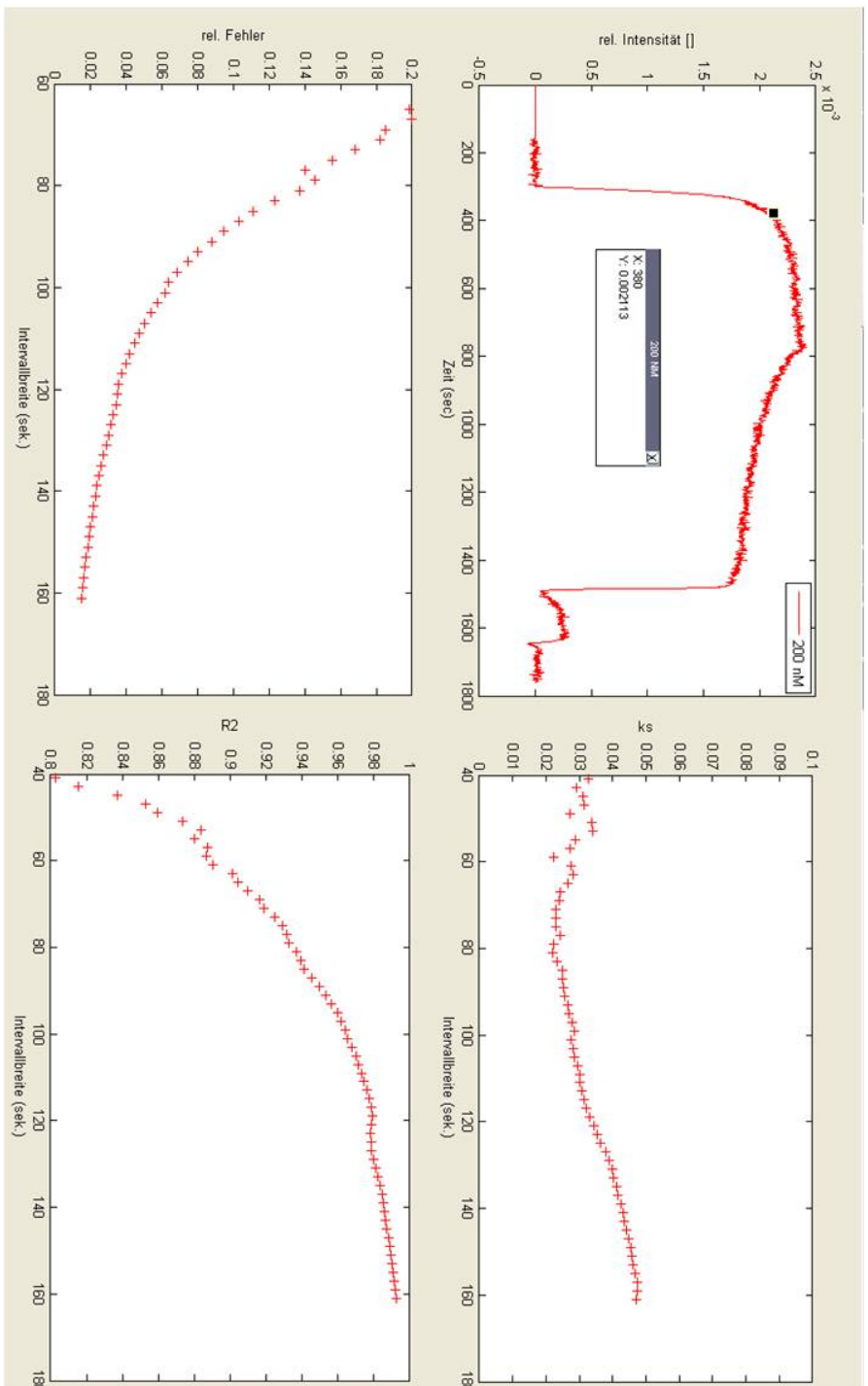


Abbildung 4.45: Variation der Intervallbreite von 40 bis 160 Datenpunkte für eine hohe Antikörperkonzentration (200 nM). Gezeigt ist die Bindungskurve, die entsprechenden k_s -Werte und der zugehörige R^2 -Wert, sowie der relative Fehler von k_s .

den k_s -Wert kann dann entsprechend des Maximums für k_s und des R^2 -Wertes sowie am Minimum des relativen Fehlers gewählt werden. In dem hier gezeigten Beispiel mit einer halben Intervallbreite von 80 Datenpunkten liegt das Maximum bei 380 Datenpunkten. Bei einer halben Intervallbreite von 60 Datenpunkten liegen die Extrempunkte bei 360 Datenpunkten (Daten nicht gezeigt), so dass ein Maximum von k_s und ein Minimum des relativen Fehlers immer in einem bestimmten Bereich der Messkurve zu finden sind.

Für die Abhängigkeit des k_s -Wertes von der Intervallbreite ergibt sich auch bei hohen Konzentrationen, dass sich der k_s -Wert, R^2 -Wert und relativer Fehler mit zunehmender Größe stabilisieren und einem Maximum bzw. Minimum zustreben. Jedoch ist der Größe des Intervalls eine Grenze gesetzt, da noch größere Intervallbreiten dazu führen würden, dass Werte außerhalb der Assoziationsphase mit in die Anpassung einbezogen würden. Somit ergibt sich eine optimale Intervallbreite von 80 Datenpunkten bei einer Lage des Krümmungspunkt bei 380 Datenpunkten.

Zusammenfassung: Optimierung des Fitbereichs zur Berechnung von k_s

Für niedrige Antikörperkonzentrationen umfasst der Anpassungsbereich für k_s eine größere Intervallbreite als bei hohen Konzentrationen. Mit steigenden Antikörperkonzentrationen verschiebt sich die optimale Lage des Krümmungspunktes in Richtung Beginn der Assoziationsphase. Dieses Verhalten deckt sich mit den Ergebnissen einer weiteren Auswertestrategie für k_s , in dem eine Linearisierung der Messdaten zur Bestimmung von k_s vorgenommen wird. Neben der Ermittlung von k_s aus der Exponentialfunktion (vgl. Gleichung 2.5) kann die Ratenkonstante auch aus der Auftragung der Steigung der Bindungskurve gegen das Bindungssignal gewonnen werden. Dabei wird ein linearer Bereich gefunden, für welchen gilt, dass sich die Steigung gemäß Gleichung 4.1 k_s ergibt.

$$\frac{d[RL_{of}]}{dt} = -(k_a * [R_{bu}] + k_d)[RL_{of}] + k_a * [R_{bu}] * [RL_{of,\infty}] \quad (4.1)$$

In Abbildung 4.46 ist die entsprechende Auftragung für Peptid 7 mit 20 nM und 200 nM anti-Transglutaminase gezeigt. Für niedrigere Antikörperkonzentrationen umfasst der lineare Bereich mehr Datenpunkte als für höhere Antikörperkonzentrationen. Wobei der lineare Bereich für hohe Antikörperkonzentrationen auf den Beginn der Assoziationsphase beschränkt ist. Dieses Verhalten bestätigt die Ergebnisse der Software.

4.6.3 Vergleich der Daten aus der halbautomatisierten Software und Origin

Um die Funktion der Software zu überprüfen, wurde ein Vergleich der halbautomatisierten Software und Origin 8.1 angestellt. Dabei wurden mit beiden Programmen jeweils die verschiedenen Konstanten für Peptid 7 ermittelt. Mit der Software wurden zwei Berechnungen durchgeführt. Zum einen wurden die Daten rein über die Software angepasst und die entsprechende Optimierung für k_s durchgeführt. Zum anderen wurden in der Software genau die Fitbereiche verwendet, die auch in die Originberechnung einfließen. Der einzige Unterschied hierbei bestand darin, dass der k_d -Wert wie oben erläutert, nur

4 Ergebnisse und Diskussion

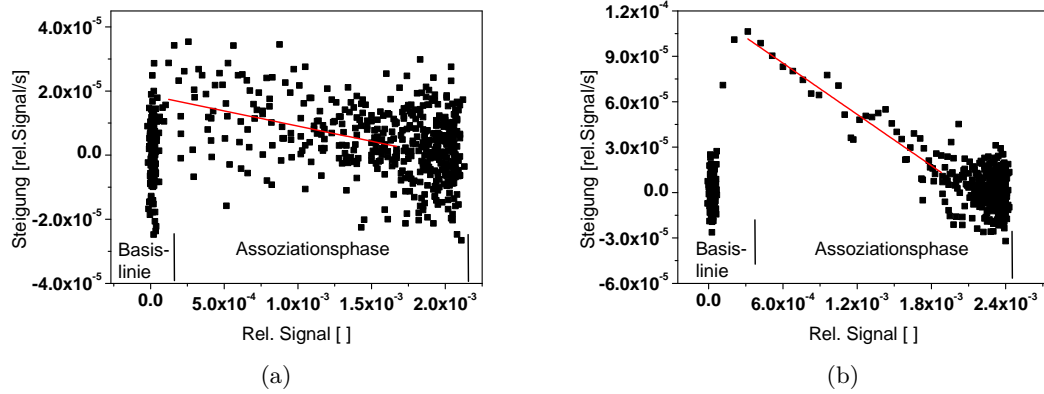


Abbildung 4.46: Bestimmung von k_s durch die Linearisierung der Bindungskurve. Gezeigt ist zudem die Zuordnung der Messpunkte zu den einzelnen Messphasen: Basislinie und Assoziationsphase, sowie die Anpassung des linearen Bereichs. (a) Auftragung für die Messung mit 20 nM anti-Transglutaminaseantikörper. (b) Auftragung für die Messung mit 200 nM anti-Transglutaminaseantikörper

aus den Kurven für 100 und 200 nM ermittelt wurde, während in die Originberechnung auch die niedrigeren Konzentrationen 20 und 40 nM mit einfließen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengestellt.

