
Detektion von Proteinen an funktionalisierten Ultramikroelektroden

Alexander Paul

Cuvillier Verlag Göttingen

Detektion von Proteinen an funktionalisierten Ultramikroelektroden

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexander Paul

aus Hameln

Hamburg 2003

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003
Zugl.: Hamburg, Univ., Diss., 2003
ISBN 3-89873-875-2

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-875-2

Accidit in puncto, quod non speratur in anno!

(Es ereignet sich im Augenblick, was in Jahren nicht erwartet wird!)

Kaiser Ferdinand I. (1503 - 1564)

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von April 2000 bis April 2003 als Kooperationsprojekt am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst und in der Abteilung Biotechnische Mikrosysteme am Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie (ISIT) in Itzehoe bei Dr. R. Hintsche und Dr. T. Grunwald durchgeführt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Bredehorst
2. Prof. Dr. G. Gercken

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat Toluidinsalz
BoNT A	Botulinum Neurotoxin A
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CDC	US-Zentren für Seuchenkontrolle und -prävention
cDNA	komplementäre DNA
cfu	koloniebildende Einheit
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
CMS	Carboxymethyl-Stärke
Cy5	Carboindocyaninfarbstoff mit 5 C-Atomen in der Polymethinkette
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddNTP	2'-3'-Dideoxyribonukleotid
DTP	3,3'-Dithiodipropionsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
Ex-AP	Extravidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat
HCl	Salzsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IDA-Elektroden	interdigitale Array-Elektroden

Abkürzungen

IgG	Immunglobulin G
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LD ₅₀ -Wert	letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere gestorben sind
M	Molarität
α -D-Melibiose	6- α -D-Galactopyranosyl-D-glucopyranose
MOI	Infektionsverhältnis Phage/Zelle (multiplicity of infection)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
ori	Replikationsursprung
pAP	p-Aminophenol
pAPP	p-Aminophenylphosphat
PBS	Phosphat-Salz-Puffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol 6000
pelB	Pektatlyase B
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinphosphonium Hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
scFv	einzelkettiger Antikörper
SAM	selbstanordnende Schicht

Abkürzungen

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TEA	Triethylamin
TEMED	2,2,2',2'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
YNB	stickstoffreicher basischer Hefeextrakt

Inhalt

Abkürzungen	i
I. Einleitung	1
I.1 Biosensoren	1
I.2 Elektrochemische Detektion auf Mikrochips	7
I.3 Oberflächenmodifikation von Transduktoren	10
I.4 Antikörper und Phagen-Display	12
I.5 Lebensmitteltoxine	15
I.6 Zielsetzung	19
II. Material und Methoden	21
II.1 Material	21
II.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien	21
II.1.2 Puffer und Medien	22
II.1.3 Bakterienstämme, Vektoren und Phagen-Display-Zubehör	24
II.1.4 Geräte	24
II.2 Methoden	26
II.2.1 Biochip-Technologie	26
II.2.1.1 Fertigstellung von Biochips	28
II.2.1.2 Belegung von Biochips mit Oberflächenmolekülen	29
II.2.1.3 Ermittlung von Belegungsdichten	29
II.2.1.4 Immobilisierung von Biomolekülen auf modifizierten Chipoberflächen	30
II.2.1.5 Immobilisierung von Biomolekülen an Magnetpartikeln	30
II.2.1.6 Durchführung chipbasierter Immunoassays	32
II.2.2 Chemische Synthesen	34
II.2.2.1 Darstellung von thiomodifizierter Carboxymethyl-Cellulose (t-CMC)	34
II.2.2.2 Darstellung von thiomodifizierten Dendrimeren	35
II.2.2.2.1 Darstellung von Dendrimer 4	35
II.2.2.2.2 Darstellung von Dendrimer 5	35
II.2.2.3 Darstellung von p-Aminophenyl- α -D-galaktopyranosid (pAP-Gal)	36
II.2.2.4 HPLC-Reinigung	36

Inhaltsverzeichnis

II.2.3	Molekularbiologische Methoden	37
II.2.3.1	mRNA-Isolierung aus Soja (<i>Glycine max</i>)	37
II.2.3.2	cDNA-Synthese mittels RT-PCR	38
II.2.3.3	Plasmid-DNA-Isolierung	39
II.2.3.4	PCR	39
II.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	40
II.2.3.6	Isolierung von DNA aus Gelen oder DNA-Gemischen	41
II.2.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	41
II.2.3.8	Enzymatische DNA-Modifizierung	41
II.2.3.9	DNA-Sequenzierung	42
II.2.3.10	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe-Zellen	44
II.2.4	Phagen-Display-Technologie	44
II.2.4.1	Darstellung von M13K07- und KM13-Helferphagen	45
II.2.4.2	Titerbestimmung von M13-Phagen	46
II.2.4.3	Darstellung von scFv-präsentierenden, rekombinanten Phagen	46
II.2.4.4	Amplifikation, Selektion und Reinfektion einer Antikörper-Bibliothek	47
II.2.4.5	Vervielfältigung von angereicherten Bibliotheken	48
II.2.4.6	Poly- und monoklonale Phagen-ELISA	49
II.2.4.7	Infektion von Non-Supressor-Zelllinien	49
II.2.5	Expression und proteinchemische Methoden	50
II.2.5.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen und Transformation	50
II.2.5.2	Herstellung elektrokompetenter <i>P. pastoris</i> -Zellen und Transformation	50
II.2.5.3	Lagerung transformierter Bakterien- oder Hefe-Zellen	51
II.2.5.4	Proteinexpression in Bakterien (<i>E. coli</i>)	51
II.2.5.4.1	Präparation von periplasmatischen Extrakten	52
II.2.5.5	Proteinexpression in Hefen (<i>P. pastoris</i>)	52
II.2.5.6	Proteinreinigung mittels IMAC	53
II.2.5.6.1	Proteinreinigung mittels IMAC an einer FPLC-Anlage	53
II.2.5.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	54
II.2.5.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	54
II.2.5.9	Färbung von PAGE-Gelen	55
II.2.5.10	Trocknung von PAGE-Gelen	56
II.2.5.11	Elektrophoretischer Proteintransfer (Western-Blot)	56
II.2.5.12	Immunofärbung	56

Inhaltsverzeichnis

II.2.5.13	Biotinylierung von IgG- und scFv-Antikörpern	57
II.2.5.14	ELISA	57
III.	Ergebnisse	59
III.1	Modifizierung von Chipoberflächen	59
III.1.1	Meßbereich verwendeter Biochips	59
III.1.2	Selbstanordnende Schichten organischer Thiolverbindungen	59
III.1.3	Modifizierung mit Polymer-Matrices	63
III.1.3.1	Synthese und Charakterisierung thiomodifizierter Carboxymethyl- Cellulose (t-CMC)	66
III.1.4	Modifizierung mit Dendrimeren	67
III.1.4.1	Synthese von Dendrimer 4	68
III.1.4.2	Synthese von Dendrimer 5	70
III.1.4.3	Charakterisierung von dendrimerbeschichteten Chipoberflächen	71
III.2	Herstellung von Assay-Komponenten	71
III.2.1	Enzyme	72
III.2.1.1	β -D-Galaktosidase	73
III.2.1.2	Alkalische Phosphatase	75
III.2.1.3	α -D-Galaktosidase	76
III.2.1.3.1	Klonierung und Expression von α -D-Galaktosidase aus Soja (<i>Glycine max</i>)	76
III.2.1.3.2	mRNA-Isolierung aus Soja und cDNA-Synthese	78
III.2.1.3.3	Amplifikation und Klonierung von α -D-Galaktosidase-cDNA	78
III.2.1.3.4	Expression von α -D-Galaktosidase in <i>P. pastoris</i> und Reinigung	81
III.2.1.3.5	Synthese von p-Aminophenyl- α -D-galaktopyranosid (pAP-Gal)	82
III.2.1.3.6	Elektrochemische Enzymaktivitätsmessungen	83
III.2.2	Antikörper	84
III.2.2.1	Polyklonale Antikörper	85
III.2.2.1.1	Quantifizierung von immobilisierten Antikörpern	85
III.2.2.1.2	Überprüfung der Komponenten für polyklonale Lysozym-Sand- wich-ELISA-Analysen	85
III.2.2.2	Darstellung von scFv-Fragmenten gegen Toxine	86
III.2.2.2.1	Selektion von scFv-Fragmenten gegen BoNT A und SEB	87
III.2.2.2.2	Analyse und Charakterisierung selektierter Klone	87

Inhaltsverzeichnis

III.2.2.2.3	Sandwich-Selektion an gerichtet immobilisierten Toxinen und Charakterisierung	91
III.2.2.2.4	Überprüfung der Anti-Toxin-Seren und -scFv	94
III.3.	Optimierung des Modell-Systems	97
III.3.1	Elektrochemische Immunoassays an 2D- und 3D-Schichten	97
III.3.1.1	Lysozym-Sandwich-ELISA	97
III.3.2	Oberflächenvergrößerung durch Nutzung von Magnetpartikeln	99
III.3.2.1	Immobilisierungsbedingungen für Antikörper an Epoxypartikeln	100
III.3.2.2	Lysozym-Nachweis on-chip an Magnetpartikeln	101
III.3.2.3	Magnetpartikel-Vergleich	103
III.3.2.4	Optimierung on-chip-Assays	104
III.3.2.5	Einsatz monoklonaler Fängerantikörper	106
III.4	Toxin-Nachweis mittels Sandwich-ELISA	108
IV.	Diskussion	110
IV.1	Modifizierung von Münzmetalloberflächen	110
IV.1.1	Oberflächenmoleküle für zweidimensionale Schichten	111
IV.1.2	Oberflächenmoleküle für dreidimensionale Schichten	112
IV.2	Assay-Komponenten	115
IV.2.1	α -D-Galaktosidase	116
IV.2.2	Herstellung von Anti-Toxin-Antikörpern	118
IV.3	Modell-Assay	120
IV.4	Toxin-Assay	124
V.	Zusammenfassung	125
VI.	Summary	127
VII.	Literatur	129
VIII.	Anhang	147
VIII.1	cDNA-Sequenzen	147
VIII.2	Oligonukleotid-Sequenzen	151
VIII.3	Vektorkarten	152

I. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Aspekte der Modifizierung von Oberflächen elektrochemischer Biosensoren bearbeitet werden. Die einleitenden Worte beschreiben Hintergründe und Methoden der mit dieser Arbeit umfaßten Bereiche. Thematisch wird ein Überblick über aktuelle Biosensorforschungen gegeben und detaillierter auf die chipbasierte elektrochemische Detektion eingegangen. Ferner findet eine Betrachtung der gängigen Modifikationen von unpolaren Oberflächen zur kovalenten Immobilisierung von Affinitätsmolekülen statt. Nach einer kurzen Übersicht über Antikörper und einer Einführung in die Phagen-Display-Technologie, einem *in vitro*-Verfahren zur Generierung von Antikörpern, werden in diesem Kapitel zusätzlich zwei verwendete Zielproteine mit Relevanz bei Lebensmittelvergiftungen, Staphylokokken Enterotoxin B und Botulinum Neurotoxin A, dargestellt.

I.1 Biosensoren

Die Biosensorforschung hat seit ihren Anfängen Ende der 60er Jahre besonders im Laufe der letzten Jahre durch die Entwicklung neuartiger Meßtechniken an Interesse gewonnen. Spezifische Erkennungsprozesse zwischen biologischen Makromolekülen nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip bilden die Grundlage bei allen biochemischen Vorgängen von der Zellkommunikation über den Metabolismus bis zur Replikation inner- und außerhalb lebender Zellen. Die Kontrolle von und Reaktion auf Bedingungsänderungen beruht auf der Signalregistrierung und -weitergabe, die durch biologische Interaktionen ausgelöst werden.

Durch Kombination der erkennenden Eigenschaften biologischer Komponenten mit signalverarbeitenden elektronischen Bauteilen sind auf dem Gebiet der Analytik Biosensoren entstanden. Grundsätzlich wandelt ein Biosensor ein molekulares Bindungsereignis von zwei Interaktionspartnern, von denen mindestens einer biologischen Ursprungs sein muß, in ein sichtbares Signal um (Scheller und Schubert 1989, Mattiasson 1991, Clarke *et al.* 1985) (Abb. 1). Als Erkennungselemente sind eine Vielzahl von Bindungspartnern mit Affinitäten zueinander geeignet: Protein-Protein wie z.B. Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, Antikörper-niedermolekulare Verbindung, Enzym-Substrat oder Inhibitor, Protein-DNA, DNA-Nukleinsäure, PNA-Nukleinsäure, Zellen- oder Zellbestandteile-Protein, Lektin-

Kohlenhydratstruktur, und Avidin-Biotin (Nielsen *et al.* 1991, Boon *et al.* 2002, Hubbard und Gohn 1976, Green 1963).

Eine der Komponenten ist dabei an einer festen Phase immobilisiert, die andere wird in flüssiger oder gasförmiger Phase daran vorbeigeleitet. Eine stattfindende Wechselwirkung wird über einen physikochemischen Transduktor in ein physikalisch messbares Signal umgewandelt. Der gesamte Ablauf des analytischen Meßverfahrens gliedert sich in:

1. die Probenvorbereitung, meistens Verdünnung, Änderung der Pufferbedingungen oder Filtration,
2. die gezielte lokale Anreicherung der Zielsubstanz durch Verwendung von heterogenen Systemen (Fest-/Flüssigphase, Fest-/Gasphase) und
3. entweder die vorgeschaltete Markierung und anschließende biochemische Reaktion zur Detektion oder den direkten Nachweis der Bildung des Affinitätskomplexes.

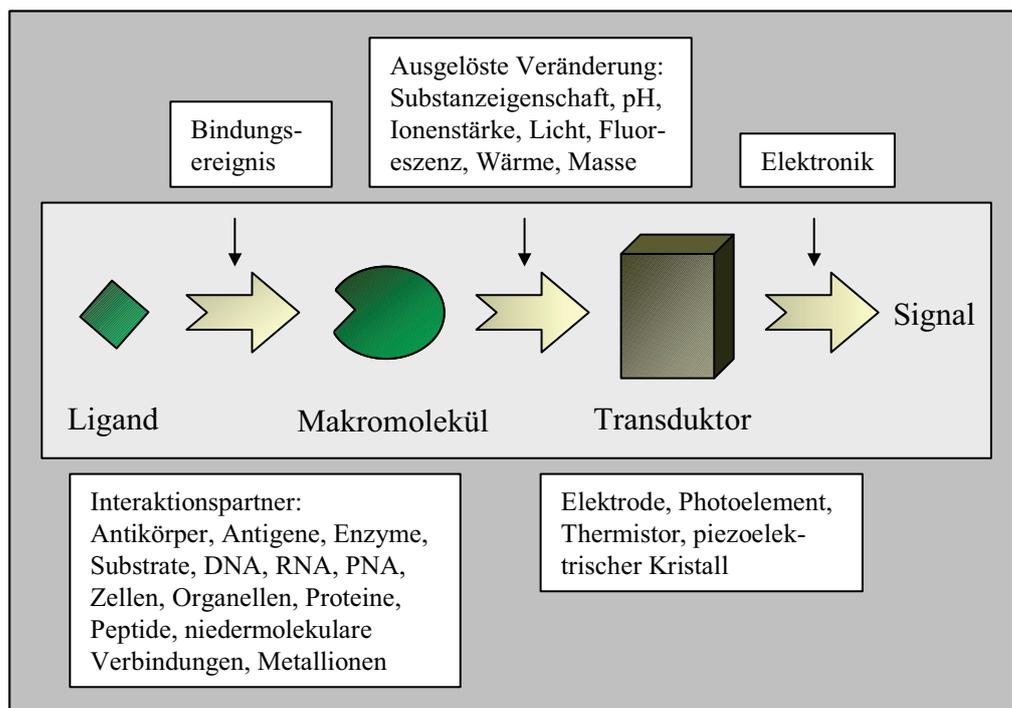


Abb. 1: Aufbau und Meßprinzip eines Biosensors

Als ersten Biosensor läßt sich die Clark-Enzymelektrode (Clark und Lyons 1962) bezeichnen, mit der der enzymatische Umsatz von Glukose an Sauerstoff-Platinelektroden erfaßt wurde. Biosensoren können prinzipiell in zwei übergeordnete Kategorien, direkt und indirekt messende, unterteilt werden. Direkt detektierende Biosensoren messen die durch die Affinitätsreaktion hervorgerufene physikalische Änderung eines Parameters ohne Zeitverlust.

Bei indirekter Detektion findet nach der Bindung eine biochemische Reaktion statt, deren Reaktionsprodukte durch den Biosensor nachgewiesen werden. Eine detailliertere Klassifizierung von Biosensoren ist nach der jeweiligen Detektionsart in optische, piezoelektrische, elektrochemische oder thermische möglich (Tab. 1). Die meisten Arbeiten auf dem Gebiet sind mit elektrochemischen Transduktoren durchgeführt worden, die heutzutage mit optischen Systemen vergleichbare Nachweisgrenzen erreichen.

Seit Anfang der 80er Jahre ist das Feld der optischen Biosensoren revolutioniert worden (Nylander *et al.* 1982). Die vielfältigen Methoden reichen von der klassischen photometrischen Messung von Frequenzabsorptionen oder -emissionen durch Fluoreszenzeigenschaften und nach kolorimetrischen Reaktionen bis hin zur Änderung von Lichteigenschaften wie Brechungsindex, Streuung, Polarisierung und evaneszentes Feld zugrunde (Welin *et al.* 1984, Schneider *et al.* 1997, Piehler *et al.* 1996).

Die fluoreszenzbasierte Detektion ist davon das gängigste optische Verfahren. Durch die Markierung mit fluorophoren Molekülen oder Enzymen, die zuvor inaktive in fluoreszenzaktive Substanzen umsetzen, können diese nachgewiesen werden. Bei einigen Anwendungen wird gezielt die Fluoreszenzinhibition eingesetzt (Green 1964, Livak *et al.* 1995), so daß erst bei Bindung die fluoreszente Signalgebung möglich wird. Mit dieser Methode wird das Ziel verfolgt, das Hintergrundsignal zu minimieren.

Bio- oder Chemilumineszenz-Sensoren messen enzymatisch oder chemisch erzeugte Photonen. Dabei werden etablierte Systeme wie die ATP-abhängige Luciferase (Ulitzur und Kuhn 1987, Miller *et al.* 1992) zur Detektion von Mikroorganismen und antikörpergebundene Meerrettichperoxidase (Arakawa *et al.* 1979) mit entsprechenden Substraten oder induzierbare lichtemittierende Übergangsmetallkomplexe (Ege *et al.* 1984, Rodriguez und Bard 1990) eingesetzt.

Die Detektion von Veränderungen des evaneszenten Feldes des auf eine distinkte Bindungsposition gestrahlten Lichtes nutzen reflektrometrische, SAW-, und SPR-basierende faseroptische Sensoren (Brecht *et al.* 1991, Weisch *et al.* 1996, Welin *et al.* 1984, Piehler *et al.* 1996, Watts *et al.* 1994, Schneider *et al.* 1997). Dabei dringt das elektromagnetische evaneszente Feld bis zu 20-400 nm in das umgebende Medium ein (Homola *et al.* 1999) und wird durch den Brechungsindex und nach dem Grad der Oberflächenbeladung verändert. Es wurden Nachweisgrenzen bis in den unteren nanomolaren Bereich erreicht (Rowe-Taitt *et al.* 2000).

An Silizium-Kantilevern wird nach der Bindung von Liganden über den Massenzuwachs und eventuelle Wärmeentwicklung eine Oberflächenspannung durch Verbiegung von 100 µm

breiten Siliziumfühlern hervorgerufen, die über eine Resonanzfrequenzänderung meßbar wird (Fritz *et al.* 2000, Berger *et al.* 1997).

Zu den piezoelektrischen Sensoren gehören die Quarzkristallmikrowaagen (Roederer und Bastiaans 1983, Chou *et al.* 2002, Koenig und Gratzel 1993), deren massenabhängige Schwingungsresonanzfrequenz sich durch die Bindung einer Komponente ändert.

Method	Prinzip	Meßgröße	Kat.	Bez.	Detektionslimit	Literatur
Potentiometrie	Potentialänderung	Spannung	D	E	pM	Pergel <i>et al.</i> 2001
Amperometrie	Stromflußänderung	Strom	I	E	pM	Liu <i>et al.</i> 2000
Impedanz	Änderung des Wechselstromwiderstands	Widerstand	D	E	aM	Dijksma <i>et al.</i> 2001
Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	Energieänderung eines Plasmons	Brechungsindex	D	O	fM	Naimushin <i>et al.</i> 2002
Quarzkristallmikrowaage (QCM)	Energieänderung von piezoelektrischen Kristallen	Resonanzfrequenz	D	P	pM	Chou <i>et al.</i> 2002
Fluoreszenz	Farbänderung	UV/VIS-Frequenz	I	O	pM	Rowe-Taitt <i>et al.</i> 2000
Kolorimetrie	Farb- oder Intensitätsänderung des emittierten Lichts	VIS-Frequenz	I	O	µM	Xu und Dong 2000
Kalorimetrie	Widerstandsänderung durch Wärme	Widerstand	D	E	µM	Danielsson und Xie 1997
Kantilever	Änderung der Siliziumoberflächenspannung	Resonanzfrequenz	D	O	nM	Fritz <i>et al.</i> 2000
Oberflächenakustikresonanz (SAW)	Energieänderung von Oberflächenwellen	Resonanzfrequenz	D	O	nM	Weisch <i>et al.</i> 1996
Prismenkoppler (RM)	Änderung der Oberflächenreflektivität	Brechungsindex	D	O	nM	Cush <i>et al.</i> 1993, Watts <i>et al.</i> 1994

Tab. 1: Übersicht einiger Sensoren für die biomolekulare Interaktionsanalyse; I: indirekt, D: direkt, O: optisch, E: elektrochemisch, P: piezoelektrisch, T: thermisch, VIS: visueller Frequenzbereich, UV: ultravioletter Frequenzbereich

Elektrochemische Biosensoren sind vielseitig einsetzbar, da sie analog den optischen Systemen Parameter wie Massenzuwachs, markierte Komponenten oder enzymatisch generierte Mediatoren über die Messung von Strom, Spannung, Kapazität oder Widerstand detektieren. Metabolische Parameter wie Sauerstoffgehalt, Ionenkonzentrationen oder pH-Werte werden standardmäßig über Potentialänderungen gemessen. Eine Besonderheit ist dabei der lichtadressierbare potentiometrische Sensor LAPS (Tiefenthaler 1993), in dem optische und elektrochemische Detektion kombiniert wurden. Die biospezifische Reaktion findet dabei an einer Kondensatoroberfläche statt. Blinkende Photodioden lösen durch die

Potentialänderung an dieser Kondensatoroberfläche einen Wechselstrom aus, der massen- und pH-abhängig ist.

Biosensoren basierend auf Voltammetrie stellen die größte Gruppe der elektrochemischen Detektoren dar. Die Messungen finden bei konstant eingestellter Spannung statt und detektieren den fließenden Strom in Form von Leitfähigkeiten oder Redox-Aktivitäten entsprechender Mediatoren. Kürzlich wurde eine gezielte Kurzschlußhervorrufung in einem DNA-Sensor über die Nutzung von goldpartikelmarkierten Oligonukleotiden und Elektroden mit geringem Abstand gezeigt (Park *et al.* 2002).

Thermistoren sind in der Lage, Wärmeänderungen bis zu 0,01 °C über den Widerstand zu messen (Mattiasson 1991).

Mit der Impedanz-Spektroskopie lassen sich frequenzabhängig Wechselstromwiderstände messen und damit einzelne Phasen der Elektrodenteilreaktionen (Diffusion der aktiven Substanz zur Elektrode, Elektronenübertragung an der Elektrodenoberfläche, Entfernung der Reaktionsprodukte durch Diffusion) untersuchen. Mit dieser Methode sind Detektionsgrenzen im attomolaren Bereich für die Erkennung eines 15,5 kDa Proteins in einem Immunosensor erreicht worden (Dijksma *et al.* 2001).

Immunosensoren sind Systeme, die die natürlichen Affinitätskonstanten von Antikörper-Antigen-Paaren im Bereich von 10^{-5} - 10^{-11} M zur hochspezifischen Erkennung nutzen. Die gängigste Standardprozedur für indirekte Systeme ist die enzymgekoppelte Immunodetektion an fester Phase (ELISA) im Sandwich-Format, die seit Anfang der 70er Jahre angewandt wird (Engvall und Perlman 1971). Ein festphasengebundener Antikörper dient dabei als Fängermolekül für das zu detektierende Zielprotein, das wiederum von einem Detektionsantikörper erkannt wird. Durch eine Markierung des Detektionsantikörpers kann das Zielprotein direkt oder über die enzymatische Generierung optisch bzw. elektrochemisch aktiver Substanzen nachgewiesen werden. Direkte Systeme verzichten auf den Einsatz des Detektionsantikörpers.

Das Bindungsereignis bei DNA-Sensoren ist die Hybridisierung von zwei komplementären DNA-Strängen. Die Detektion des spezifisch gebildeten Doppelstranges kann über einen Massenzuwachs, eine Markierung des zweiten Stranges oder durch den Einsatz von aromatischen Interkalatoren optisch oder elektrochemisch durchgeführt werden.. Interkalatoren können als Markierung dienen, da sie sich an die große oder kleine Furche der DNA-Doppelhelix anlagern oder aufgrund ihrer planaren Struktur mit den aromatischen Ringsystemen der gestapelten DNA-Basen (Friedman *et al.* 1991, Takenaka *et al.* 1992) interagieren.

Eine neuere Entwicklung sind elektronische „künstliche Nasen“, die in der Lage sind, niedermolekulare leicht flüchtige organische Moleküle zu detektieren (Lang *et al.* 1999, Gopel *et al.* 1998). Derartige Sensoren werden auf mehreren separaten Positionen gezielt mit natürlichen biologischen Rezeptoren oder Polymeren belegt (Wu 1999, Freund und Lewis 1995, Doleman *et al.* 1998). Ein Massenzuwachs durch biologische Erkennung des Liganden oder wie bei chromatographischen Verfahren durch unterschiedlich starke Wechselwirkung der gasförmigen Stoffe mit den verschiedenen stationären Phasen auf unterschiedlichen Positionen eines Halbleiteroxid-Sensors wird über die Änderung des Widerstandes der einzelnen Positionen meßbar. Jede Molekülsorte ist über ein so entstehendes charakteristisches Muster identifizierbar.

Durch Kombination mehrerer Transduktoren, elektrochemischer und QCM, konnte gezeigt werden, daß so eine verbesserte Detektion von leicht flüchtigen Substanzen möglich war (Ulmer *et al.* 2000).

In kombinatorischen Ansätzen ist der Einsatz von farb- (Walt 2000), barkodierten (Zjou *et al.* 2001) oder magnetischen Mikrosphären (Yu und Bruno 1996) mit distinkten Fängereigenschaften weit verbreitet. Diese führen aufgrund der großen Oberfläche zu einer starken lokalen Anreicherung der Zielkomponente und damit zu geringeren Nachweisgrenzen. Außerdem können so parallel mehrere Experimente durchgeführt und analysiert werden.

Sämtliche direkt messenden Biosensoren eignen sich besonders für die Detektion von Mikroorganismen oder Viruspartikeln, da sie aufgrund ihrer enormen Masse ein deutliches Signal liefern. Diese Sensoren haben den Vorteil, daß sie markierungsfrei arbeiten, d.h. keine der Komponenten benötigt wie bei den indirekten Methoden eine zusätzliche Modifikation. Allerdings ist bei indirekten Verfahren durch die Markierung einer Komponente, beispielsweise mit polyklonalen Antikörpern, eine enorme Verstärkung des Signals möglich (Ekins 1998). Diese Amplifikationsmöglichkeit fehlt bei direkten Meßverfahren, die deswegen eine längere Analysenzeit benötigen. Außerdem weisen diese Methoden durch unspezifische Adsorptionen generell schlechtere Signal/Hintergrund-Verhältnisse auf.