Tabelle 4.8: Vergleich der Ratenkonstanten und der Affinitätskonstante für Peptid 7 nach der Berechnung durch Origin und der halbautomatisierten Software

	k_d [s^{-1}]	k_a [$L * mol^{-1} * s^{-1}$]	K_{aff} [$L * mol^{-1}$]
Origin	$(3.82 \pm 0.08) * 10^{-3}$	$(2.3 \pm 0.1) * 10^5$	$(5.9 \pm 0.3) * 10^7$
Matlab wie Origin	$(4.1 \pm 0.1) * 10^{-3}$	$(2.3 \pm 0.2) * 10^5$	$(5.6 \pm 0.5) * 10^7$
Matlab	$(4.07 \pm 0.08) * 10^{-3}$	$(2.16 \pm 0.05) * 10^5$	$(5.3 \pm 0.2) * 10^7$

Der Vergleich der einzelnen Konstanten ergibt im Allgemeinen eine gute Übereinstimmung der Auswertestrategien manuell mittels Origin und halbautomatisiert mittels der entwickelten Software. Genauer betrachtet finden sich die größten Abweichungen im Bereich der Dissoziationsratenkonstante. Hierbei werden bei den Berechnungen mittels der halbautomatisierten Software Werte erhalten, die ca. 7% höher liegen, als die mittels globalem Fit in Origin berechneten. Als Ursache hierfür kommt in Betracht, dass in der halbautomatisierten Software nur die beiden höchsten Konzentrationen zur Berechnung mit einbezogen werden. Eine Korrektur des Wertes könnte erreicht werden, in dem für jede Konzentration die Dissoziationsratenkonstante separat berechnet und dann der Mittelwert gebildet wird. Denkbar wären auch, dass bei niedrigen Antikörperkonzentrationen

Rückbindungseffekte auftreten, die den Wert von k_d beeinflussen und der über alle Konzentrationen ermittelte Wert zu gering ist.

Der Vergleich der k_a -Werte ergibt praktisch gleiche Werte für die Berechnung mit der Software und Origin, wenn gleiche Fitbereiche gewählt werden. Wird die Berechnung lediglich über die Anpassung mit der Software durchgeführt, wird ein etwas niedrigerer Wert erhalten. Dies kann durch den höheren k_d Wert verursacht sein, der als Ordinatenabschnitt in die Berechnung der Ausgleichsgeraden mit einfließt. Durch einen höheren Wert wird eine flachere Ausgleichsgerade und somit auch ein niedrigeres k_a erhalten. Als weitere Ursachen sind auch die Verwendung unterschiedlicher Anpassungsbereiche für die Ermittlung von k_s denkbar. Dennoch bewegen sich die Abweichungen hier im Bereich von 6% und damit in einem statistisch tolerablen Bereich. Aus den Differenzen der kinetischen Konstanten ergeben sich ebenso Differenzen zwischen den einzelnen Affinitätskonstanten. Wie aus den vorhergehenden Beobachtungen zu erwarten, liegen die K_{aff} -Werte für Origin höher als für die halbautomatisierte Software. Sie sind um 6 bzw. 9% niedriger, wobei sich die Konstanten aus Origin und der Software mit gleichen Fitbereichen statistisch nicht unterscheiden.

Der Vergleich der halbautomatisierten Software und den Daten, die mittels Origin-Auswertung erhalten wurden, ergab Schwankungen in den einzelnen Konstanten zwischen 6 und 9%. Diese Werte liegen im Bereich der tolerierbaren Abweichungen. Wobei die geringsten Abweichungen erhalten wurden, wenn möglichst ähnliche Auswertebereiche verwendet wurden. Auch die Optimierungsstrategie von k_s , wie sie in der Software zum Einsatz kommt, ist geeignet, was durch die geringen Abweichungen bestätigt werden konnte. Die Software ist somit zur Auswertung kinetischer Messungen geeignet und beschleunigt die Auswertung komplexerer Arrays.

4.7 Kinetische Analyse des FLAG-Epitops

Über ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von R. Bischoff, Chipbasierte Peptidbibliotheken am DKFZ in Heidelberg standen komplexere Peptidarrays zur kinetischen Analyse zur Verfügung. Diese Arrays wurden nach der in Kapitel 3.2.5 beschriebenen On-Chip-Peptidsynthese auf Goetheglas hergestellt und umfassten Sequenzvarianten des FLAG-Epitops. Dabei waren die Aminosäuren an bestimmten Positionen der Peptide durch den gesamten Sequenzraum durchpermutiert, so dass der Einfluss des Austauschs einzelner Aminosäuren auf die Ratenkonstanten und damit auch auf die Affinität zu dem entsprechenden monoklonalen Antikörper untersucht werden konnte.

4.7.1 Auswahl einer zur Messung und Auswertung geeigneten Wellenlänge

Die On-Chip Peptidsynthese erforderte die Anpassung des Polymers zur Oberflächenbeschichtung aufgrund der verwendeten Synthesechemie. Für die hier verwendeten Arrays kam eine am DKFZ entwickelte Oberflächenbeschichtung mit dem Copolymer PEGMA-PMMA zum Einsatz. Dieses Schichtsystem weist in trockenem Zustand eine Schichtdicke

4 Ergebnisse und Diskussion

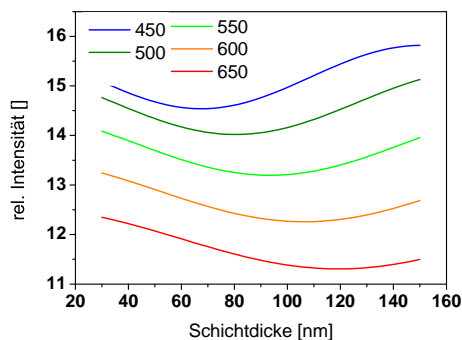


Abbildung 4.47: Simulation der rel. Reflektivität für die PEGMA-PMMA-Beschichtung mit FilmWizzard für vier verschiedene Wellenlängen und einer Schichtdicke bis 150 nm

von ca. 70 nm auf (C. Schirwitz, mündliche Kommunikation).

Simulationen mit FilmWizzard

Aufgrund dieser großen Differenz zu den bisher verwendeten AMD50- und PEG- Oberflächen wurde die Auswahl einer geeigneten Auswertungswellenlänge nochmals anhand einer Simulation in FilmWizzard überprüft. In Abbildung 4.47 sind die entsprechenden Ergebnisse der Simulation für vier verschiedene Wellenlängen und eine Schichtdicke bis 150 nm gezeigt.

Die Simulation zeigt, dass alle untersuchten Wellenlängen im Bereich von 70-120 nm Schichtdicke ein Minimum durchlaufen, an dem die Änderung der relativen Reflektivität nicht mehr linear zur Änderung der Schichtdicke verläuft. Dies ist für die Auswertung der Messungen ungünstig. Die geeignete Wellenlänge hängt nun stark davon ab, in welchem Ausmaß das Polymer unter Puffer quillt. Bei geringem Quellungsverhalten sind Wellenlängen im blauen Bereich (450 nm) zur Auswertung geeignet, bei starkem Quellungsverhalten und einer Schichtdickenzunahme unter Puffer von ca. 60-70 nm kann auf LEDs im orange-roten Bereich zurückgegriffen werden. Bei den längeren Wellenlängen sind jedoch aufgrund geringerer Reflektivitäten geringere Intensitäten zu erwarten. Um genauere Aussagen über das Verhalten des Systems unter realen Messbedingungen machen zu können, wurde das Bindungsverhalten zweier Testsysteme untersucht.

Auswahl der Auswertewellenlänge anhand von Messungen an einem Testsystem

Zur Überprüfung der Simulationen wurden die PEGMA-PMMA beschichteten Transducer mit dem Testsystem Testosteron-anti-Testosteron im spektralen RIFS vermessen und anschließend die Auswertung für verschiedene Wellenlängen vorgenommen. Hierbei findet eine Antikörperanbindung an ein, auf der Oberfläche immobilisiertes, Testoste-

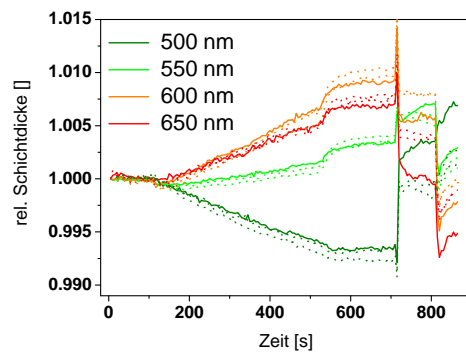


Abbildung 4.48: Bindungskurven der Messungen mit dem Testosteronsystem auf PEGMA-PMMA: Die Messung zeigt die Anbindung des anti-Testosteronantikörpers an eine mit Testosteronoxim beschichtete Transduceroberfläche. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Bindungskurven gleicher Farbe bezeichnen Replikamessungen. Die Auswertung erfolgte bei vier verschiedenen Wellenlängen.

ronderivat statt. Bildet sich dabei eine Monolage an Antikörper, entspricht dies einer Schichtdickenänderung von etwa 10 nm. Eine Änderung in dieser Größenordnung wird auch für die Wechselwirkung zwischen Peptid und Antikörper erwartet, wenn später die am DKFZ hergestellten Arrays vermessen werden sollen.

Für die Testosteron-anti-Testosteronmessungen wurden 2 mg/l anti-Testosteronantikörper eingesetzt und die Anbindung auf einer mit Testosteron beschichteten Transduceroberfläche verfolgt. Die Messungen mit dem anti-Testosteronantikörper wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.48 gezeigt.

Die Auswertungen der Messungen nach Wellenlänge ergaben wie erwartet eine starke Abhängigkeit des Bindungssignals von der Wellenlänge. Für 500 nm werden die größten Änderungen, für 550 nm die geringsten Änderungen erhalten. Desweiteren fällt auf, dass für Auswertewellenlängen kleiner 550 nm negative Bindungssignale, für Wellenlängen größer 550 nm positive Bindungssignale erhalten werden.

Aus den erhaltenen Bindungskurven und den zuvor ermittelten Simulationen kann geschlossen werden, dass die Schichtdicke wesentlich höher als 70 nm sein muss. Es ist zu vermuten, dass die PEGMA-PMMA-Schicht auf eine Schichtdicke von über 200 nm quillt. Für dieses starke Quellungsverhalten spricht auch die Beobachtung, dass die Transducer beim Eindriften vor den Messungen sehr lange benötigen, bis eine stabile Basislinie erhalten wird. Die Schichtdicken würden somit in einem Bereich liegen, in dem die Reflektivität für 500 nm das Maximum schon wieder durchschritten hat, wodurch es zu negativen Bindungssignalen kommt. Für die anderen Wellenlängen steigt

die Reflektivität in diesem Bereich aber noch mit zunehmender Schichtdicke an, so dass positive Bindungssignale erhalten werden. Aufgrund des geringen Bindungssignals für 550 nm ist hier ein Maximum der Reflektivität anzunehmen.

Desweiteren ist es möglich, dass die Simulationen in Abbildung 4.47 nur bedingt die realen Verhältnisse des Schichtsystems widerspiegeln. Die Simulationen wurden unter der Annahme des Brechungsindex für AMD50 durchgeführt. Möglicherweise liegt der Brechungsindex der PEGMA-PMMA-Schicht in einem anderen Bereich als angenommen und die Extrema sind zu geringeren Schichtdicken hin verschoben.

Die Messungen zeigen, dass die sorgfältige Auswahl der Auswertewellenlänge für 1- λ -Messungen und die Überprüfung der simulierten Daten am realen Messsystem unabdingbar sind. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde eine geeignete Auswertewellenlänge bei ca. 500 nm gefunden. Die Auswertung zeigt jedoch, dass auch eine LED im Bereich von 520 nm, wie sie im verwendeten iRiFS-Aufbau vorliegt, zur Messung verwendet werden kann. Man erwartet für diese Wellenlänge aber etwas geringere Bindungssignale.

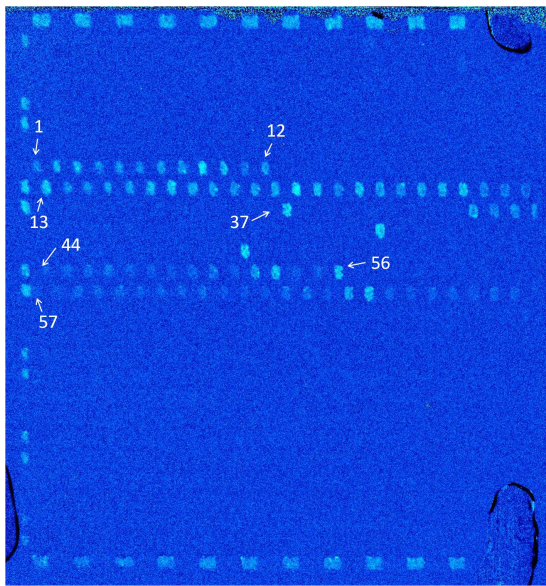
4.7.2 Analyse des FLAG-Systems

Nachdem in vorhergehenden Messungen das Bindungsverhalten, die Reproduzierbarkeit und die Regenerierbarkeit der FLAG-Arrays untersucht wurden, konnten mit optimierten Bedingungen kinetische Messungen des FLAG-Arrays am iRiFS-System durchgeführt werden. Dabei wurden folgende Antikörperkonzentrationen in PBS pH7.4 in Triplikatmessungen vermessen: 16.7 nM; 33.3 nM; 66.7 nM; 133.3 nM und 200 nM. Aufgrund fluidischer Probleme konnte für die Konzentration 16.7 nM nur eine Messreihe ausgewertet werden. Die Regeneration erfolgte mit 10 mM Glycin pH2. Abbildung 4.49 zeigt die Zuordnung der Spots zu den jeweils durchpermutierten Aminosäuren. Das Auslesen der Spotintensitäten erfolgte mittels imageJ und die Auswertung der kinetischen Messungen mittels der halbautomatisierten Software.

Generell ergaben die Ergebnisse wie auch schon in Abbildung 4.49 a ersichtlich, dass die Bindung des Antikörpers an das FLAG-Epitop von bestimmten Aminosäuren stärker abhängig ist als von anderen. Permutationen der Positionen 2 und 3 führen zu einem praktisch vollständigen Verlust der Bindefähigkeit, so dass der Antikörper nur dann das Peptid erkennt, wenn die originale Aminosäure vorhanden ist. Weit weniger empfindlich reagiert der Antikörper auf Permutationen der Positionen 1 und 5. Hier finden sich für alle ausgetauschten Aminosäuren Bindungssignale des Antikörpers. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sloostra et al (Slootstra u. a., 1997)

In Abbildung 4.50 sind die zur Auswertung benötigten Diagramme für Spot 10 (Asparagin (D) an Position 5 des FLAG-Epitops) dargestellt. Aus den Bindungskurven im Teilbild a) der Abbildung ist ersichtlich, dass die Kurven für die beiden obersten Konzentrationen (133.33 und 200 nM, bzw. bezeichnet als 10 und 15 μ g) bezüglich der Gleichgewichtsbeladung nicht mehr ganz zu trennen sind. Bei diesen Konzentrationen

4.7 Kinetische Analyse des FLAG-Epitops



(a)

FLAG-Sequenz	DYKDDDDKGG
Spot 1-38	DYKDDDDKGG
Spot 37,42	DYKDDDDKGG
Spot 43, 56	DYKDDDDKGG
Spot 44-72	DYKDDDDKGG

(b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51					
8	YPYDVVPDYAG	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	YPYDVVPDYAG					
9	DYKDDDDKGG	G	13	G	14	G	15	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G		G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	15	G	16	G	DYKDDDDKGG					
		P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	B	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S																															
10	DYKDDDDKGG	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	15	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	DYKDDDDKGG					
		T	V	W	Y	A	B	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A																														
		41	40	39	38																																																			
11	YPYDVVPDYAG	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	15	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G						
		B	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	B	D	E	F																															
12	YPYDVVPDYAG	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	15	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	YPYDVVPDYAG				
		G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	B	D	E	F	G	H	I	K	L																														
13	DYKDDDDKGG	G	11	G	12	G	13	G	14	G	16	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	DYKDDDDKGG					
		M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	B	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q																															
14	DYKDDDDKGG	15	G	16	G	17	G	18	G	19	G	20	G	1	G	2	G	3	G	4	G	5	G	6	G	7	G	8	G	9	G	10	G	11	G	12	G	13	G	14	G	15	G	16	G	17	G	18	G	19	DYKDDDDKGG					
		R	S	T	V	W	Y	A	B	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W																														

(c)

Abbildung 4.49: Zuordnung des FLAG-Arrays: (a) Quotientenbild des FLAG-Arrays bei 200 nM anti-FLAG-Antikörper. (b) Sequenz des FLAG-Epitops, markiert sind die veränderten Aminosäurepositionen. (c) Detaillierte Zuordnung des Arrays zu den entsprechenden Permutationen

4 Ergebnisse und Diskussion

ist die Maximalbeladung der Oberfläche erreicht. Dieser Effekt hat auch einen Einfluss auf die Bestimmung von k_a mittels einer linearen Anpassung und begründet das abweichende Verhalten des k_s -Wertes bei der höchsten Konzentration. Insgesamt weisen alle Bindungskurven einen überlagerten Drift auf. Dies ist insbesondere zu Beginn der Messungen und nach Erreichen der Gleichgewichtsbeladung augenfällig, aber ein typisches Verhalten der PEGMA-PMMA-Beschichtung.

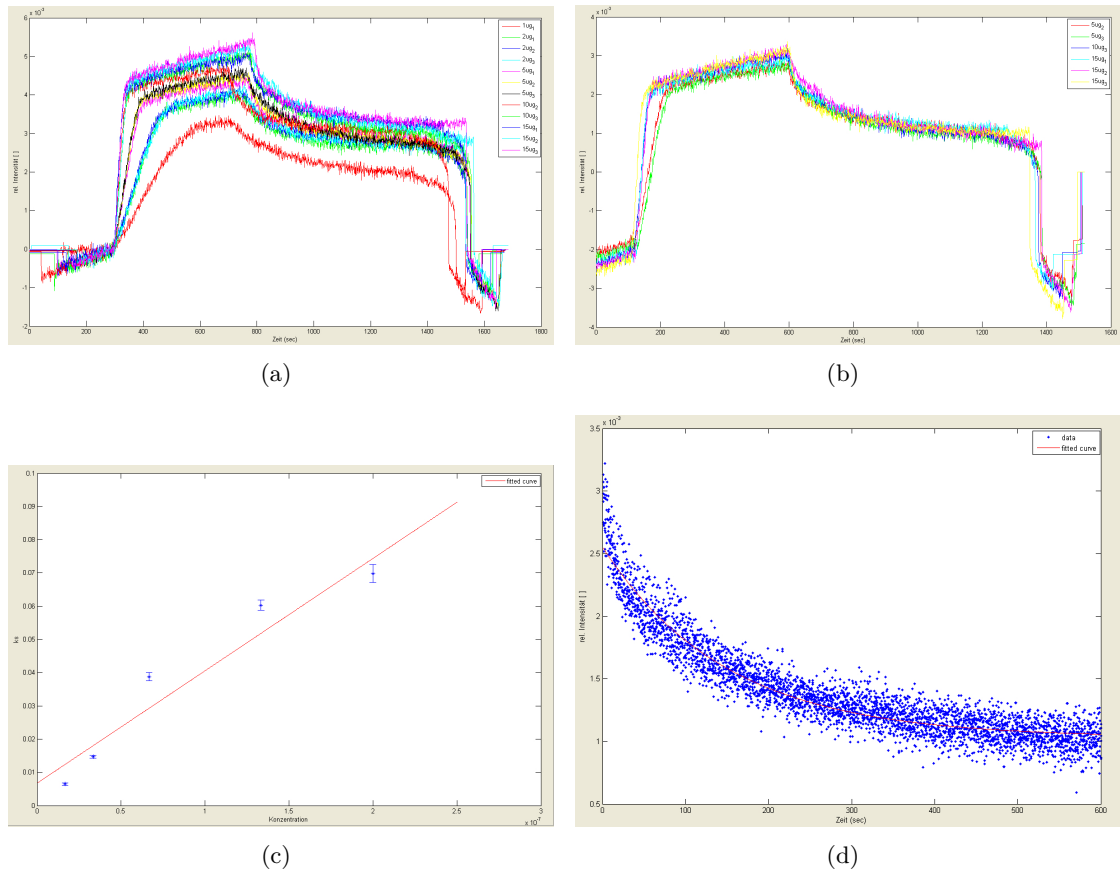


Abbildung 4.50: (a) Bindungskurven und die Bestimmung der Ratenkonstanten für Spot 10, Asparaginsäure (D): (b) Auswahl der Bindungskurven zur Anpassung der Dissoziationsratenkonstanten. (c) Lineare Anpassung zur Bestimmung von k_a . (d) Exponentielle Anpassung zur Bestimmung von k_d