Viele der vorgestellten Biosensoren sind apparativ anspruchsvoll oder störanfällig und für einen Einsatz außerhalb eines Labors nicht geeignet. Die Anforderungen an Biosensoren sind für alle Einsatzgebiete ähnlich und im folgenden zusammengefaßt: Der ideale Biosensor sollte sensitiv, hochspezifisch, kostengünstig, portabel und robust sein, dabei eine kurze Analysenzeit aufweisen und in der Lage sein, Vor-Ort-Analysen mit einem Minimum an Probenvorbereitung verläßlich durchzuführen und erhaltene Meßergebnisse schnell

auszuwerten. Dabei sollte das Verfahren automatisiert sein und das Analysegerät auch von nicht speziell geschultem Personal bedient werden können. Außerdem sollten unter Verwendung von biokompatiblen Materialien im Gegensatz zu üblicherweise genutzten Probenträgern wie Glas, Nylon, Halbleitern oder Metallschichten die unspezifischen Adsorptionen insbesondere bei der Vermessung biologischer Proben unterbunden werden.

Im Laufe der letzten Jahre kam es zu immer weiter miniaturisierten Entwicklungen, die letztlich darin resultierten, ein gesamtes Analyselabor auf einem Chip unterzubringen (Moser *et al.* 1995, Kricka 2001). Durch Integration von kleinsten Kanälen, Reaktionskammern, Ventilen und Pumpen können Prozeßabläufe wie gesteuerter Transport von Reagenzien und die Durchführung biochemischer Analysen samt Detektion auf einem sogenannten Lab-on-a-chip oder Mikro-Totalanalyse System (μ -TAS) durchgeführt werden, z.B. PCR, ebenso chemische Synthesen (Chien und Parce 2001, Reyes *et al.* 2002, Giordano *et al.* 2001, Boyle und Janda 2002, Brivia *et al.* 2002). Durch Verkleinerung der Reaktionsvolumina sind deutlich kürzere Analysenzeiten möglich, da die Gleichgewichtseinstellung bei der Bildung des Affinitätskomplexes in diesen Dimensionen viel schneller geschieht als im makroskopischen Rahmen.

Applikationsgebiete für Biosensoren finden sich in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung, medizinischen Diagnostik, Prozeß- und Qualitätskontrolle in der Produktion, Boden- und Wasserüberwachung sowie in der chemischen und Lebensmittelanalytik.

I.2 Elektrochemische Detektion auf Mikrochips

Die meisten Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biosensoren basieren auf elektrochemischen Nachweisverfahren. Im Zuge der fortschreitenden Erkenntnisse auf den Sektoren der Mikroelektronik, Halbleiter- und Nanotechnologie sind Herstellungsverfahren entwickelt worden, die zu Fertigungen von portablen Geräten in den optischen und elektrochemischen Disziplinen geführt haben. Durchgeführte Miniaturisierungen haben eine Reihe von Vorteilen, z.B. die verkürzten Transportwege durch den Einsatz von handlichen Geräten, was zu einer Verringerung des Verbrauchs an Substanzen und Materialschonung der Bauteile führt. Außerdem ist der Energiebedarf eines kleinen Gerätes mit elektrochemischer Auslesung gering. Durch parallele Arbeitsprozesse in der Herstellung lassen sich die Produktionskosten solcher Geräte deutlich senken.

Allerdings haben Miniaturisierungen auch zu neuen Problematiken geführt, da hier z. T. andere Gesetzmäßigkeiten gelten. Beispielsweise treten nun in der Fluidik im Gegensatz zu

makroskopischen Systemen Scherkräfte an verengten Stellen oder ein verändertes Fließverhalten der Lösung in Schlauchbiegungen auf (Frame *et al.* 1998, Griffiths und Nilson 2002).

Elektrochemische Biosensoren sind im Gegensatz zu optischen nicht auf Licht oder Kameras zur Detektion angewiesen und besitzen deswegen den Vorteil der potentiell weiteren Miniaturisierbarkeit der einzelnen Bauelemente, z.B. chipbasierten Mikroelektroden, bis hin zur Implantierbarkeit in den Körper (Wilkins *et al.* 1995). Die Detektion ist nicht durch störende Einflüsse von Kontaminationen limitiert, da nur elektrochemisch aktive Substanzen an den Elektroden zu Signalen führen und das System partikeltolerant ist. Durch Anlegen eines lokalen elektrischen Feldes ist zusätzlich die Möglichkeit des gezielten Proben transports bzw. Attraktion oder Repulsion von geladenen Zielmolekülen, z.B. DNA (Heller *et al.* 2000), gegeben. Vorteile dabei sind die Verringerung der Analysenzeit sowie stringendere Waschbedingungen zur Reduktion von unspezifischen Adsorptionen.

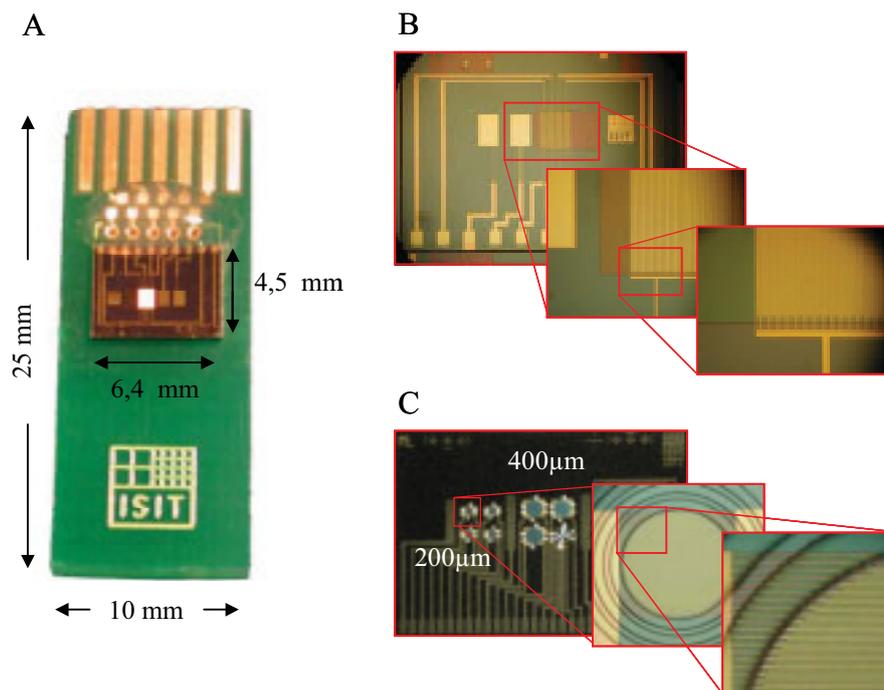


Abb. 2: Biochips mit interdigitalen Array-(IDA)-Elektroden

A: Fertiggestellter Biochip mit acht Kontakten und Verkappung der filigranen Verbindungsdrähte (oberer Bereich)

B und C: In den Vergrößerungen eines Biochips mit einer Position (B) und eines Array-(C) Biochips sind die kammartig ineinander greifenden IDA-Elektroden sichtbar. Der Array-Biochip zeigt Mikroelektrodenfelder mit je vier 200 μm- und 400 μm-durchmessenden Positionen.

Seit einigen Jahren finden Mikroarrays oder Biochips besonders in der DNA- oder Protein-Analytik ein breites Anwendungsgebiet. Auf diesen miniaturisierten Probenträgern können gleichzeitig je nach Größe bis zu mehrere tausend biochemische Reaktionen stattfinden. Diese

sind für die Hochdurchsatzforschung wie RNA-Expressionsanalysen oder die Wirkstoffentwicklung von großem Interesse. Nieder- und mitteldichte Mikrochips finden Anwendung u.a. in der patientennahen Diagnostik, in der meistens eine kleinere Anzahl unterschiedlicher Zielmoleküle zur spezifischen Detektion gefordert ist.

Für die chipbasierte elektrochemische Detektion eignen sich besonders interdigitale Array-(IDA)-Elektroden (Kittlesen *et al.* 1984, Aoki *et al.* 1988), die mit Hilfe der Standard-Halbleitertechnologie in miniaturisierten Dimensionen hergestellt werden können (Abb. 2).

Sie vereinen die Vorteile der elektrochemischen Biosensorik und eine verbesserte Sensitivität in sich. Durch die verzahnte Anordnung der kammartigen IDA- oder Ultramikroelektroden und durch die Elektrodenabstände gegebenen kurzen Diffusionswege von 500-800 nm ist ein iterativer Redox-Kreislauf, das sogenannte Redox-Recycling (Abb. 3), von elektrochemisch aktiven Mediatoren möglich.

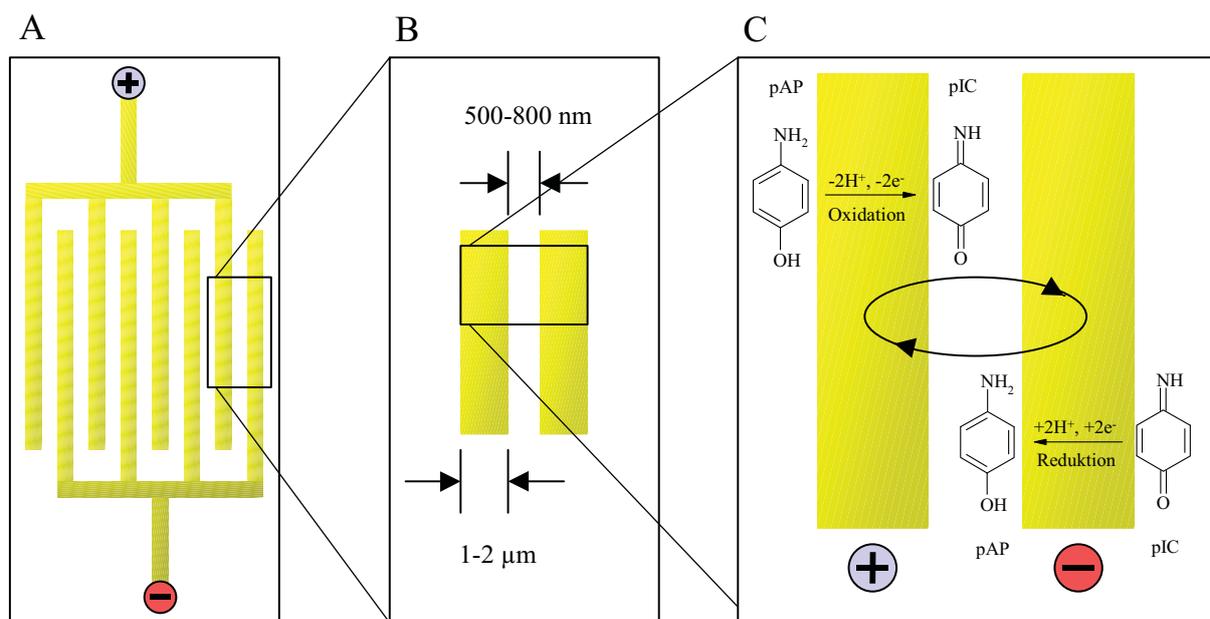


Abb. 3: Redox-Recycling an IDA-Elektroden

Die einzelnen Finger der kammartigen IDA-Elektroden (A) besitzen Breiten von 1-2 µm und sub-µm-Abstände (B). Durch die kurzen Diffusionswege zwischen den Elektroden wird das iterative Redox-Recycling (C) von z.B. p-Aminophenol (pAP) zu p-Iminochinon (pIC) und umgekehrt erst möglich.

Enzymatisch generierte Redox-Mediatoren wie z.B. pAP-Moleküle werden an der Anode zu pIC-Molekülen oxidiert und nach Diffusion zur Kathode dort wieder reduziert. Das Signal kann dadurch um den Faktor 10-20 im Vergleich zu konventionellen Elektrodensystemen mit analoger Fläche verstärkt werden (Niwa *et al.* 1993, Hintsche *et al.* 1994). Die

amperometrische Detektion ist insgesamt diffusionskontrolliert, da von den Elektrodenreaktionsschritten der Nachschub an elektroaktiven Substanzen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Diese Methode ist qualitativ und quantitativ, da nur in einem vom Redox-Mediator abhängigen engen Spannungsbereich gemessen wird und der Strom direkt proportional zur vorhandenen Substanzmenge ansteigt (Niwa *et al.* 1988).

I.3 Oberflächenmodifikation von Transduktoren

Die Immobilisierung von Affinitätsmolekülen an eine feste Phase ist eine Grundvoraussetzung für die anschließende spezifische Anreicherung von Zielmolekülen. Bei Biosensoren ist diese feste Phase eine mit der Probelösung oder -gasphase interagierende Teilfläche des Transduktors, die meist aus hydrophoben Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B. Glas, Münz- oder Halbleitermetallen, Polymeren) besteht. Damit die an dieser Fläche ablaufenden Erkennungsprozesse nicht von unspezifischen Adsorptionen verfälscht werden, sind entsprechende Modifikationen zu deren Unterbindung unerlässlich.

Für die Modifikation von Münzmetalloberflächen eignen sich besonders schwefelhaltige organische Moleküle, da diese in der Lage sind, geordnete stabile Schichten (self assembled monolayers, SAM) auszubilden (Ulman 1996). Die hohe Affinität von Schwefel zu Gold und anderen Schwermetallen ist zusammen mit den hydrophoben Wechselwirkungen benachbarter Kohlenwasserstoffketten die treibende Kraft der SAM-Ausbildung.