Auffällig ist außerdem, dass die Kurven einen vergleichsweise rechteckigen Verlauf aufweisen. Dies kann auf eine hochaffine Wechselwirkung zwischen Antikörper und Peptid hindeuten, bei der der Einfluss des Massentransports nicht ausgeschlossen werden kann (Glaser, 1993). Möglichkeiten diese Einschränkung zu umgehen wären niedrigere Oberflächenkonzentrationen des Peptids gewesen. Aufgrund der externen Synthese der Pepti-

4.7 Kinetische Analyse des FLAG-Epitops

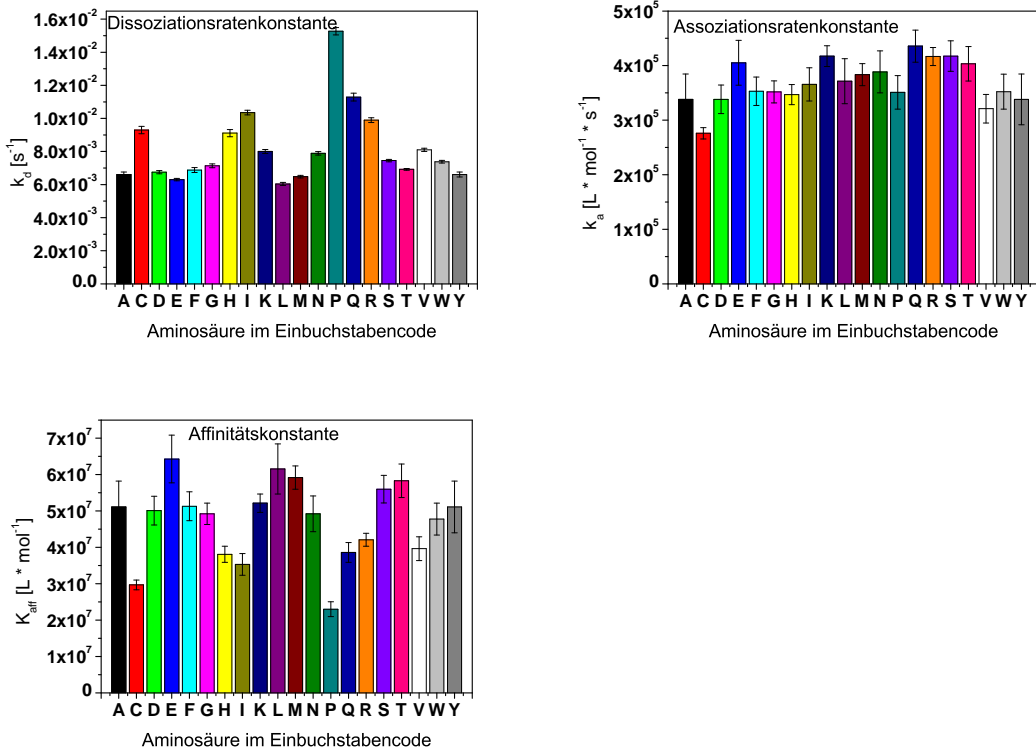


Abbildung 4.51: Ratenkonstanten und Affinitätskonstante des FLAG-Epitops der Permutationen an Position 5

darrays konnte auf diesen Parameter nur bedingt Einfluss genommen werden. Alternativ wurde die Verwendung einer erhöhten Flussgeschwindigkeit getestet. Damit konnte jedoch auch keine Änderung des Bindungsverhaltens erzielt werden, so dass die kinetische Analyse des Arrays unter den gegebenen Bedingungen durchgeführt wurde.

Beispielhaft soll auf die Ergebnisse der Auswertung bezüglich der einzelnen permutierten Aminosäuren an Position 5 eingegangen werden. Sie sind in Abbildung 4.51 gezeigt und in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Die Schaubilder zeigen, dass die Unterschiede der einzelnen k_a -Werte vergleichsweise gering sind. Sie schwanken zwischen $2.8 \cdot 10^5$ und $4.2 \cdot 10^5$ L * mol⁻¹ * s⁻¹. Unter Berücksichtigung der Fehler zeigen nur Lysin (K), Glutamin (Q), Arginin (R), Serin (S) und Threonin (T) eine höheren k_a -Wert und Cystein (C) und Valin (V) einen niedrigeren. Da diese Aminosäuren chemisch sehr unterschiedliche Strukturen aufweisen, ist es schwierig eine gemeinsame Tendenz festzustellen, die den höheren k_a -Wert begründen würde. Gegebenenfalls können die geringen Unterschiede auch in Flusseffekten begründet

4 Ergebnisse und Diskussion

liegen. So weisen die am Rande des Arrays positionierten Aminosäuren Q, R, S und T leicht erhöhte k_a -Werte auf.

Die Unterschiede in der Dissoziationsratenkonstante sind deutlicher als bei der Assoziationsratenkonstante, auch wenn sich der k_d -Wert für die meisten Aminosäuren im Bereich $6 \text{ bis } 8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ befindet. Dennoch weisen Cystein (C), Histidin (H), Isoleucin (I), Glutamin (Q) und Arginin (R), sowie insbesondere Prolin (P) besonders hohe k_d -Werte auf. Der hohe k_d -Wert des Prolins könnte in der sterisch anspruchsvolleren und zu den anderen Aminosäuren deutlich unterschiedlichen chemischen Struktur des Pyrrolidin-Rings begründet liegen. Diese hohen k_d -Werte der vorher genannten Aminosäuren spiegeln sich ebenfalls in den Affinitätskonstanten wieder. Die Ergebnisse verdeutlichen nochmals, dass oft die Unterschiede in der Affinität durch den k_d -Wert beeinflusst werden, so dass die Peptide mit einem hohen k_d -Wert eine niedrige Affinitätskonstante aufweisen und Aminosäuren mit einem geringen k_d -Wert (Leucin (L), Methionin (M)) eine erhöhte. Interessant ist der Vergleich der ursprünglichen Aminosäure Asparaginsäure (D) mit der zweiten sauren Aminosäure Glutaminsäure (E). Die Glutaminsäure weist einen leicht höheren k_a -Wert und einen geringfügig niedrigeren k_d -Wert. Diese Unterschiede jedoch genügen, um eine erhöhte Affinitätskonstante zu erhalten.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit Fluoreszenzmessungen der Arrays ergeben sich in Übereinstimmung mit den hier gefundenen niedrigen Affinitäten, die niedrigsten Bindungssignale für Histidin (H), Prolin (P), und Arginin (R). Für Cystein (C), Isoleucin (I) und Glutamin (Q) besteht diesbezüglich kein Zusammenhang. Im Falle hoher Affinitätskonstanten sind die Fluoreszenzintensitäten in Übereinstimmung mit höheren Affinitätskonstanten, wobei die Unterschied der Fluoreszenzsignalintensitäten im Vergleich zu den Unterschieden in den Affinitätskonstanten weniger ausgeprägt sind (R. Bischoff, DKFZ, mündliche Kommunikation).

Die ermittelten Werte der Affinitätskonstanten für den Klon anti-FLAG-Antikörper M2 liegen deutlich unter dem von Firsov et al. (Firsov u. a., 1996) beschriebenen Wert der Dissoziationskonstante von $3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$, das heißt einer Affinitätskonstante von $3.3 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Bestimmung dieses Wertes erfolgte über die Interaktion des ^{125}I -markierten Antikörpers mit dem FLAG-Epitop. Das FLAG-Epitop wurde als Fusionsprotein zusammen mit einem Natriumkanal auf einer Zelloberfläche exprimiert. Die Bestimmung der Affinität erfolgte mittels Scatchard-Plot. Der Unterschied in den Affinitätskonstanten von ca. einer Größenordnung kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden. Wie oben beschrieben, ist ein Einfluss von Massentransport aufgrund der Form der Bindungskurven nicht auszuschließen. Zum anderen ist es auch möglich, dass die Affinität des Antikörpers zum Peptid dadurch beeinflusst wird, dass sich das Peptid im Falle der iRIfS-Analyse sehr nahe an der Transduceroberfläche befindet, da als Spacer nur eine Aminosäure verwendet wurde. Diese Effekte könnten in nachfolgenden Versuchen durch die Verringerung der Oberflächenbeladung und die Verwendung eines längeren Spacers minimiert werden. Desweiteren sind aber auch Einflussfaktoren bei der Bestimmung von Firsov et al. nicht auszuschließen. Auch hier kann es zu Änderungen