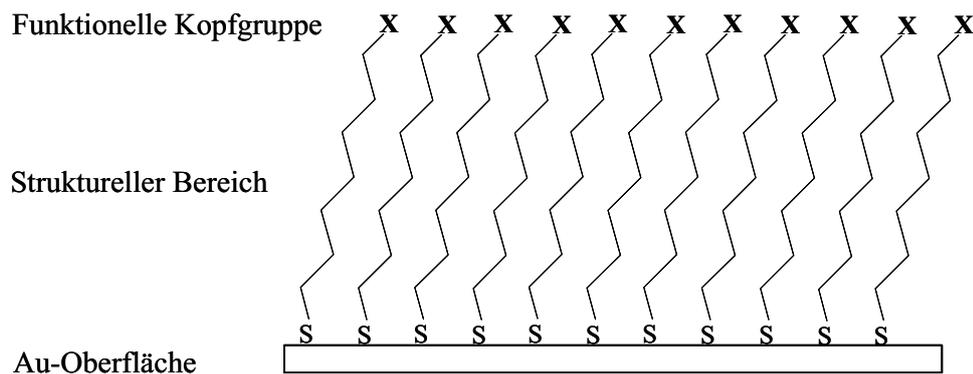


Abb. 4: Aufbau eines SAM aus funktionalisierten Alkylthiolen

Als SAM-Bildner eignen sich insbesondere langkettige oder aromatische Thiolverbindungen, bei denen nach Chemisorption über die Thiolgruppe an einer Goldoberfläche die van-der-Waals-Kräfte zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffbereichen zu einer definiert

geordneten Struktur führen und somit zur Stabilisierung der monomolekularen Schicht beitragen (Abb. 4). Durch Modifizierung der exponierten Kopfgruppe lassen sich weitere Funktionalitäten in das Molekül einfügen.

Weiterhin können unspezifische Wechselwirkungen von Analytbestandteilen durch Generierung einer möglichst physiologischen Umgebung durch pH-Wert, Ionenstärke und hydrophiler Oberfläche mittels Verwendung von biokompatiblen Materialien wie Polysacchariden, Polyalkoholen oder Polyamiden minimiert werden. Zusammen mit einer derartigen Präparation der Oberfläche ist die gleichzeitige Einführung von chemischen Gruppen zur Anbindung von biologischen Affinitätsmolekülen von entscheidendem Vorteil (Nilsson und Mosbach 1981).

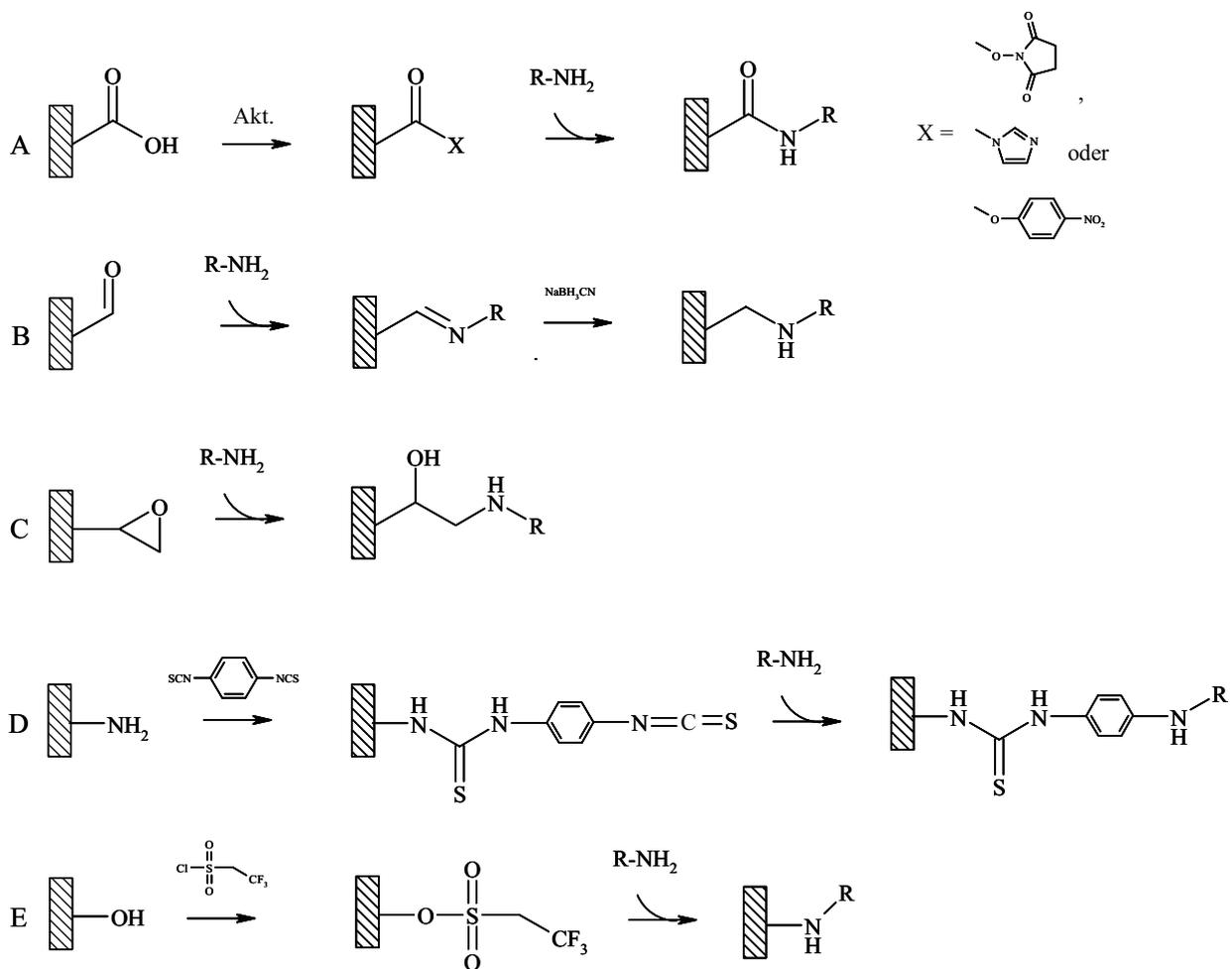


Abb. 5: Exemplarische Immobilisierungsmethoden von Biomolekülen an eine feste Phase

A: Aktivierung von Säuregruppen über NHS-, Acylimidazol- oder p-Nitrophenyl-Aktivester, B: Bildung einer Imins und Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid zum sekundären Amin, C: Kopplung über Epoxid, D: Aktivierung von Aminogruppen durch 1,4-Phenylendiisothiocyanat (PITC), E: Aktivierung von Alkoholen durch Trifluoressigsäurechlorid (TfCl).

Die wichtigsten der zahlreichen Immobilisierungsmethoden von Biomolekülen sind in Abb. 5 zusammengefasst.

Eine direkte Physisorption an einer festen Phase über van-der-Waals-Wechselwirkungen ist nicht sehr stabil und resultiert in ungeordneter Belegung von teilweise inaktiven Biomolekülen. Über zuvor präparierte Oberflächen kann eine kovalente Immobilisierung von Biomolekülen in aktiver Form stattfinden. Kovalente Methoden beinhalten die Verknüpfung einer aktivierten Gruppe mit einer funktionellen Gruppe des Zielmoleküls. Dabei sind Amino- oder Thiolgruppen aufgrund ihrer nukleophilen Eigenschaften die am häufigsten genutzten Gruppen (Scouten 1987, O'Shanessy *et al.* 1992). Sie werden bevorzugt über NHS-, p-Nitrophenyl- oder Acylimidazol-Aktivester (Abb. 5A), Epoxide (Abb. 5C) oder über die Ausbildung eines Imins mit anschließender Reduktion (Abb. 5B) kovalent an feste Phasen gebunden. Am Trägermaterial vorhandene Aminogruppen können unter Verwendung einer Vielzahl homo- oder heterobifunktionaler Linker (Hermanson 1996) wie z.B. 1,4-Phenylendiisothiocyanat (Abb. 5D) aktiviert werden. Alkohole sind relativ reaktionsträge und benötigen stringente Aktivierungsbedingungen, z.B. Inkubation über Nacht im basischen Milieu mit Epichlorhydrin oder Tresylchlorid (King und Gill 1996) (Abb. 5E). Die Verwendung bifunktionaler Linker beinhaltet immer die Gefahr der partiellen Inaktivierung der reaktiven Gruppen durch Lösungsmittelmoleküle oder Vernetzungen auf der festen Phase. Zu den nicht-kovalenten Immobilisierungsmethoden gehören natürliche Wechselwirkungssysteme mit hoher Affinität zueinander, z.B. Avidin-Biotin, Protein A-Antikörper (Lancet *et al.* 1978), Jun-Fos (Chiu *et al.* 1988) oder aus der Natur adaptierte Systeme wie metallchelatierende Histidin-Komplexe (Hochuli *et al.* 1987) (Abb. 6), die eine gerichtete Immobilisierung entsprechend modifizierter Biomoleküle erlauben.

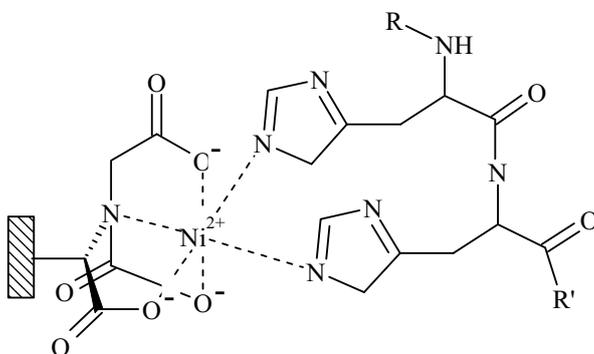


Abb. 6: Gerichtete Immobilisierung von Biomolekülen
Moleküle mit mehreren vicinalen Histidin-Gruppen lassen sich durch deren chelatierende Eigenschaften an ein koordinativ ungesättigtes Ni-Zentrum z.B. einer Nickel-Nitrilotriacetat-(NTA)-Matrix binden.

I.4 Antikörper und Phagen-Display

Antikörper bilden eine maßgebliche Komponente der humoralen Immunantwort höher entwickelter Lebewesen und gehören zur Familie der Immunglobuline. Sie dienen dazu, nach Eindringen von Fremdkörpern einer bestimmten Größe in den Organismus diese durch spezifische Bindung für den Abbau zu markieren oder direkt zu neutralisieren.

Nach Antigenkontakt werden von zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten spezifische Antikörper gebildet und sekretiert. Es gibt fünf Antikörperklassen in der Familie der Immunglobuline, von denen im Serum hauptsächlich die der Immunglobuline G (IgG) vorhanden ist. Diese Y-förmigen heterotetrameren Glykoproteine bestehen aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten mit Molekulargewichten von etwa 25 kDa und 50-75 kDa, die untereinander über Disulfidbrücken verbunden sind (Abb. 7). An ihren kurzen N-terminalen Enden befinden sich die beiden Antigen-Bindungsstellen (Paratope), die durch je drei hypervariable Regionen (komplementaritätsbestimmende Regionen, CDR) des variablen Teils der schweren und leichten Ketten gebildet werden. Der C-terminale Stamm beherbergt je nach Antikörperklasse unterschiedliche Effektorfunktionen.

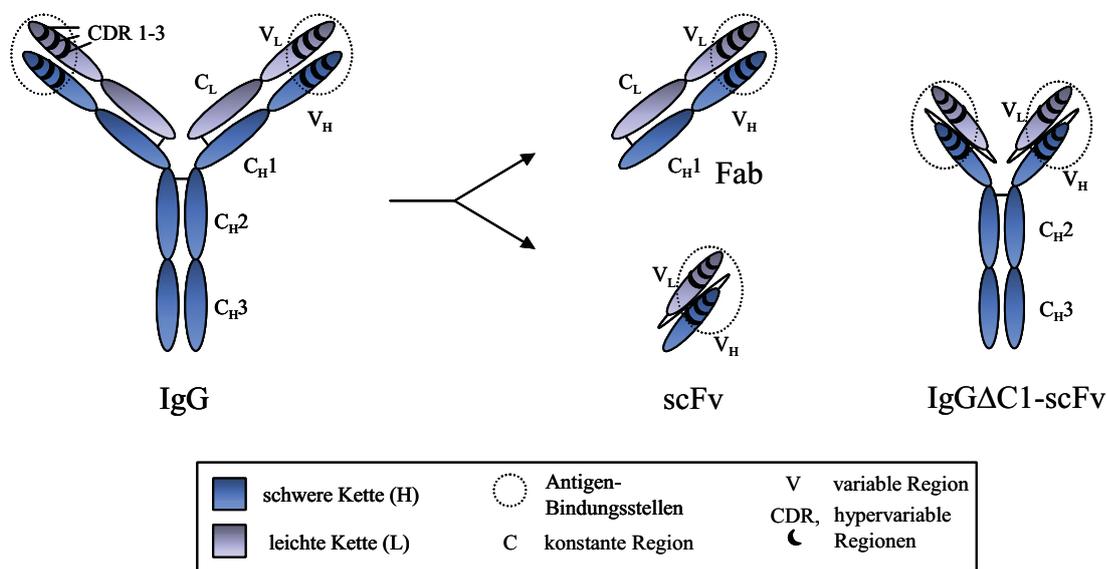


Abb. 7: Schematische Strukturen von IgG- und IgG Δ C1-scFv-Molekülen sowie Fab- und scFv-Antikörperfragmenten

Durch Isolierung der Antigenbindungsregion ist die Herstellung von Molekülen möglich, die die Bindungseigenschaften der Antikörper separat von den Effektorfunktionen besitzen. Zu dieser Klasse gehören die proteolytisch generierbaren Fab-Fragmente ebenso wie scFv-

Fragmente, die durch molekularbiologische Fusion der variablen Regionen der leichten und schweren Kette hergestellt werden können (Abb. 7). Vorteile der einzelkettigen Antikörper (scFv) sind die Stabilität, einfache Herstellung durch rekombinante Expression in Bakterien (Huston *et al.* 1988) und Generierung von einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle durch gezielte Variationen in den CDR (Barbas *et al.* 1992, Hoogenboom und Winter 1992). Die kombinatorisch eingeführte Vielfalt ergänzt somit das natürliche Immunrepertoire. Auf diese Art hergestellte scFv sind besonders für Anwendungen attraktiv, für die die herkömmliche Antikörperherstellung ungeeignet ist, z.B. für humantherapeutische Ansätze oder toxische Proteine.

Eine Erhöhung der Bindungswalenz von scFv kann z.B. durch Nutzung von homodimeren IgG Δ C1-scFv-Strukturen (Spillner 2002, Abb. 7) erreicht werden. Durch die Deletion der C1-Domäne der heterotetrameren IgG-Struktur ist dieses vereinfachte Konstrukt leicht rekombinant exprimierbar.

Als Affinitätsmoleküle sind Antikörper aufgrund ihrer Stabilität, Spezifität und Selektivität ihren Bindungspartnern gegenüber unverzichtbare Werkzeuge für die Diagnostik, Therapie und Analytik. Polyklonale Antikörper lassen sich aus immunisierten Tieren gewinnen, während die fortlaufende Herstellung von für biochemische Anwendungen attraktiveren monoklonalen Antikörpern aufwendiger ist, da hierfür die Fusion einer B-Lymphozyten- mit einer immortalisierten Tumorzelle vorangestellt ist (Köhler und Milstein, 1975).

Die Antikörpergenerierung gegen native toxische Proteine geht mit einer Reihe von Problemen einher. Die Verwendung subletaler Dosen des nativen Toxins führen möglicherweise nicht zu einer ausreichenden Immunantwort, bei der dann Antikörper geringerer Spezifität entstehen. Die verbreitetste Methode ist die Immunisierung nach Toxininaktivierung durch Formaldehyd, mit der zwar eine ausreichende Menge der Toxoide appliziert werden kann, jedoch können die Oberflächenepitope derart verändert sein, daß die generierten Antikörper das native Toxin nur unzureichend erkennen. Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von immobilisierten Peptiden, die Oberflächenepitope repräsentieren, als antigene Determinanten. Weitere Möglichkeiten sind die Anwendung der DNA-Vakzinierung (Pecher 2002, Rafii 2002) oder die Nutzung von immobilisierten Peptiden als antigene Determinanten (Ada 2001). Für die Herstellung monoklonaler

Antikörper sind in den letzten Jahren eine Reihe von *in vitro*-Selektionsverfahren wie Phagen- oder Ribosomen-Display etabliert worden.

Die Phagen-Display-Technologie (Smith 1985) ist ein kombinatorisches Verfahren, mit dem eine kleine Zahl von Proteinen mit gewünschten Bindungseigenschaften aus einer großen Bibliothek molekularer Vielfalt gewonnen werden kann. Mit diesem der Evolution nachempfundenen Selektionsverfahren können beispielsweise aus einer umfangreichen Antikörperfragmentbibliothek (Barbas *et al.* 1991, Knappik *et al.* 2000, Griffiths *et al.* 1994) nach mehreren Selektionsrunden wenige hochaffine Proteine isoliert werden, die die eingesetzte Zielsubstanz (z. B. Proteine oder niedermolekulare Verbindungen) spezifisch erkennen. Die grundlegende und für sämtliche Selektionsverfahren notwendige Voraussetzung ist dabei die Verbindung der genetischen Information, des Genotyps, mit der Information auf Proteinebene, des Phänotyps, die während der gesamten Selektionsprozedur aufrechterhalten bleiben muß. Vehikel, die diese Bedingung erfüllen, sind filamentöse Bakteriophagen. Diese bakterieninfizierenden Viruspartikel bestehen aus einer Proteinhülle und einem eingeschlossenen DNA-Strang, bei rekombinanten Phagen dem Phagemid-Vektor. Zusätzlich präsentiert jeder Phage auf seiner Oberfläche ein vektoriell kodiertes Antikörperfragment aus der Bibliothek. Das dargestellte Protein ist so über die Phagemid-DNA mit seinem genetischen Kode verknüpft. Die Wirtszellen zur Amplifikation der Phagemide und Produktion der Phagen sind standardäßig *E. coli*-Bakterien. Eine anschließende Gewinnung der spezifisch bindenden Antikörperfragmente ist durch bakterielle Expression möglich. Die Phagen-Display-Technologie ist somit ein wertvolles Werkzeug auf dem Gebiet der biomolekularen Interaktionsanalytik.

I.5 Lebensmitteltoxine

Lebensmittelvergiftungen und -infektionen werden durch Bakterien, Viren oder Schimmelpilze verursacht, die in verzehrten Lebensmitteln vorhanden oder diese zuvor mit toxischen Stoffwechselprodukten kontaminiert haben. Im Jahr 2001 wurden bundesweit etwa 150.000 Fälle von lebensmittelbedingten Erkrankungen bakteriellen und etwa 60.000 Fälle viralen Ursprungs mit uneinheitlichen Tendenzen gemeldet (Ammon und Bräunig 2002). Zu den häufigsten bakteriellen Erregern zählen *Salmonella enteritidis* (Salmonellose),

Staphylococcus aureus, *Camphylobacter jejuni*, humanpathogene *Escherichia coli* und *Clostridium botulinum* (Botulismus).

Im Gegensatz zu einer Infektion, der eine längere Inkubationsdauer bis zum Ausbruch vorausgeht, hat eine Vergiftung eine akute Wirkung. Die Vergiftungssymptome werden dabei hauptsächlich durch bakterielle Toxine ausgelöst, die während der Vermehrung als Stoffwechselprodukte ausgeschieden wurden. Als Toxine werden definitionsgemäß Gifte biologischen Ursprungs bezeichnet, die in der Natur zu unterschiedlichsten Zwecken von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen produziert werden (Bigalke und Wellhöner 1994). Sie kommen als membranständige Endo- oder lösliche Exotoxine vor, wobei letztere weiter nach ihren Wirkungsbereichen in Neuro-, Cyto- und Enterotoxine eingeteilt werden und auch separat vom sekretierenden Organismus wirksam sind.

Die Hauptursache von Lebensmittelvergiftungen ist die Schaffung von Bedingungen, die vor dem Verzehr zur Vermehrung von Bakterien in Nahrungsmitteln beitragen. Sie reichen von falscher Lagerung, mangelnder Hygiene bei der Verarbeitung über unzureichender Wärmebehandlung bis zu langen Transportwegen, während derer z.B. die Kühlkette unterbrochen wird.

Nachfolgend werden Staphylokokken-Enterotoxidose, eine der häufigsten Lebensmittelintoxikationen, und Botulismus, die gefährlichste lebensmittelbedingte Erkrankung, sowie deren auslösende Toxine näher beschrieben.

Staphylokokken-Enterotoxidose:

Nach der Salmonellose ist diese die häufigste Art der Lebensmittelvergiftung. Sie äußert sich hauptsächlich durch Erbrechen und Durchfall und verläuft in sehr seltenen Fällen letal.

Der natürliche Lebensraum von *S. aureus*-Bakterien ist die Haut von Tieren und Menschen, etwa 30-50 % der Bevölkerung ist besiedelt. *S. aureus*-Bakterien sind grampositive, nicht sporenbildende aerob und fakultativ anaerob wachsende Organismen. Nur etwa 40 % der Stämme sind in der Lage, Toxine zu bilden, von denen die für Lebensmittelintoxikationen relevanten Enterotoxine in mittlerweile 10 serologischen Varianten (SEA, SEB, SEC1-3,

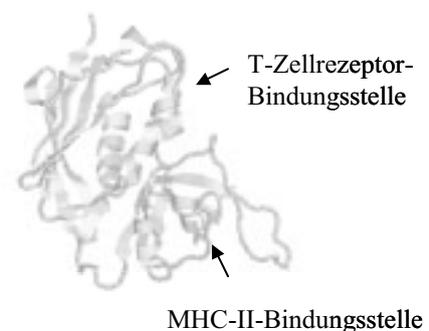


Abb. 8: Kristallstruktur von SEB (Papageorgiou *et al.* 1998)

SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ und SEK) identifiziert wurden (Monday und Bohach 1999, Orwin *et al.* 2001). Die nicht glykosylierten Proteine besitzen eine globuläre Struktur und weisen Molekulargewichte von 26-28 kDa auf. SEB (Abb. 8) ist nach SEA und SED das am dritthäufigsten auftretende Enterotoxin bei Lebensmittelvergiftungen in den USA (Casman 1965). Es gelangt effizienter als SEA in den Blutkreislauf (Hamad *et al.* 1997) und die biologische Aktivität ist im Gegensatz zu allen anderen Enterotoxinen unabhängig von Zinkionen (Balaban und Rasooly 2000).

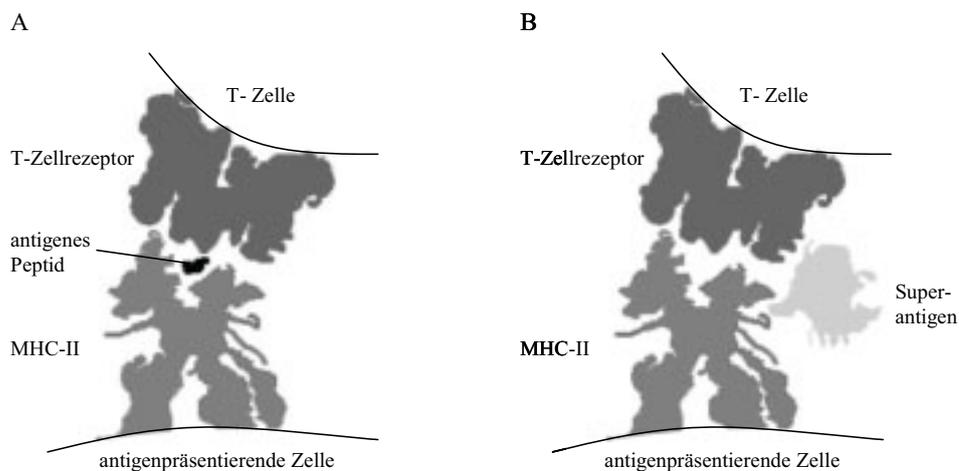


Abb. 9: Schematischer Strukturkomplex von MHC-II, T-Zellrezeptor und Antigenen
 A. Konventionelle Bindung von Zellen während der Immunantwort
 B. Ohne das prozessierte körperfremde Peptid kann ein antigenspezifischer T-Zellrezeptor nicht an MHC-II binden. Superantigene wie die Enterotoxine von *S. aureus* lösen durch Quervernetzung von MHC-II mit einem beliebigen T-Zellrezeptor eine unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems aus.

Enterotoxine von *S. aureus* zählen zur Klasse der bakteriellen Superantigene, die eine besondere Position bei der Aktivierung des Immunsystems einnehmen. Der konventionelle Weg der Aktivierung läuft über die Prozessierung von körperfremden Proteinen und nachfolgende Präsentation dieser Fragmente durch die Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Proteine der Klassen I oder II auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen. Dieser Proteinkomplex wird von spezifischen T-Zellrezeptoren erkannt (Abb. 9A) und eine kontrollierte Kaskade zur Entfernung der Fremdproteine ausgelöst. Superantigene dagegen sind in der Lage, unabhängig von präsentierten Antigenfragmenten, durch gleichzeitige Bindung an einen MHC-II-Molekül von Zellen des Immunsystems sowie einen beliebigen T-Zellrezeptor diese quervernetzen (Abb. 9B). Damit bewirken sie eine unkontrollierte Freisetzung von Mediatoren, die zu einer Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Zellarten

führen sowie in Entzündungsreaktionen und einer Überbeanspruchung des Immunsystems resultieren (Stiles *et al.* 1993, Scheuber *et al.* 1987).

Die Enterotoxine besitzen eine hohe Stabilität gegenüber Hitze, Proteasen und Säure (Jamlang *et al.* 1971). Zusammen mit der Fähigkeit von *S. aureus*, recht schnell Resistenzen gegenüber vielen antibakteriellen Wirkstoffen zu entwickeln, macht es sie zu potenten Erregern, die vornehmlich in Krankenhäusern vorkommen.

Botulismus:

Botulismus ist eine neuroparalytische Krankheit, die durch schlaffe Lähmung von Teilen der quergestreiften Muskulatur gekennzeichnet ist und in vier Varianten vorkommen kann: Kleinkind- (Pickett *et al.* 1976), Wund- (Grizzle 1972), Lebensmittel- sowie eine noch nicht klassifizierte Variante von Botulismus (CDC 1998). Der auslösende Organismus *Clostridium botulinum* ist nach dem lateinischen Wort für Wurst (*botulus*) benannt worden (van Ermengem 1897), nachdem viele auftretende Fälle von Botulismus, im 19. Jahrhundert *Kerners Krankheit* genannt, auf den Verzehr von verdorbener Blut- oder Leberwurst zurückzuführen waren.

Anaerob wachsende Bakterien der Gattung *Clostridium botulinum* produzieren eine Reihe von toxischen Stoffwechselprodukten (Smith und Sugiyama 1988), darunter die Botulinum Neurotoxine (BoNT, EC 3.4.24.69). Sie zählen zu den giftigsten bekannten biologischen Substanzen für den Menschen, der LD₅₀-Wert für BoNT A beträgt 1 ng/kg (Kortepeter *et al.* 2001). Es gibt sieben Serotypen der Neurotoxine (A-G), die von unterschiedlichen Stämmen produziert werden. Zu den humanpathogenen Toxinen gehören BoNT A, B, E und F. Die Organismen der Gattung *C. botulinum* sind grampositive, sporenbildene Stäbchen, die ihren natürlichen Lebensraum im Erdreich (Typen A-D, F-G), im Meeresboden oder in Meeresfrüchten (Typ E) haben (Johnson und Francis 1975, Hatheway *et al.* 1998).

Neurotoxine der *Clostridia*-Gattung sind bakterielle Exotoxine, die als einkettige Protoxine sezerniert werden, um anschließend durch Proteolyse in zweikettige, über Disulfidbrücken verbundene aktive Toxine überführt zu werden. BoNT A besteht aus einer schweren und einer leichten Proteinkette mit Molekulargewichten von 100 kDa bzw. 50 kDa mit insgesamt drei funktionellen Domänen (Abb. 10). Auf der schweren Kette befinden sich am intramolekular disulfidverbrückten C-Terminus die Bindungsdomäne und am N-Terminus die Transloka-

tionsdomäne mit intermolekularer Disulfidbrücke zur leichten Kette, auf der sich eine katalytische Zink-Endopeptidase-Domäne befindet (Montecucco and Schiavo 1995). Die aktiven Moleküle liegen als Komplex mit Hämagglutinin und anderen stabilisierenden Proteinen vor (Ohishi *et al.* 1977).