Tabelle 4.9: Zusammenfassung der ermittelten Ratenkonstanten und Affinitätskonstanten für das FLAG-Epitop, Permutation an Position 5

		k_d [s ⁻¹]	k_a [L*mol ⁻¹ * s ⁻¹]	K_{aff} [L*mol ⁻¹]
A	Spot 12	(6.6 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.4 ± 0.5) *10 ⁵	(5.1 ± 0.7) *10 ⁷
C	Spot 11	(9.3 ± 0.2) *10 ⁻³	(2.8 ± 0.1) *10 ⁵	(3.0 ± 0.1) *10 ⁷
D	Spot 10	(6.8 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.4 ± 0.3) *10 ⁵	(5.0 ± 0.4) *10 ⁷
E	Spot 9	(6.30 ± 0.08) *10 ⁻³	(4.1 ± 0.4) *10 ⁵	(6.4 ± 0.7) *10 ⁷
F	Spot 8	(6.9 ± 0.2) *10 ⁻³	(3.5 ± 0.3) *10 ⁵	(5.1 ± 0.4) *10 ⁷
G	Spot 7	(7.1 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.5 ± 0.2) *10 ⁵	(4.9 ± 0.3) *10 ⁷
H	Spot 6	(9.1 ± 0.2) *10 ⁻³	(3.5 ± 0.2) *10 ⁵	(3.8 ± 0.2) *10 ⁷
I	Spot 5	(1.0 ± 0.1) *10 ⁻²	(3.7 ± 0.3) *10 ⁵	(3.5 ± 0.3) *10 ⁷
K	Spot 4	(8.0 ± 0.1) *10 ⁻³	(4.2 ± 0.2) *10 ⁵	(5.2 ± 0.3) *10 ⁷
L	Spot 3	(6.0 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.7 ± 0.4) *10 ⁵	(6.2 ± 0.7) *10 ⁷
M	Spot 18	(6.48 ± 0.08) *10 ⁻³	(3.8 ± 0.2) *10 ⁵	(5.9 ± 0.3) *10 ⁷
N	Spot 17	(7.9 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.9 ± 0.4) *10 ⁵	(4.9 ± 0.5) *10 ⁷
P	Spot 16	(1.5 ± 0.2) *10 ⁻²	(3.5 ± 0.3) *10 ⁵	(2.3 ± 0.2) *10 ⁷
Q	Spot 35	(1.1 ± 0.2) *10 ⁻²	(4.4 ± 0.3) *10 ⁵	(3.9 ± 0.3) *10 ⁷
R	Spot 34	(9.9 ± 0.1) *10 ⁻³	(4.2 ± 0.2) *10 ⁵	(4.2 ± 0.2) *10 ⁷
S	Spot 33	(7.45 ± 0.07) *10 ⁻³	(4.2 ± 0.3) *10 ⁵	(5.6 ± 0.4) *10 ⁷
T	Spot 32	(6.92 ± 0.05) *10 ⁻³	(4.0 ± 0.3) *10 ⁵	(5.8 ± 0.5) *10 ⁷
V	Spot 30	(8.1 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.2 ± 0.3) *10 ⁵	(4.0 ± 0.3) *10 ⁷
W	Spot 29	(7.38 ± 0.08) *10 ⁻³	(3.5 ± 0.3) *10 ⁵	(4.8 ± 0.4) *10 ⁷
Y	Spot 12	(6.6 ± 0.1) *10 ⁻³	(3.4 ± 0.5) *10 ⁵	(5.1 ± 0.7) *10 ⁷

in der Affinität der Interaktion kommen, da das Epitop als Fusionsprotein auf einer Zelloberfläche exprimiert wurde. Hierbei kann zum Beispiel die Zugänglichkeit erschwert oder die Affinität durch die Proteinumgebung beeinflusst sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse: kinetische Analyse des FLAG-Epitops

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem iRifS-System in Kombination mit der halbautomatisierten Software auch komplexere Peptidarrays vermessen und ausgewertet werden können. Dabei ist wie bei allen 1-λ-Systemen eine Abstimmung zwischen der entsprechenden verwendeten Oberflächenchemie des Transducers und der Auswertewellenlänge vorzunehmen. Dabei stellen Simulationen ein hilfreiches Werkzeug dar, dessen Ergebnisse aber im realen Experiment überprüft werden müssen. Nach Abstimmung der Messparameter kann das System zur kinetischen Analyse von Peptid-Antikörper-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Mittels der Permutation einzelner Aminosäurepositionen ist es prinzipiell möglich, die Affinität einer solchen Wechselwirkung zu verändern. Im dargestellten Beispiel variierte die Affinität bei Permutationen an Position 5 allerdings nur in einem relativ engen Rahmen zwischen 6.4 und 2.3 *10⁷ L*mol⁻¹. Dies liegt je-

4 Ergebnisse und Diskussion

doch in der Natur der Wechselwirkung begründet und nicht in der Leistungsfähigkeit des Systems.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein System zur kinetischen Analyse verschiedener Peptid-Antikörper-Interaktionen mittels iRIfS entwickelt. Es wurde zum einen die Interaktion zwischen dem anti-Transglutaminaseantikörper und verschiedenen Peptiden aus dem Protein Transglutaminase untersucht. Die Interaktionspartner Transglutaminase-anti-Transglutaminaseantikörper wurden in Anlehnung an die Krankheit Zöliakie ausgewählt. Es wurde ein Peptidarray mit Sequenzabschnitten aus dem Protein Transglutaminase hergestellt. Die verwendeten Peptide umfassten den Bereich des Antikörperepitops. Zum anderen wurde ein Peptidarray aus verschiedenen veränderten FLAG-Epitopen erstellt und die Interaktion der modifizierten Peptide mit dem anti-FLAG-Antikörper ausgewertet.

Zur Herstellung der Transglutaminasearrays sollten die verschiedenen Peptide auf den Transduceroberflächen immobilisiert werden. Deshalb war es wichtig, eine geeignete Oberflächenchemie zur Immobilisierung der Peptide auszuwählen. Die verschiedenen Oberflächen wurden im spektralen-RIfS untersucht. Die Kriterien zur Auswahl waren die Spezifität der Wechselwirkung, die Reproduzierbarkeit der Signale und eine möglichst geringe unspezifische Wechselwirkung. Diese Kriterien wurden von allen getesteten Polymeren AMD10, AMD50 und PEG erfüllt. Aufgrund des guten Signal-Rauschverhältnisses und des guten Spottingverhaltens wurde AMD50 als geeignetes Polymer gewählt.

Die Verwendung des $1-\lambda$ -Systems iRIfS zur Analyse der Peptidarrays forderte die genaue Untersuchung des verwendeten Transducersystems und der Auswertewellenlänge. Die Abstimmung dieser beiden Parameter erfolgte anhand von Simulationen mit der Software FilmWizzard und Messungen am spektralen RIfS, die bei einer Wellenlänge ausgewertet wurden. Die Versuche ergaben, dass Glastransducer mit einer hohen reflektiven Verstärkung (Goetheglas) in Kombination mit einer LED der Wellenlänge 520 nm zur Auswertung der Peptidarrays auf dem iRIfS-System geeignet ist.

Die kinetische Analyse von Peptidarrays setzt eine homogene und reproduzierbare orts aufgelöste Oberflächenmodifikation voraus. Entsprechend wurden Versuche zur Optimierung der Spottingbedingungen zur orts aufgelösten Immobilisierung der Peptide durchgeführt. Dabei stellte es sich als vorteilhaft heraus, die Peptide zusammen mit Streptavidin als Peptid-Streptavidinkomplex zu spotten. In Vorversuchen mit dem Modellprotein BSA wurden verschiedene Zusammensetzungen des Spottingpuffers getestet. Variiert wurden die Proteinkonzentration, die Art und die Konzentration des Detergenz, sowie die Art des Puffers. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden dann eine Auswahl verschiedener Spottingpuffer für das Spotten von Streptavidin bzw. der Streptavidin-Peptidkomplexe

5 Zusammenfassung und Ausblick

getestet.

Die Versuche ergaben, dass gute Ergebnisse in PBS mit 0.01% CHAPS erzielt werden.

Neben einer homogenen und reproduzierbaren Oberflächenmodifikation sind bei kinetischen Analysen die gewählten Messbedingungen von entscheidender Bedeutung, um aussagekräftige Ergebnisse zu gewinnen. Hierfür wurden verschiedene Parameter wie die Flusszellgeometrie, die Ligandkonzentration an der Oberfläche, die Antikörperkonzentration in Lösung und die Flussgeschwindigkeit variiert und deren Einfluss untersucht. Dabei stellten sich Spottingkonzentrationen von 0.1 bis 0.25 g/l Streptavidin mit einer Antikörperkonzentration größer 1.5 mg/l und Flussgeschwindigkeiten von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ als geeignet heraus. Bei der Flusszellgeometrie wirkt sich eine geringe Höhe vorteilhaft für kinetische Messungen aus.

Mit diesen Bedingungen wurden dann verschiedene kinetische Analysen durchgeführt und verschiedene Auswertestrategien für kinetische Konstanten verglichen. Die Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit Vergleichsmessungen.

Zur Analyse komplexerer Arrays wurde anschließend eine Software zur halbautomatisierten Auswertung kinetischer Arrays entwickelt, die eine schnellere Analyse erlaubt. Mittels dieser Software ist es außerdem möglich, den Fitbereich der Messdaten zur Ermittlung von k_s in der Assoziationsphase kinetischer Messungen zu optimieren und den Einfluss der Lage und der Größe des Fitintervalls zu untersuchen. Dies erlaubt eine schnelle und genaue Berechnung von k_s . Die durch die Software ermittelten Konstanten stimmten gut mit den manuell ermittelten Daten überein.

Die Leistungsfähigkeit des iRiFS-Systems und der Software konnten an einem weiteren Peptid-Antikörper-Interaktionssystem bestätigt werden. Die FLAG-Arrays wurden von einem Kooperationspartner vom DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt. In den Arrays wurden im FLAG-Epitop verschiedene Aminosäurepositionen verändert. Dabei wurde die ursprüngliche Aminosäure durch jede andere proteinogene Aminosäure ersetzt und der Einfluss der einzelnen Aminosäureaustausche auf die kinetischen und thermodynamischen Konstanten untersucht.

Die durchgeführten Messungen ergaben, dass das iRiFS-System zur kinetischen Analyse auch komplexerer Peptidarrays geeignet ist. In Kombination mit der Software steht ein leistungsfähiges Messsystem zur Verfügung, mit dem weitere Fragestellungen auch aus dem medizinischen und pharmazeutischen Bereich untersucht werden können.