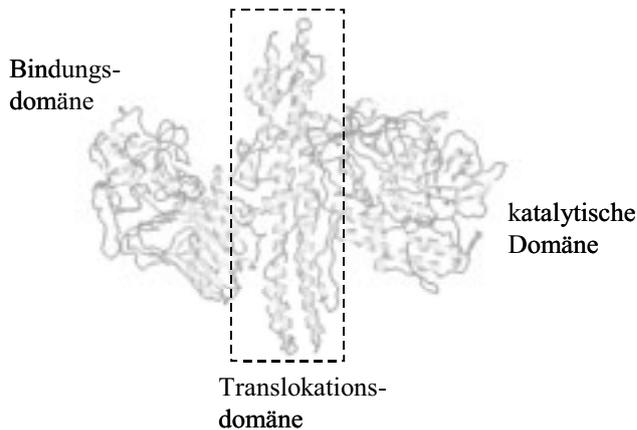


Abb. 10: Kristallstruktur von BoNT A (Lacy *et al.* 1998)

Die Translokationsdomäne in der Mitte des Proteins besteht aus mehreren parallelen α -Helices. Die Domäne für die Bindung an neuronale Zellen ist primär durch zwei β -Faltblattstrukturen gekennzeichnet, während die katalytische Domäne Anordnungen aus beiden Sekundärstrukturen aufweist.

Das Toxin lagert sich nach Aufnahme in den Organismus an Übergängen von Nerven- zu Muskelzellen ab und gelangt durch rezeptorvermittelte Endocytose in Nervenzellen (Black and Dolly 1986). Die biologisch aktive leichte Kette gelangt aus dem Endosom nach Kanalbildung der Translokationsdomäne in das Cytosol. Anschließend werden intrazellulär essentielle Proteine, die die Verschmelzung von acetylcholintragenden Vesikeln und der Plasmamembran der Muskelzellen ermöglichen (Südhof 1995), durch die leichte Kette proteolytisch inaktiviert. Durch die verhinderte Freisetzung von Acetylcholin kann keine Signalübertragung zur Muskelkontraktion mehr stattfinden. Diese inhibierende Wirkung resultiert in einer Paralyse, die im Gesichtsbereich beginnt und sich symmetrisch weiter körperabwärts ausbreitet. Durch Lähmung der Atemmuskulatur tritt nach 3-6 Tagen (Kortepeter *et al.* 2001) letztlich der Tod durch Ersticken ein. Wegen der extrem niedrigen letalen Dosis reichen für einen 70 kg schweren Menschen dazu picomolare Mengen im Blut (Arnon *et al.* 2001) aus. Die erfolgreiche Behandlung von Botulismus ist bei rechtzeitiger Diagnose durch erhältliches Pferdeserum gegen 3 oder 5 Toxine (CDC Drug Service, Atlanta, GA) oder Pferdeantikörper gegen alle 7 Serotypen möglich (Hibbs *et al.* 1996).

In minimalen Dosen wird BoNT A gezielt als medizinisches oder kosmetisches Arzneimittel zur Behandlung von ungewollten exzessiven Muskelkontraktionen im Gesichts- und Halsbereich eingesetzt (Scott 1980, Jankovic and Hallett 1994, Johnson 1999). Die US-

Gesundheitsbehörde FDA hat BoNT A im Jahre 1989 zur Behandlung von zunächst drei Krankheiten, Verkrampfungen im Hals- (zervikale Dystonie) und Augenbereich (Blepharospasmus) sowie unkontrolliertes Schielen (Strabismus), zugelassen.

I.6 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit wurde die Entwicklung von Verstärkungsmechanismen für den Einsatz in elektrochemischen Biosensoren zur Detektion von toxischen Proteinen verfolgt. Zur Minimierung unspezifischer Signale sollten die verwendeten chipbasierten IDA-Elektroden mit einer Reihe von zu synthetisierenden biokompatiblen Molekülen mit multiplen Anhaftungspunkten modifiziert werden. Durch die Oberflächenvergrößerung sollte eine größere Zahl von Affinitätsmolekülen immobilisiert werden können.

Anstelle des etablierten Reporterenzym Alkalische Phosphatase sollte α -D-Galaktosidase aus der Sojapflanze nach Isolierung und Expression für eine weitere Signalverbesserung getestet werden.

Als biologische Erkennungskomponenten für die spezifische Detektion der Toxine sollten monoklonale Antikörperfragmente mittels Phagen-Display-Technologie generiert werden. Es wurden als Zielproteine die Toxine BoNT A und SEB gewählt, die auch über die Nahrungskette in den menschlichen Organismus gelangen können.

Das antikörperbasierende Nachweissystem im Sandwich-ELISA-Format sollte zunächst mit Lysozym als Zielprotein etabliert und optimiert werden, bevor es auf die Toxine übertragen wurde. Dabei wurden Proteine im Durchflusssensor von immobilisierten Antikörpern lokal auf einem Biochip angereichert und das Signal nach enzymatischer Verstärkung mittels Redox-Recycling an den IDA-Elektroden detektiert.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Firma	Produkte
Acros Organics (St. Augustin):	p-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid, α -D-Melibiose
Alexis (Grünberg):	pAPP
Bio-rad (München):	Protein Standard broad range, pre- und unstained
Boehringer Mannheim (Mannheim):	RNase
Calbiochem (Schwalbach):	BoNT A, BoNT B, BoNT E, SEB
Chemagen (Baesweiler):	M-PVA E01 Epoxy-Magnetpartikel
Gibco BRL (Eggenstein):	Trypton, Hefe-Extrakt, Concert Rapid PCR Purification System
Hybaid AGS (Heidelberg):	<i>Taq</i> -Gold-DNA-Polymerase, Qualex-Gold-Agarose
Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe):	TA-Cloning Kit, Anti-His(C-Term)-Antikörper, Anti-myc-Antikörper, Anti-M13-HRP-Antikörperkonjugat, Trypsin-EDTA-Lösung
Metabion (Martinsried)	Oligonukleotide
MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	DNA-Probenpuffer(6x), dNTPs, DNA-Standards Nr. 16 (λ -DNA/Eco130I) und Nr. 23 (pUC19-DNA/MspI), Revert Aid cDNA Synthesis Kit, CycleReader Auto DNA Sequencing Kit, Restriktionsenzyme, CIAP
NEB (Schwalbach):	Restriktionsenzyme
Novagen (Bad Soden):	Straight A's mRNA Isolation Kit
Peqlab (Erlangen):	E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II
Pharmacia (Freiburg):	T7-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase, AutoRead Sequencing Kit
Perbio Science (Bonn):	Sulfo-NHS-LC-Biotin
Qiagen (Hilden):	Qiaex II Agarose Gel Extraktion Kit, Ni-NTA-Agarose,

	RNeasy-Kit
Serva (Heidelberg):	BSA (Fraktion V), TNBS, Sera-Mag Magnetpartikel
Sigma-Aldrich, Fluka (Taufkirchen):	TFA, pNPP, Lysozym, Dextran, BCA, Sulfo-NHS, EDC, Extravidin-AP-Konjugat

Weitere gängige Laborchemikalien und Lösungsmittel stammten von Merck (Darmstadt), Acros Organics (St. Augustin), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Calbiochem (Schwalbach). Anti-BoNT-Serum sowie BoNT A wurden von Prof. H. Bigalke (Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Toxikologie) zur Verfügung gestellt.

II.1.2 Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer MilliQ-Filteranlage von Millipore (Eschborn) angesetzt und autoklaviert oder mit 0,22 µm-Filtern sterilfiltriert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TYE- Platten mit Antibiotikum:	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 8 g NaCl, 15 g Agar, ad 950 ml, autoklavieren, bei 45 °C 50 ml 20 % D-Glukose-lösung und entweder 5 ml Ampicillin (20 g/l) oder 5 ml Kanamycin (10 g/l) dazugeben und gießen
Ag-Lösung I:	55 ml dH ₂ O, 30 ml Ethanol, 15 ml Eisessig
Ag-Lösung II:	500 mM NaAc, 14 mM Na ₂ S ₂ O ₃ , 25 % Ethanol, 0.5 % Glutardialdehyd
Ag-Lösung IV:	6 mM AgNO ₃ , 0.06 % Formaldehyd (37 %)
Ag-Lösung V:	263 mM Na ₂ CO ₃ , 0.06 % Formaldehyd (37 %)
Ag-Lösung VI:	50 mM EDTA
BCA-Lösung A:	1 g BCA, 1,7 g Na ₂ CO ₃ , 160 mg Na-Tatrat, 400 mg NaOH, 950 mg NaHCO ₃ , ad 100 ml H ₂ O, pH 11,25
BCA-Lösung B:	2 g CuSO ₄ ·5H ₂ O, ad 50 ml H ₂ O
BCIP-Lösung:	0,5 % (w/v) BCIP in DMF
Belegungspuffer:	100 mM NaHCO ₃ , pH 8,4
500xB (0,2 % Biotin):	20 mg Biotin, ad 100 ml

Material und Methoden

BMMY, BMGY:	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, ad 700 ml, autoklavieren, 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 100 ml 10xYNB, 2 ml 500x B, 100 ml 10 % Glycerin (BMGY) bzw. 100 ml 10 % Methanol (BMMY)
Breaking Buffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 M EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4
Citratpuffer:	50 mM Citronensäure, pH 4.0
Coomassie- Färbelösung:	0,25 % Coomassie Brilliant Blau R250, 45 % Methanol, 45 % ddH ₂ O, 10 % Eisessig
Coomassie- Entfärbelösung:	Je 45 % Methanol und ddH ₂ O, 10 % Eisessig
10xD (20 % Dextrose):	200 g Glucose, ad 1 l
Detektionspuffer AP:	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M MgCl ₂ , 0.1 M NaCl, pH 9.5
ELISA-Entwicklungslösung AP:	13 mM pNPP in TBS pH 9,5
ELISA-Entwicklungslösung HRP:	4 mg ABTS, 15 ml Citratpuffer pH 4.0, 30 µl 30 % H ₂ O ₂
1 M Kaliumphosphatpuffer:	132 ml 1 M K ₂ HPO ₄ , 868 ml 1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6,0
NBT-Lösung:	0,75 % NBT, 0,1 % Tris, 100 mM MgCl ₂ , pH 9,0
4x PAGE-Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8
5x PAGE-Tankpuffer:	125 mM Tris, 960 mM Glycin, 0,5 % SDS, pH 8,3
4x PAGE-Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8
PEG/NaCl-Lösung:	20 % PEG, 2,5 M NaCl
PBS-Puffer:	100 mM NaCl, 30 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, pH 7,4
Phosphatpuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, pH 7,0
Plasmid-Präparationslösung I:	50 mM D-Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8
Plasmid-Präparationslösung II:	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Plasmid-Präparationslösung III:	3 M Kaliumacetat, pH 5,2
Soft Agar-Lösung:	1 l 2xYT-Medium, 7,5 g Agar
S-Puffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,0
50xTAE-Puffer:	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8, ad 1 l
50xTBE-Puffer:	54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8, ad 1 l
TBS-Puffer	30 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0-9,5
Transfer-Puffer:	25 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 200 ml Methanol, pH 8,3,

	ad 1 l
Trypsin-EDTA	0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA•4Na
10xYNB:	34 g YNB, 100 g Ammoniumsulfat, ad 1l, steril filtrieren
YPD-Medium:	10 g Hefe Extrakt, 20 g Pepton, (Platten: 20 g Agar), ad 900 ml, autoklavieren, 100 ml 10xD
YPDS-Zeocin-Platten	95 ml YPD-Medium mit 1,5 g Agar autoklavieren, bei 45 °C 5 ml 1 M Sorbitollösung und Zeocin zu 100 µg/ml dazugeben und gießen
2xYT-Medium:	16 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, ad 1 l

II.1.3 Bakterienstämme, Vektoren und Phagen-Display-Zubehör

Bei den für Transformations- und Amplifikationszwecke verwendeten Bakterienstämmen DH5 α , TG-1, HB2151 sowie Top10 handelt es sich um K12-*E. coli*-Stämme, die von Stratagene (Palo Alta, CA), APB (Freiburg) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) käuflich erworben wurden.

Für Phagen-Display-Anwendungen wurden M13K07-Helferphagen von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Helfer-Phagen vom Typ KM13 (Riechmann und Winter 2000), Phagemid-Vektor pHEN2 sowie die humane synthetische scFv-Bibliothek Griffin1 wurden von G.Winter (Centre of Protein Engineering, MRC Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

II.1.4 Geräte

Firma	Gerätebezeichnung
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg):	UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000, Äkta Purifier mit P900-Pumpe, UV900-Detektor und Frac-950 Fraktionssammler
Applied Biosystems (Weiterstadt):	HPLC-Anlage bestehend aus einem 783A Programmable Absorbance Detector, 1480A Injector/Mixer und zwei 400 Solvent Delivery System Pumpen
Biorad (München):	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell

Material und Methoden

eBiochip Systems (Itzehoe):	8-Kanal-Multiplex-Potentiostat
Eppendorf (Hamburg):	Zentrifuge 5415 C, Zentrifuge 5417 C, Kühlzentrifuge 5417 R, Biophotometer, Micromanipulator 5171
Fedegari (Fernwald):	Laborautoklav T-Line
Gössner (Hamburg):	Laborautoklav GLA BRRT28
Grom (Herrenberg):	HPLC-Säulen: Vydac 300 C8 RP 10 μm , 4,6 x 250 mm (analytisch) Vydac 300 C8 RP 10 μm , 20 x 250 mm (semi-präparativ)
Hewlett Packard (Stuttgart):	ESI-MS HP 59987A
Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, CA):	Minigel-Apparatur LKB 2050 MIDGET für SDS-PAGE, SE 1200 Easy Breeze Air Gel Dryer
Hybaid-AGS (Heidelberg):	PCR-Sprint-Thermoblock PCR-OmniGene-HB TR3-Block, Easy-CastMinigel-System für Agarosegelelektrophorese
Intas (Göttingen):	Video-Image-System
Ismatec (Wertheim):	Peristaltik-Pumpe
New Brunswick Scientific (Nürtingen):	Innova TM 4300 Inkubationsschüttler
Sepatech (Hannover):	Heraeus Megafuge 1.0
SLT-Instruments (Gröding, AU)	EasyReader EAR 400AT
Steiner (Hamburg):	UV-Transilluminator (302 nm, 90 W)
Zeiss (Oberkochen):	Lichtmikroskop Stemi 2000C

II.2 Methoden

II.2.1 Biochip-Technologie

Die verwendeten Biochips wurden unter Anwendung von Standard-Halbleitertechnologie auf 15 cm-Siliziumscheiben am Fraunhofer ISIT hergestellt. Nach Durchführung sukzessiver UV-Lithographie-, Ätz- und Abscheidungsprozesse besaßen die Chips (Abb. 2A) mit einer Größe von 6,4 x 4,5 mm auf ihrer Siliziumnitrid- bzw. Siliziumdioxid-Oberfläche Felder mit Nanostrukturen aus Gold, die IDA-Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktierungsflächen darstellten. Es wurden zwei Arten von Biochips verwendet, H-Biochips (Abb. 2B) mit acht IDA-Elektroden, die eine Position abdeckten und Array-Biochips (Abb. 2C) mit bis zu vier Positionen (Tab. 2) zu je zwei IDA-Elektroden.

Biochip-Bezeichnung	Anzahl IDA-Elektroden	Elektrodenfläche [mm ²]
H1	8	0,14
H2	8	0,28
200 µm Array	2/Position	0,02/Position
400 µm Array	2/Position	0,07/Position

Tab. 2: Eigenschaften verwendeter elektrischer Biochips

Die acht interdigitalen Arbeitselektroden mit einer Breite von je 2 µm bzw. 1 µm bei H2- bzw. H1-Biochips besaßen Abstände von 800 nm zueinander. Bei Array-Biochips waren je drei SU-8-Polymer-Ringe konzentrisch um jede Position angeordnet, die der Kompartimentierung dienten und Signalverfälschungen durch Diffusion in den ersten Sekunden der Messung verhindern sollten.

Amperometrische Messungen

Für amperometrische Messungen wurde ein prozessorgesteuerter Multikanalpotentiostat (eBiochip Systems, Itzehoe) verwendet (Abb. 11), mit dem acht Kanäle parallel ausgelesen werden konnten. Diese simultane Messung ermöglichte eine Signalverstärkung und Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses durch Signalglättung (Hintsche *et al.* 1994). Es wurde in einer für die Elektrodenkinetik üblichen 3-Elektroden-Anordnung (Gegen-, Referenz- und Arbeitselektroden) gemessen, da so lösungsbedingte Spannungsschwankungen kompensiert werden konnten (Bard and Faulkner 1980). Dieses wurde erreicht, indem

zwischen einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und einer großflächigen Gegenelektrode eine konstante Spannung laufend angeglichen wurde, um das gewünschte Potential an den kleinen Arbeitselektroden aufrechtzuerhalten. Erhaltene Meßdaten wurden vom Potentiostaten direkt an einen PC übertragen und mit Hilfe der Origin 5-Software (Microcal, Northampton, MA) visualisiert. Gemessen wurde elektrochemisch aktives p-Aminophenol (pAP), das durch enzymatischen Umsatz von p-Aminophenylphosphat (pAPP) generiert wurde, bei angelegten Potentialen von +350 mV bzw. -50 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (Microelectrodes, Bedford, NH) an den Arbeitselektroden detektiert werden konnte (Tang *et al.* 1988, Niwa *et al.* 1993). Die verwendeten Spannungswerte entsprachen den aus cyclovoltammetrischen Messungen mit pAP erhaltenen Redox-Spitzenpotentialen sowie dem aus kinetischen Messungen ermittelten Halbstufenpotentials von pAPP (Niwa *et al.* 1993, Razumas *et al.* 1980). Bei diesen Einstellungen wurden pAP-Moleküle an den Anoden zu p-Iminochinon (pIC) oxidiert und an den Kathoden wieder reduziert (Abb. 3).

Apparativer Aufbau

Für die elektrochemischen Messungen und Auswertungen stand eine portable Meßapparatur (Abb. 11) zur Verfügung.

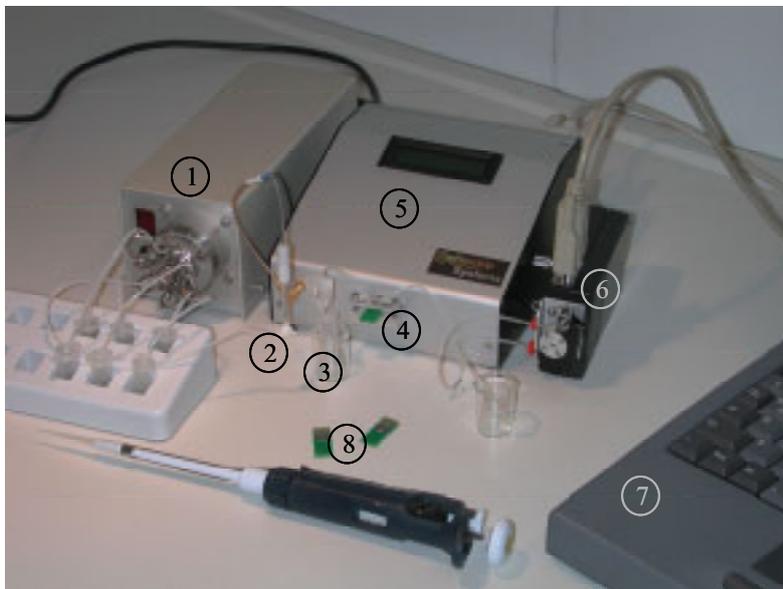


Abb. 11: Portable Meßapparatur für Vor-Ort-Analysen

Der Zufluß der verschiedenen Lösungen wurde über eine Peristaltikpumpe (6) und ein 6-Wege-Ventil (1) gesteuert. Die Messungen fanden an einem Multiplex-Potentiostaten (5) mit externer Ag/AgCl-Referenzelektrode (2) statt. Die Magnetpartikel wurden über eine separate Zufuhr (3) auf einen in einer Durchflußzelle (4) fixierten Biochip transportiert. Die Steuerung und Auswertung war über einen angeschlossenen Laptop-Computer (7) möglich. Als Größenvergleich sind die verwendeten Biochips (8) sowie eine Pipette abgebildet.

Die Durchflußzelle mit einem Kammerinnenvolumen von ca. 1 μl (Abb. 12) bestand aus einem Aluminiumblock und einem Polyacrylamid-Aufsatz, der mit einer 300 μm dicken Polyurethanfolie abgedichtet und über Teflon- (0,75 mm Innendurchmesser, Dupont, Bad

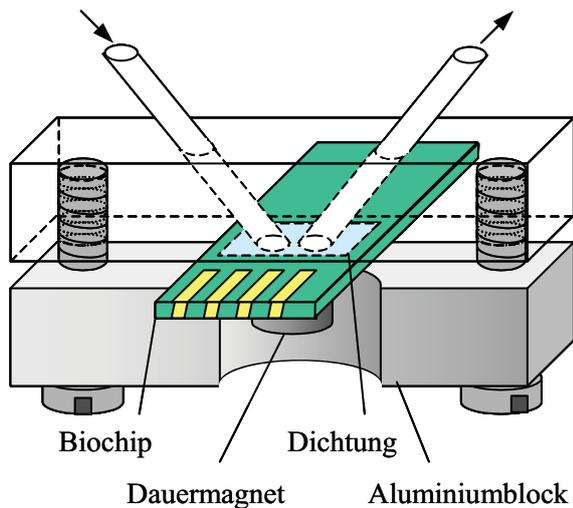


Abb. 12: Schematische Darstellung der verwendeten Durchflußzelle mit eingespanntem Biochip und fixiertem Dauermagneten

Homburg) und Silikonschläuche (0,8 mm Innendurchmesser, Reichelt, Sande) mit der Fluidik verbunden wurde.

Bei Magnet-Assays wurde ein zylindrischer Dauermagnet mit einem Durchmesser von 3 mm unter dem Biochip zur Anreicherung von suspendierten superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln positioniert. Anschließend wurde der Biochip in die Durchflußzelle geklemmt und mit dem initialisierten Potentiostaten verbunden.

II.2.1.1 Fertigstellung von Biochips

Die Chips auf der Siliziumscheibe wurden zunächst optisch unter einem Mikroskop auf ihre Unversehrtheit hin überprüft. Array- und H-Chips wurden auf mit Steckkontakten versehenen polymeren Substraten (25 x 10 mm, Britze Elektronik, Berlin) mit einem leitfähigen Kleber (Ablebond 8380, AAT Aston, Nürnberg) fixiert und für 10 min bei 130 °C gehärtet. Für Chips, die für Magnetpartikelassays vorgesehen waren, wurden durchbohrte ($\varnothing = 4$ mm) Träger verwendet. Anschließend fand der Bonding-Prozeß statt, wobei die Chips über filigrane Aluminiumdrähte mit dem Substrat verbunden wurden. Dieser Bereich wurde, um die Drähte vor Beschädigungen zu schützen, mit Silikonkleber (3140, Dow Corning, Midland, MI) isoliert.

Vor Gebrauch wurden die Biochips einem Funktionstest unterzogen. Dazu wurden sie in einen initialisierten Multiplex-Potentiostaten (eBiochip Systems, Itzehoe) gesteckt, die Messung gestartet und warme feuchte Luft auf die Elektrodenflächen geleitet. Durch die sich niederschlagende Feuchtigkeit wurde an funktionellen Elektroden ein Signal ausgelöst.

Die Elektrodenflächen der funktionellen Biochips wurden anschließend für 2 min mit 50 %iger H_2SO_4 behandelt, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Nach Spülen mit dH_2O wurden die Biochips im N_2 -Strom getrocknet und konnten verwendet werden.

II.2.1.2 Belegung von Biochips mit Oberflächenmolekülen

Die Belegung von Biochips erfolgte bei Verwendung von Array-Chips, die Positionen mit 200 μm bzw. 400 μm Durchmesser besaßen, mittels einer Kombination aus Lichtmikroskop und Micromanipulator. In eine 10 μl Hamiltonspritze (Hamilton, Martinsried) wurde 1 μl einer 0,1-1 %igen (w/v) Lösung entsprechender Oberflächenmoleküle aufgezogen, im Micromanipulator fixiert und etwa 8 nl bzw. etwa 50 nl auf die entsprechende Position des 200 μm - bzw. 400 μm -Array-Biochips überführt. Danach wurden weitere Positionen analog belegt und der Biochip in puffergesättigter Atmosphäre 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Positionen mit dH_2O gespült und der Biochip getrocknet.

Bei der Belegung von H1- und H2-Biochips wurden 2 μl der zu belegenden Substanzlösung direkt auf die Mikroelektroden pipettiert, ansonsten wurde nach analogem Schema verfahren.

II.2.1.3 Ermittlung von Belegungsdichten

Die Belegungsdichte der oberflächenmodifizierenden Moleküle wurde über die Elektrodenzugänglichkeit der Biochips bestimmt, da sämtliche Belegungsreagenzien über ihre Thiofunktion an die Goldoberfläche gebunden wurden und damit die Zugänglichkeit herabsetzten. Bei zu geringer Belegung war die Zugänglichkeit hoch, allerdings konnten dann

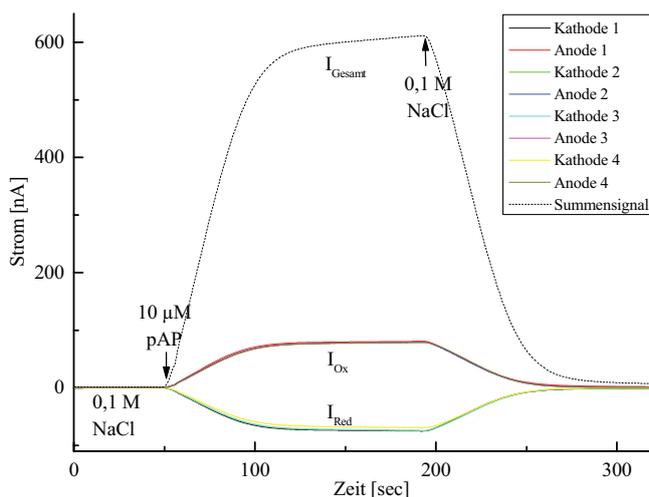


Abb. 13: Meßsignal von 10 μM pAP in 0,1 M NaCl an 4 Chipelektrodenpaaren bei +350 mV und -50 mV unter Verwendung eines H1-Biochips

Nach Äquilibrierung des in die Flußzelle eingespannten Biochips mit 0,1 M NaCl in ddH_2O wurde eine 10 μM pAP-Lösung in 0,1 M NaCl eingespeist. Der Signalverlauf der vier anodischen (I_{Ox}) und vier kathodischen (I_{Red}) Ströme ist pH-abhängig und im neutralen Bereich symmetrisch. Nach Erreichen eines Sättigungsplateaus wurde 0,1 M NaCl über den Biochip geleitet. Zur Auswertung wurde das Summensignal (I_{Gesamt}) aller acht Elektrodensignale gebildet.

weniger Biomoleküle immobilisiert werden, während bei zu hoher Belegung die Elektrodenoberfläche von den redox-aktiven Substanzen abgeschirmt war. Die

Elektrodenzugänglichkeiten wurden durch Messungen (Abb. 13) bei +350 mV und -50 mV mit 10 μ M p-AP in 0,1 M NaCl-Lösung vor und nach der Belegung bestimmt.

II.2.1.4 Immobilisierung von Biomolekülen auf modifizierten Chipoberflächen

Biochips, die zuvor mit carboxylfunktionalisierten Oberflächenmolekülen belegt wurden, konnten mit entsprechenden Reagenzien in eine aktivierte Form überführt werden, um anschließend Proteine über deren Aminofunktionen kovalent zu immobilisieren. Die Aktivierung fand entweder im organischen (A) oder im wässrigen (B) Milieu statt.