Literaturverzeichnis

- [Ahmed u. a. 2010] AHMED, Sahar ; MATHEWS, Anu S. ; BYEON, Nara ; LAVASANIFAR, Afsaneh ; KAUR, Kamaljit: Peptide arrays for screening cancer specific peptides. In: *Anal Chem* 82 (2010), Nr. 18, S. 7533–7541. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac1003085>
- [Anders 1967] ANDERS, Hugo: *Thin films in optics*. The Focal Press, 1967
- [Andresen u. a. 2006] ANDRESEN, Heiko ; ZARSE, Kim ; GRÖTZINGER, Carsten ; HOLLIDT, Jörg-M. ; EHRENTREICH-FÖRSTER, Eva ; BIER, Frank F. ; KREUZER, Oliver J.: Development of peptide microarrays for epitope mapping of antibodies against the human TSH receptor. In: *J Immunol Methods* 315 (2006), Nr. 1-2, S. 11–18. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.06.012>
- [Angenendt u. a. 2003] ANGENENDT, Philipp ; GLÖKLER, Jim ; SOBEK, Jens ; LEHRACH, Hans ; CAHILL, Dolores J.: Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications. In: *J Chromatogr A* 1009 (2003), Nr. 1-2, S. 97–104
- [Arakaki u. a. 2004] ARAKAKI, Atsushi ; HIDESHIMA, Sho ; NAKAGAWA, Takahito ; NIWA, Daisuke ; TANAKA, Tsuyoshi ; MATSUNAGA, Tadashi ; OSAKA, Tetsuya: Detection of biomolecular interaction between biotin and streptavidin on a self-assembled monolayer using magnetic nanoparticles. In: *Biotechnol Bioeng* 88 (2004), Nr. 4, S. 543–546. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20262>
- [Atkins und de Paula 2013] ATKINS, Peter W. ; PAULA, Julio de: *Physikalische Chemie*. 5. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH, 2013
- [Auburn u. a. 2005] AUBURN, Richard P. ; KREIL, David P. ; MEADOWS, Lisa A. ; FISCHER, Bettina ; MATILLA, Santiago S. ; RUSSELL, Steven: Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays. In: *Trends Biotechnol* 23 (2005), Nr. 7, S. 374–379. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.002>
- [Balboni u. a. 2006] BALBONI, Imelda ; CHAN, Steven M. ; KATTAH, Michael ; TENENBAUM, Jessica D. ; BUTTE, Atul J. ; UTZ, Paul J.: Multiplexed protein array platforms for analysis of autoimmune diseases. In: *Annu Rev Immunol* 24 (2006), S. 391–418. – URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090709>
- [Berg u. a. 2013] BERG, Jeremy M. ; TYMOCZKO, John L. ; STRYER, Lubert: *Stryer Biochemie*. 7. Auflage. Heidelberg : Springer Spektrum, 2013

- [Bialek u. a. 2003] BIALEK, Krzysztof ; SWISTOWSKI, Andrzej ; FRANK, Ronald: Epitope-targeted proteome analysis: towards a large-scale automated protein-protein-interaction mapping utilizing synthetic peptide arrays. In: *Anal Bioanal Chem* 376 (2003), Nr. 7, S. 1006–1013. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-1876-3>
- [Bongartz u. a. 2009] BONGARTZ, Juliane ; BRUNI, Nicole ; OR-GUIL, Michal: Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. In: *Methods Mol Biol* 524 (2009), S. 237–246. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_17
- [Brecht 1993] BRECHT, Andreas: *Interfererenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen*. Tübingen, Dissertation, 1993
- [Brecht und Gauglitz 1994] BRECHT, Andreas ; GAUGLITZ, Günter: Optimised layer systems for immunosensors based on the RIFS transducer. In: *Fresenius J Anal Chem* 349 (1994), S. 360–366
- [Brecht u. a. 1992] BRECHT, Andreas ; GAUGLITZ, Günter ; NAHM, Werner: Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors. In: *Analisis* 20 (1992), S. 135–140
- [Breitling u. a. 2009] BREITLING, Frank ; FELGENHAUER, Thomas ; NESTEROV, Alexander ; LINDENSTRUTH, Volker ; STADLER, Volker ; BISCHOFF, F. R.: Particle-based synthesis of peptide arrays. In: *Chembiochem* 10 (2009), Nr. 5, S. 803–808. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200800735>
- [Cerecedo u. a. 2008] CERECEDO, Inmaculada ; ZAMORA, Javier ; SHREFFLER, Wayne G. ; LIN, Jing ; BARDINA, Ludmilla ; DIEGUEZ, Ma C. ; WANG, Julie ; MURIEL, Alfonso ; HOZ, Belén de la ; SAMPSON, Hugh A.: Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. In: *J Allergy Clin Immunol* 122 (2008), Nr. 3, S. 589–594. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.040>
- [Christensen 1997] CHRISTENSEN, Lars L H.: Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. In: *Anal Biochem* 249 (1997), Nr. 2, S. 153–164. – URL <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2182>
- [Cretich u. a. 2006] CRETICH, Marina ; DAMIN, Francesco ; PIRRI, Giovanna ; CHIARI, Marcella: Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. In: *Biomol Eng* 23 (2006), Nr. 2-3, S. 77–88. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.02.001>
- [Deegan u. a. 1997] DEEGAN, Robert D. ; BAKAJIN, Olgica ; DUPONT, Todd F. ; HUBER, Greb ; NAGEL, Sidney R. ; WITTEN, Thomas A.: Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. In: *Nature* 389 (1997), S. 827–829

- [Deegan u. a. 2000] DEEGAN, Robert D. ; BAKAJIN, Olgica ; DUPONT, Todd F. ; HUBER, Greg ; NAGEL, Sidney R. ; WITTEN, Thomas A.: Contact line deposits in an evaporating drop. In: *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62 (2000), S. 756–765
- [Deng u. a. 2006] DENG, Yang ; ZHU, X-Y. ; KIENLEN, Taryn ; GUO, Athena: Transport at the air/water interface is the reason for rings in protein microarrays. In: *J Am Chem Soc* 128 (2006), Nr. 9, S. 2768–2769. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja057669w>
- [Diamand und Christopoulos 1991] DIAMAND, Eleftherios P. ; CHRISTOPOULOS, Theodore K.: The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. In: *Clin. Chem.* 37 (1991), S. 625–636
- [Dieterich u. a. 1998] DIETERICH, Walburga ; LAAG, Eberhardt ; SCHÖPPER, Heike ; VOLTA, Umberto ; FERGUSON, Anne ; GILLET, Helen ; RIECKEN, Ernst O. ; SCHUPPAN, Detlef: Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. In: *Gastroenterology* 115 (1998), Nr. 6, S. 1317–1321
- [Duburcq u. a. 2004] DUBURCQ, Xavier ; OLIVIER, Christophe ; MALINGUE, Frederic ; DESMET, Remi ; BOUZIDI, Ahmed ; ZHOU, Fenhling ; AURIAULT, Claude ; GRASMASSE, Helene ; MELNYK, Oleg: Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. In: *Bioconjug Chem* 15 (2004), Nr. 2, S. 307–316. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/bc034226d>
- [Dugas u. a. 2005] DUGAS, Vincent ; BROUTIN, Jérôme ; SOUTEYRAND, Eliane: Droplet evaporation study applied to DNA chip manufacturing. In: *Langmuir* 21 (2005), Nr. 20, S. 9130–9136. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/la050764y>
- [Ewald u. a. 2013] EWALD, Melanie ; LEBLANC, Alexander F. ; GAUGLITZ, Günter ; PROLL, Günther: A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera. In: *Anal Bioanal Chem* 405 (2013), Nr. 20, S. 6461–6469. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7040-9>
- [Firsov u. a. 1996] FIRSOV, Dmitri ; SCHILD, Laurent ; GAUTSCHI, Ivan ; MÉRILLAT, Anne-Marie ; SCHNEEBERGER, Estelle ; ROSSIER, Bernard C.: Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nr. 26, S. 15370–15375
- [Fisher u. a. 2003] FISHER, Robert D. ; WANG, Bin ; ALAM, Steven L. ; HIGGINSON, Daniel S. ; ROBINSON, Howard ; SUNDQUIST, Wesley I. ; HILL, Christopher P.: Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 31, S. 28976–28984. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M302596200>
- [Frank 2002] FRANK, Ronald: The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. In: *J Immunol Methods* 267 (2002), Nr. 1, S. 13–26

- [Frostell-Karlsson u. a. 2000] FROSTELL-KARLSSON, Asa ; REMAEUS, Annika ; ROOS, Håkan ; ANDERSSON, Karl ; BORG, Peter ; HÄMÄLÄINEN, Markku ; KARLSSON, Robert: Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. In: *J Med Chem* 43 (2000), May, Nr. 10, S. 1986–1992
- [García Núñez u. a. 2012] GARCÍA NÚÑEZ, I. ; BARASONA VILLAREJO, M. J. ; ALGABA MÁRMOL, M. A. ; MORENO AGUILAR, C. ; GUERRA PASADAS, F.: Diagnosis of patients with immediate hypersensitivity to beta-lactams using retest. In: *J Investig Allergol Clin Immunol* 22 (2012), Nr. 1, S. 41–47
- [Gauglitz und Nahm 1991] GAUGLITZ, Günter ; NAHM, Werner: Observation of spectral interferences for the determination of volume and surface effects of thin films. In: *Fresenius J Anal Chem* 341 (1991), S. 279–283
- [Gill u. a. 1996] GILL, Andrew ; LEATHERBARROW, Robin J. ; HOARE, Mike ; POLLARD-KNIGHT, Denise V. ; LOWE, Peter A. ; FORTUNE, David H.: Analysis of kinetic data of antibody-antigen interaction from an optical biosensor by exponential curve fitting. In: *J Biotechnol* 48 (1996), Nr. 1-2, S. 117–127
- [Glaser 1993] GLASER, Ralf W.: Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. In: *Anal Biochem* 213 (1993), Nr. 1, S. 152–161. – URL <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1399>
- [Greving u. a. 2010] GREVING, Matthew P. ; BELCHER, Paul E. ; COX, Conor D. ; DANIEL, Douglas ; DIEHNELT, Chris W. ; WOODBURY, Neal W.: High-throughput screening in two dimensions: binding intensity and off-rate on a peptide microarray. In: *Anal Biochem* 402 (2010), Nr. 1, S. 93–95. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.002>
- [Haque u. a. 1993] HAQUE, Rashidul ; KRESS, Kendra ; WOOD, Sheila ; JACKSON, Terry F. H. G. ; LYERLY, David ; WILKINS, Tracy ; JR., William A. P.: Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. In: *J Infect Dis* 167 (1993), Nr. 1, S. 247–249
- [He u. a. 2008] HE, Mingyue ; STOEVE SANDT, Oda ; TAUSSIG, Michael J.: In situ synthesis of protein arrays. In: *Current Opinion in Biotechnology* 19 (2008), S. 4–9
- [Hearty u. a. 2012] HEARTY, Stephen ; LEONARD, Paul ; O’KENNEDY, Richard: Measuring antibody-antigen binding kinetics using surface plasmon resonance. In: *Methods Mol Biol* 907 (2012), S. 411–442. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_24
- [Hecker u. a. 2012] HECKER, Michael ; LORENZ, Peter ; STEINBECK, Felix ; HONG, Li ; RIEME KASTEN, Gabriela ; LI, Yixue ; ZETTL, Uwe K. ; THIESEN, Hans-Jürgen:

- Computational analysis of high-density peptide microarray data with application from systemic sclerosis to multiple sclerosis. In: *Autoimmun Rev* 11 (2012), Nr. 3, S. 180–190. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.010>
- [Heller 2002] HELLER, Michael J.: DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications. In: *Annu. Rev. biomed. Eng.* 4 (2002), S. 129–153
- [Hermanson 2008] HERMANSON, Greg T.: *Bioconjugate Techniques*. 2. Auflage. London : Academic Press, 2008
- [Hutsell u. a. 2010] HUTSELL, Stephanie Q. ; KIMPLE, Randall J. ; SIDEROVSKI, David P. ; WILLARD, Francis S. ; KIMPLE, Adam J.: High-affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies. In: *Methods Mol Biol* 627 (2010), S. 75–90. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2_4
- [Jonkheijm u. a. 2008] JONKHEIJM, Pascal ; WEINRICH, Dirk ; SCHRÖDER, Hendrik ; NIEMEYER, Christof M. ; WALDMANN, Herbert: Chemical strategies for generating protein biochips. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008), Nr. 50, S. 9618–9647. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200801711>
- [Korponay-Szabó u. a. 2003] KORPONAY-SZABÓ, I. R. ; DAHLBOM, I. ; LAURILA, K. ; KOSKINEN, S. ; WOOLLEY, N. ; PARTANEN, J. ; KOVÁCS, J. B. ; MÁKI, M. ; HANSSON, T.: Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. In: *Gut* 52 (2003), Nr. 11, S. 1567–1571
- [Kraus und Gauglitz 1992] KRAUS, Gerolf ; GAUGLITZ, Günter: Application and comparison of algorithms for the evaluation of interferograms. In: *Fresenius J Anal Chem* 344 (1992), S. 153–157
- [Kraus und Gauglitz 1994] KRAUS, Gerolf ; GAUGLITZ, Günter: Application and comparison of algorithms for the evaluation of interferograms II. Enhancement of RIFS detection by Full Spectrum Evaluation(FSE). In: *Fresenius J Anal Chem* 349 (1994), S. 399–402
- [Kröger u. a. 2002] KRÖGER, K. ; BAUER, J. ; FLECKENSTEIN, B. ; RADEMANN, J. ; JUNG, G. ; GAUGLITZ, G.: Epitope-mapping of transglutaminase with parallel label-free optical detection. In: *Biosens Bioelectron* 17 (2002), Nr. 11-12, S. 937–944
- [Kröger 2003] KRÖGER, Kerstin: *Entwicklung von Assaysystemen für die parallele Detektion biomolekularer Interaktionen an peptidfunktionalisierten Sensoroberflächen*. Tübingen, Dissertation, 2003
- [Kumagai und Tsumoto 2001] KUMAGAI, Izumi ; TSUMOTO, Kouhei: *eLS*. Kap. Antigen–Antibody Binding, John Wiley & Sons, Ltd, 2001
- [Kumpf 2005] KUMPF, Michael: *Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) im elektro-phoretischen Fluss*. Tübingen, Dissertation, 2005

- [Kusnezow und Hoheisel 2003] KUSNEZOW, Wlad ; HOHEISEL, Jörg D.: Solid supports for microarray immunoassays. In: *J Mol Recognit* 16 (2003), Nr. 4, S. 165–176. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.625>
- [Kusnezow u. a. 2003] KUSNEZOW, Wlad ; JACOB, Anette ; WALJEW, Alexandra ; DIEHL, Frank ; HOHEISEL, Jörg D.: Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. In: *Proteomics* 3 (2003), Nr. 3, S. 254–264. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200390038>
- [Lorenz u. a. 2009] LORENZ, Peter ; KREUTZER, Michael ; ZERWECK, Johannes ; SCHUTKOWSKI, Mike ; THIESEN, Hans-Jürgen: Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease. In: *Methods Mol Biol* 524 (2009), S. 247–258. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_18
- [Losic u. a. 2003] LOSIC, Dusan ; ZHAO, Min ; SHAPTER, Joe G. ; GOODING, J. J.: Which Parameters Affect the Response of the Channel Biosensor? In: *Electroanalysis* 15 (2003), S. 183–190
- [MacBeath und Schreiber 2000] MACBEATH, Gavin ; SCHREIBER, Stuart L.: Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. In: *Science* 289 (2000), Nr. 5485, S. 1760–1763
- [Madala u. a. 2011] MADALA, Satish K. ; DOLAN, Michael A. ; SHARMA, Deepak ; RAMALINGAM, Thirumalai R. ; WILSON, Mark S. ; MENTINK-KANE, Margaret M. ; MASISON, Daniel C. ; WYNN, Thomas A.: Mapping mouse IL-13 binding regions using structure modeling, molecular docking, and high-density peptide microarray analysis. In: *Proteins* 79 (2011), Nr. 1, S. 282–293. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22881>
- [Markovic 2008] MARKOVIC, Goran: *Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Biosensoren*. Tübingen, Dissertation, 2008
- [Müller und Röder 2004] MÜLLER, Hans-Joachim ; RÖDER, Thomas: *Der Experimentator Microarrays*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2004
- [Murphy u. a. 2009] MURPHY, Kenneth M. ; TRAVERS, Paul ; WALPORT, Mark: *Janeway Immunologie*. 6. Auflage. New York : Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [Myszka u. a. 1997] MYSZKA, David G. ; MORTON, Thomas A. ; DOYLE, Michael L. ; CHAIKEN, Irwin M.: Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. In: *Biophys Chem* 64 (1997), Nr. 1-3, S. 127–137
- [Nieba u. a. 1996] NIEBA, Lars ; KREBBER, Anke ; PLÜCKTHUN, Andreas: Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from

- binding kinetics. In: *Anal Biochem* 234 (1996), Nr. 2, S. 155–165. – URL <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0067>
- [Nopper 2000] NOPPER, Dirk: *Charakterisierung neuartiger sensitiver Materialien für optische Sensoren in flüssiger Phase*. Tübingen, Dissertation, 2000
- [Nygren u. a. 1987] NYGREN, Håkan ; WERTHEN, Maria ; STENBERG, Manne: Kinetics of antibody binding to solid-phase-immobilised antigen. Effect of diffusion rate limitation and steric interaction. In: *J Immunol Methods* 101 (1987), Nr. 1, S. 63–71
- [O’Shannessy 1994] O’SHANNESY, Daniel J.: Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature. In: *Curr Opin Biotechnol* 5 (1994), Nr. 1, S. 65–71
- [O’Shannessy u. a. 1993] O’SHANNESY, Daniel J. ; BRIGHAM-BURKE, Michael ; SONESON, Karl K. ; HENSLEY, Preston ; BROOKS, Ian: Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. In: *Anal Biochem* 212 (1993), Nr. 2, S. 457–468
- [Piehler 1997] PIEHLER, Jakob: *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. Tübingen, Dissertation, 1997
- [Pike u. a. 2013] PIKE, Douglas J. ; KAPUR, Nikil ; MILLNER, Paul A. ; STEWART, Douglas I.: Flow Cell Design for Effective Biosensing. In: *Sensors* 13 (2013), S. 58–70
- [Polsky-Cynkin u. a. 1985] POLSKY-CYNKIN, Rosemary ; PARSONS, George H. ; ALLERDT, Lauryl ; LANDES, Greg ; DAVIS, Gene ; RASHTCHIAN, Ayoub: Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. In: *Clin Chem* 31 (1985), Nr. 9, S. 1438–1443
- [Pope u. a. 2009] POPE, Matthew E. ; SOSTE, Martin V. ; EYFORD, Brett A. ; ANDERSON, N. L. ; PEARSON, Terry W.: Anti-peptide antibody screening: selection of high affinity monoclonal reagents by a refined surface plasmon resonance technique. In: *J Immunol Methods* 341 (2009), Nr. 1-2, S. 86–96. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.004>
- [Pröll 2010] PRÖLL, Florian: *iRIfS - imaging e lectometric Interference sensor Ein System für die hochparallele und markierungsfreie Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen*. Tübingen, Dissertation, 2010
- [Ramachandran u. a. 2005] RAMACHANDRAN, Niroshan ; LARSON, Dale N. ; STARK, Peter R. H. ; HAINSWORTH, Eugenie ; LABAER, Joshua: Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays. In: *FEBS J* 272 (2005), Nr. 21, S. 5412–5425. – URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04971.x>

- [Ranki u. a. 1983] RANKI, Marjut ; PALVA, Airi ; VIRTANEN, Marita ; LAAKSONEN, Matti ; SÖDERLUND, Hans: Sandwich hybridization as a convenient method for the detection of nucleic acids in crude samples. In: *Gene* 21 (1983), Nr. 1-2, S. 77–85
- [Rathgeb 1999] RATHGEB, Frank: *Charakterisierung von Wechselwirkungsprozessen in sensitiven Schichten*. Tübingen, Dissertation, 1999
- [Reichl u. a. 2000] REICHL, D. ; KRAGE, R. ; KRUMMEL, C. ; GAUGLITZ, G.: Sensing of Volatile Organic Compounds Using a Simplified Reflectometric Interference Spectroscopy Setup. In: *Applied Spectroscopy* 54 (2000), S. 583–586
- [Rich und Myszka 2000] RICH, Rebecca L. ; MYSZKA, David G.: Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. In: *Curr Opin Biotechnol* 11 (2000), Nr. 1, S. 54–61
- [Rich 2009] RICH, Rebecca L. et a.: A global benchmark study using affinity-based biosensors. In: *Anal Biochem* 386 (2009), Nr. 2, S. 194–216. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.11.021>
- [Rothmund 1999] ROTHMUND, Matthias: *Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche*. Tübingen, Dissertation, 1999
- [Schirwitz u. a. 2009] SCHIRWITZ, Christopher ; BLOCK, Ines ; KÖNIG, Kai ; NESTEROV, Alexander ; FERNANDEZ, Simon ; FELGENHAUER, Thomas ; LEIBE, Klaus ; TORRALBA, Gloria ; HAUSMANN, Michael ; LINDENSTRUTH, Volker ; STADLER, Volker ; BREITLING, Frank ; BISCHOFF, F. R.: Combinatorial peptide synthesis on a microchip. In: *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 18 (2009), S. Unit 18.2 18.2.1–Unit 18.2 18.2.13. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/0471140864.ps1802s57>
- [Schütt und Bröker 2011] SCHÜTT, Christine ; BRÖKER, Barbara: *Grundwissen Immunologie*. 3. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [Sikavitsas u. a. 2002] SIKAVITSAS, V. ; NITSCHKE, J. M. ; MOUNTZIARIS, T. J.: Transport and kinetic processes underlying biomolecular interactions in the BIACORE optical biosensor. In: *Biotechnol Prog* 18 (2002), Nr. 4, S. 885–897. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/bp020045z>
- [Slootstra u. a. 1997] SLOOTSTRA, J. W. ; KUPERUS, D. ; PLÜCKTHUN, A. ; MELOEN, R. H.: Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5. In: *Mol Divers* 2 (1997), Nr. 3, S. 156–164
- [Sämamann u. a. 2010] SÄMAMANN, Marc ; FURIN, Dominik ; THIELMANN, Johannes ; PFÄFFLIN, Albrecht ; PROLL, Günther ; HARENDT, Christine ; GAUGLITZ, Günther ; SCHLEICHER, Erwin ; SCHUBERT, Markus B.: Amorphous silicon based p-i-n photo-detectors for point-of-care testing. In: *physica status solidi (c)* 7 (2010), S. 1160–1163

- [Sotiriou u. a. 2003] SOTIRIOU, Christos ; NEO, Soek-Ying ; MCSHANE, Lisa M. ; KORN, Edward L. ; LONG, Philip M. ; JAZAERI, Amir ; MARTIAT, Philippe ; FOX, Steve B. ; HARRIS, Adrian L. ; LIU, Edison T.: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 18, S. 10393–10398. – URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1732912100>
- [Spinke u. a. 1993] SPINKE, J. ; LILEY, M. ; GUDERJ, H.-J. ; ANGERMAIER, L. ; KNOLL, W.: Molecular Recognition at Self-Assembled Monolayers: The Construction of Multicomponent Multilayers. In: *Langmuir* 9 (1993), S. 1821–1825
- [Steckbeck u. a. 2005] STECKBECK, Jonathan D. ; ORLOV, Irina ; CHOW, Andrew ; GRIESER, Heather ; MILLER, Kenneth ; BRUNO, JoAnne ; ROBINSON, James E. ; MONTELARO, Ronald C. ; COLE, Kelly S.: Kinetic rates of antibody binding correlate with neutralization sensitivity of variant simian immunodeficiency virus strains. In: *J Virol* 79 (2005), Nr. 19, S. 12311–12320. – URL <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.19.12311-12320.2005>
- [Stevens 1987] STEVENS, Fred J.: Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. In: *Mol Immunol* 24 (1987), Nr. 10, S. 1055–1060
- [Stoevesandt u. a. 2005] STOEVE SANDT, Oda ; ELBS, Martin ; KÖHLER, Karsten ; LELLOUCH, Annemarie C. ; FISCHER, Rainer ; ANDRÉ, Thomas ; BROCK, Roland: Peptide microarrays for the detection of molecular interactions in cellular signal transduction. In: *Proteomics* 5 (2005), Nr. 8, S. 2010–2017. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401095>
- [Taylor u. a. 2009] TAYLOR, Ian W. ; LINDING, Rune ; WARDE-FARLEY, David ; LIU, Yongmei ; PESQUITA, Catia ; FARIA, Daniel ; BULL, Shelley ; PAWSON, Tony ; MORRIS, Quaid ; WRANA, Jeffrey L.: Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome. In: *Nat Biotechnol* 27 (2009), Nr. 2, S. 199–204. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1522>
- [Trutnau 2001] TRUTNAU, Hans-Heinrich: Analytisches Meß- und Auswerteverfahren für molekulare Interaktionen. In: *Patent WO 01/57520* (2001), Nr. WO 01/57520
- [Vaughn u. a. 1999] VAUGHN, David W. ; NISALAK, Ananda ; SOLOMON, Tom ; KALAYANAROOJ, Siripen ; NGUYEN, Minh D. ; KNEEN, Rachel ; CUZZUBBO, Andrea ; DEVINE, Peter L.: Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. In: *Am J Trop Med Hyg* 60 (1999), Nr. 4, S. 693–698
- [van Zijderveld u. a. 1992] ZIJDERVELD, Fred G. van ; BEMMEL, Ank M. van Zijderveld-van ; ANAKOTTA, Julius: Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of Salmonella enteritidis infections in experimentally infected chickens. In: *J Clin Microbiol* 30 (1992), Nr. 10, S. 2560–2566

Literaturverzeichnis

[Zinth und Zinth 2009] ZINTH, Wolfgang ; ZINTH, Ursula: *Optik : Lichtstrahlen - Wellen - Photonen*. 2. Auflage. München : Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2009

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

AK	Antikörper
AMD	Aminodextran
aTG	anti-Transglutaminaseantikörper
BSA	Bovine Serum Albumin (engl.), Rinderserumalbumin
CCD	Charge-Coupled Device (ladungsgekoppeltes Bauteil)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
Cy5	Cyanin5
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Datenpunkte
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum (Fötale Kälberserum)
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan
GST	Gluthation S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
iRIFS	bildgebende Reflektometrische Interferenzspektroskopie
k_a	Assoziationsratenkonstante
K_{aff}	Affinitätskonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
k_s	scheinbare Ratenkonstante
LED	Light Emitting Diode (Leuchtdiode)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NaCholat	Natriumdeoxycholat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEGMA	Polyethylenglycolmethacrylat

PMMA	Polymethylmethacrylat
RIFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RMS	Root Mean Square Roughness (engl.)
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
tTG	Gewebe-transglutaminase
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumtetrafluoroborat

6.2 Veröffentlichungen

6.2.1 Publikationen

Peter Fechner, Oliver Bleher, Melanie Ewald, Kathrin Freudenberger, Dominik Furin, Urs Hilbig, Felix Kolarov, Katrin Krieg, Lothar Leidner, Goran Markovic, Günther Proll, Florian Pröll, Sabrina Rau, Johannes Riedt, Barbara Schwarz, Patricia Weber, Julia Widmaier, Size does matter! Label-free detection of small molecule–protein interaction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014) 406, 4033-4051

Barbara Schwarz, Nina Schweizer, Florian Pröll, Günther Proll, Günter Gauglitz, Label-free detection of H1N1 virus for point of care testing, *Procedia Engineering* (2010) 5, 906-909

6.2.2 Sonstige Publikationen

Markus Ehni, Peter Fechner, Dominik Furin, Stefanie Jaeger, Barbara Schwarz, Analytics swings! ANAKON 2009, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* (2009) 395(6), 1575-1576

Melanie Ewald und Barbara Schwarz, 10th Dresdner Sensor-Symposium—an anniversary to celebrate, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* (2012) 403, 389-390

Katrin Krieg, Melanie Ewald, Barbara Schwarz, Europt(r)ode XI–11th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors in Barcelona, Spain, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* (2012) 404, 9-10

6.2.3 Vorträge

Eurosensors Barbara Schwarz, Nina Schweizer, Florian Pröll, Günther Proll, Günter Gauglitz: Label-free detection of H1N1 virus for point of care testing, *Eurosensors XXIV*, 5.–8. September 2010, Linz, Austria

Barbara Schwarz, Günther Proll, Günter Gauglitz: Imaging Reflectometric Interference Spectroscopy as a tool for parallelized epitope mapping, *Doktorandenkolloquium Baden-Württemberg Stiftung: Förderbereich Lebenswissenschaften*, 24.- 25.04.2012, Bad Herrenalb, Deutschland

6.2.4 Poster

Barbara Schwarz, Günther Proll, Günter Gauglitz: Label-free point of care assay for infectious agents such as the H1N1 virus, *10th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors*, 28.-31. März 2010 in Prag, Tschechien

Barbara Schwarz, Peter Fechner, Florian Pröll, Günther Proll, Günter Gauglitz: Imaging Reflectometric Interference Spectroscopy (iRIfS) für die markierungsfreie biomolekulare Interaktionsanalyse von Peptid- und Proteinarrays, *Deutsches Biosensorsymposium*, 3.-6. April 2011, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland

Barbara Schwarz, Günther Proll, Günter Gauglitz: Nachweis von Autoantikörpern bei Zöliakie mittels iRIfS, *Dresdner Sensorsymposium*, 5.-7. Dezember 2011, Dresden, Deutschland

Barbara Schwarz, Günther Proll, Günter Gauglitz: Development of a system for parallel detection of peptide-antibody interaction in autoimmune diseases, *Euroanalysis XVI*, 11.-15. September 2011, Belgrad, Serbien

Barbara Schwarz, Günther Proll, Günter Gauglitz: Label free analysis of peptide arrays using Imaging Reflectometric Interference Spectroscopy (iRIfS), *Europt(r)ode XI*, 1.-4. April 2012, Barcelona, Spanien

6.3 Akademische Lehrer

T. Bachmann, F. Brümmer, H. Brunner, H.-D. Görtz, R. Ghosh, D. Gudat, S. Hashmi, W. Hauber, D. Hülser, D. Jendrossek, H. Jeske, R. Kontermann, U. Kull, R. Mattes, K. Pfizenmaier, J. Pleiss, M. Reuß, P. Scheurich, R.D. Schmid, M. Siemann Herzberg, M. Schweikert, A. Stolz, G. Sprenger, V. Urlacher, C. Wege, D. H. Wolf, F. Wollnik, J. Wrachtrup