Die trockene Chipoberfläche wurde für 15 min entweder mit 2 μ l einer Lösung aus 90 μ M Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinphosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP) und 1 % N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) (Coste *et al.* 1990) in trockenem DMF (A) oder mit 4 μ l einer Lösung aus 0,4 M N^ε-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDC) und 0,06 M N-Hydroxysulfo-succinimid (Sulfo-NHS) (Staros *et al.* 1986) behandelt (B). Anschließend wurde der Biochip mit 40 μ l eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen und 2 μ l einer konzentrierten Proteinlösung auf das aktivierte Feld gegeben. Nach 15 min wurde die Chipoberfläche mit 100 μ l PBS pH 7,4 gewaschen und mit 5 μ l einer 3 %igen BSA-Lösung für 30 min blockiert. Anschließend wurde erneut mit 100 μ l PBS pH 7,4 gewaschen und der präparierte Chip in einer Feuchtekammer gelagert.

II.2.1.5 Immobilisierung von Biomolekülen an Magnetpartikeln

Für die Immobilisierung von Biomolekülen an magnetischen Mikrosphären wurden entweder Carboxy- oder voraktivierte Epoxy-Magnetpartikel verwendet.

1.) Epoxyfunktionalisierte Magnetpartikel (Durchmesser: 700-1000 nm, Bindungskapazität 220 pmol/ μ g, chemagen, Baesweiler)

20 μ l einer 50 mg/ml Magnetpartikel-Suspension in Aceton (1 mg Magnetpartikel \equiv 220 nmol Epoxygruppen) wurden zunächst mit 100 μ l eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen und in einem Magnetstand separiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und abschließend mit 100 μ l eiskaltem 100 mM Boratpuffer pH 8,5 gewaschen. Konzentrierte IgG- oder scFv-Antikörper-Lösungen wurden zu einem Endvolumen von 20-50 μ l 1:2 mit 100 mM Boratpuffer pH 8,5 versetzt, zu den präparierten Magnetpartikeln gegeben und die Ansätze über Nacht bei RT auf

einem Roll- oder Schüttelbrett inkubiert. Danach wurde einmal mit 100 μ l eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen und die nicht reagierten Epoxygruppen nach Zugabe von 100 μ l 3 % BSA in 100 mM Boratpuffer oder TBS pH 8,5 für 3 h bei RT blockiert. Anschließend wurde zweimal mit je 100 μ l PBS pH 7,4 gewaschen, bevor die Magnetpartikel in einer Konzentration von 10 μ g/ μ l in PBS pH 7,4 bei 4 °C gelagert wurden.

2.) Epoxyfunktionalisierte Magnetpartikel (Durchmesser: 700-1000 nm, Bindungskapazität 220 pmol/ μ g, Dynal, Hamburg)

1 mg Epoxy-Magnetpartikel wurden für 1 min in 20 μ l eiskaltem PBS pH 6,1 suspendiert. Anschließend wurden die Partikel in einem Magnetstand separiert, der Puffer entfernt und mit 30 μ l einer konzentrierten Protein-Lösung in 100 mM Boratpuffer pH 8,5 versetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei RT auf einem Roll- oder Schüttelbrett inkubiert. Danach wurde einmal mit 100 μ l eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen und die nicht reagierten Epoxygruppen nach Zugabe von 100 μ l 3 % BSA in 100 mM Boratpuffer oder TBS pH 8,5 für 3 h bei RT blockiert. Anschließend wurde zweimal mit je 100 μ l PBS pH 7,4 gewaschen, bevor die Magnetpartikel in einer Konzentration von 10 μ g/ μ l in PBS pH 7,4 bei 4 °C gelagert wurden.

3.) Carboxylfunktionalisierte Magnetpartikel (Durchmesser: 740 nm, Bindungskapazität 480 pmol/ μ g, Serva, Heidelberg)

Aus einer Magnetpartikel-Suspension wurden 2 μ l (100 μ g Partikel \equiv 48 nmol Carboxylgruppen) entnommen, zweimal mit je 100 μ l PBS 7,4 gewaschen und dabei mit einem Magneten im Reaktionsgefäß fixiert. Anschließend wurden die Carboxylgruppen durch Zugabe von 60 μ l einer Lösung aus 1 mg (4,6 μ mol) Sulfo-NHS und 1 mg (5,2 μ mol) EDC in eiskaltem PBS pH 7,4 für 15 min bei RT aktiviert. Nach Entfernung der Lösung wurden zügig 10-50 μ l Proteinlösung in PBS pH 7,4 dazugegeben und für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mit 100 μ l PBS pH 7,4 gewaschen. Eine Blockierung der verbliebenen reaktiven Ester wurde durch Inkubation für 1 h bei RT unter Schütteln mit üblicherweise 3 % BSA in TBS 8,5 erreicht. Nach zweimaligem Waschen mit je 100 μ l PBS pH 7,4 wurden die magnetischen Partikel in einer Endkonzentration in 10 μ g/ μ l in PBS pH 7,4 bei 4 °C gelagert.

II.2.1.6 Durchführung chipbasierter Immunoassays

Sämtliche Lösungen wurden in autoklavierten und bei RT entgasten Puffern angesetzt. Vor den Messungen wurde das System luftblasenfrei gespült. H1- und H2-Biochips wurden für die Magnetpartikel-Assays vor dem Einbau in die Durchflußzelle für 30 min mit 5 µl 3 %iger BSA-Lösung in PBS pH 7,4 versetzt, um die hydrophobe Goldoberfläche zu belegen. Ebenso wurde die gesamte Fluidik für 30 min mit einer 3 %igen BSA-Lösung inkubiert. Zusätzlich enthielten die Waschpuffer 0,05 % Tween 20 zur Reduktion unspezifischer Adsorptionen und 1 % BSA, um eventuell abgelöste BSA-Moleküle an den Schläuchen oder auf der Goldoberfläche zu ersetzen und so fortlaufend eine Biokompatibilität des Systems aufrechtzuerhalten. Die Inkubations- und Waschschrte der Immunoassays fanden sowohl außerhalb der Durchflußzelle in Reaktionsgefäßen (off-chip-Assay) als auch komplett auf dem Chip (on-chip-Assay) statt. Die chronoamperometrischen Messungen (Abb. 14) fanden immer direkt auf dem jeweiligen Biochip statt. Dazu wurde der Potentiostat vor der

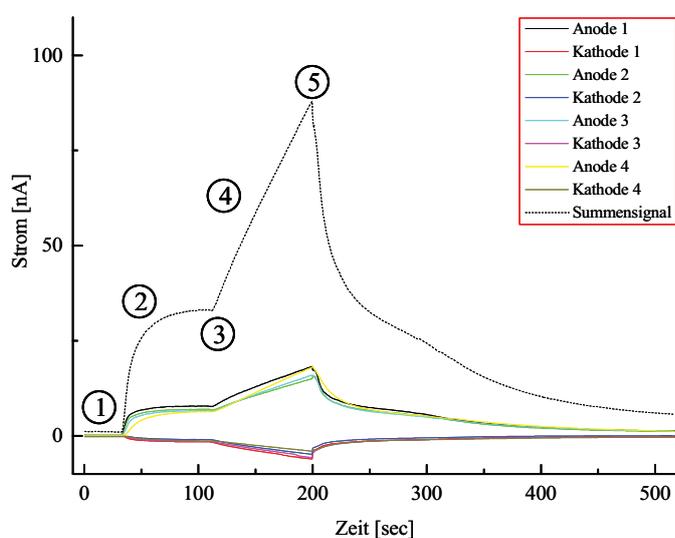


Abb. 14: Chronoamperometrische Messung eines Immunoassays

Nach Äquilibrierung des Systems mit TBS pH 8,0 (1) wurden 5 mM pAPP in TBS pH 8,0 in die Durchflußzelle geleitet (2). Bei Erreichung eines stabilen Signalplateaus wurde die Flußrate auf 0 µl/min gesetzt (3), um die Generierung (4) von elektrochemisch aktivem pAP aus pAPP durch die lokal angereicherten AP-Enzyme zu messen. Nach 1-3 min (5) wurde das System bis zur Erreichung der ursprünglichen Grundlinie mit TBS pH 8,0 gespült. Die Flußraten variierten zwischen 80 und 110 µl/min. Die Auswertung erfolgte über Ermittlung der Steigung der addierten Signale der beteiligten Anoden und Kathoden (Summensignal).

Verbindung mit dem Biochip initialisiert und die Messung wurde bei den angelegten Potentialen von -50 mV und +350 mV gegen eine externe Ag/AgCl-Referenzelektrode durchgeführt.

Durchführung off-Chip-Assays

Es kamen sowohl Array- als auch H-Biochips zum Einsatz. Die Biochips wurden nach II.2.1.2 und II.2.1.4 beladen und blockiert. Alle folgenden Inkubationsschritte fanden bei RT in einer puffergesättigten Atmosphäre statt. Auf die Mikroelektroden wurden 2 µl des Zielproteins in entsprechender Konzentration gegeben und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl PBS pH 7,4 wurden 3 µl einer Detektionsantikörper-Lösung in einer Verdünnung von 1:2500 mit 1 % BSA in PBS pH 7,4 über die Positionen gegeben und für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit je 200 µl PBS pH 7,4 gewaschen und mit 3 µl Extravidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Ex-AP) 1:2500 mit 1 % BSA in TBS pH 8,0 für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Biochips dreimal mit je 200 µl TBS pH 8,0 gewaschen und in die Durchflußzelle geklemmt. Nach Äquilibrierung des Systems mit TBS pH 8,0 wurde die Messung in Gegenwart von 5 mM pAPP-Lösung in TBS pH 8,0 durchgeführt.

Magnet-Partikel-Assay off-chip

Es wurden 10-30 µg Antikörper-Partikel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und alle folgenden Inkubationen bei RT durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Partikel mit Hilfe eines Magnetstandes separiert und konnten so leicht gewaschen werden. Es folgte die Inkubation mit 50 µl des Zielproteins in entsprechender Konzentration für 1 h. Danach wurden die Partikel zweimal mit je 500 µl PBS pH 7,4 gewaschen, mit 50 µl des biotinmarkierten sekundären Antikörpers in PBS pH 7,4 mit 1 % BSA in einer Verdünnung von 1: 2500 versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde nacheinander zweimal mit je 500 µl PBS pH 7,4 und 100 µl TBS pH 8,0 gewaschen, bevor 50 µl Ex-AP in TBS pH 8,0 mit 1 % BSA in einer Verdünnung von 1: 2500 dazugegeben wurde und für 30 min inkubiert wurde. Danach wurden die Partikel zweimal mit je 500 µl TBS pH 8,0 gewaschen und auf den sich in der Flußzelle befindenden Biochip überführt. Anschließend fand die Messung mit 5 mM pAPP-Lösung in TBS pH 8,0 statt.

Magnet-Partikel-Assay on-chip

Bei Magnet-Partikel-Assays wurde der mit BSA belegte H2-Biochip in die Durchflußzelle eingebaut und in den Potentiostaten gesteckt. Über eine separate Zufuhr (s. Abb. 11) wurden

10-30 μg Antikörper-Partikel auf den eingespannten Biochip transportiert. Durch einen Magneten, der sich unterhalb des Elektrodenfeldes des Biochips befand, wurden die Antikörperpartikel bei Flußraten von ca 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ gezielt fixiert und das System mit PBS pH 7,4 äquilibriert. Vor der eigentlichen Messung wurde zunächst eine Kontrollmessung durchgeführt, um das durch unspezifische Wechselwirkungen der Detektionsreagenzien hervorgerufene Hintergrundsignal zu ermitteln. Nach 3 min Spülen mit PBS pH 7,4 wurde für 2 min eine 1 %ige BSA-Lösung in PBS pH 7,4 über die Antikörperpartikel transportiert und durch Abschalten der Pumpe für weitere 5 min inkubiert. Nach 5 min Spülen mit PBS pH 7,4 wurde die Prozedur mit dem Detektionsantikörper in entsprechender Verdünnung mit 1 % BSA in PBS pH 7,4 wiederholt. Anschließend wurde das System nacheinander für 5-10 min mit PBS pH 7,4 und für 5 min TBS pH 8,0 gespült, bevor mit einem Antikörper-AP-Konjugat 1:2500 mit 1 % BSA in TBS pH 8,0 den ersten beiden Proteinlösungen analog verfahren wurde. Durch Spülen für 10 min mit TBS pH 8,0 wurde das System für die anschließende Messung äquilibriert. Nach Zugabe von 5 mM pAPP mit 1 % BSA in TBS wurde die chronoamperometrische Messung durchgeführt. Nach Beendigung der Messung wurde der Magnet entfernt und die Partikel durch Einleitung von mehreren Luftblasen und gleichzeitige Erhöhung der Fließgeschwindigkeit auf etwa 180 $\mu\text{l}/\text{min}$ aus dem System entfernt. Die Prozedur wurde nach Immobilisierung von frischen Antikörperpartikeln mit dem Zielprotein in entsprechender Konzentration anstelle der BSA-Lösung wiederholt.

II.2.2 Chemische Synthesen

II.2.2.1 Darstellung von thiomodifizierter Carboxymethyl-Cellulose (t-CMC)

6 g (28,5 mmol) 3,3'-Dithiodipropionsäure wurden in 20 ml (32,7 g, 275,9 mmol) frisch destilliertem Thionylchlorid 90 min unter Rückfluß erhitzt, wobei die entstehenden Gase SO_2 und HCl über eine leere in eine mit 2,5 M NaOH gefüllte Waschflasche eingeleitet wurden. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid destillativ entfernt und das braune Zwischenprodukt im Vakuum auf etwa 3 ml eingengt. 10 μl des zähflüssigen Zwischenproduktes wurden mit 990 μl trockenem DMSO verdünnt und 10 μl dieser Lösung zu einer Suspension aus 1 g (4 μmol) sauer gefällter Carboxymethyl-Cellulose (Derivatisierungsgrad 1,2) in 15 ml getrocknetem Pyridin gegeben und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Rohprodukt mit insgesamt 20 ml getrocknetem Pyridin gewaschen und im

Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt in 3 ml dH₂O gelöst und gegen 5 l dH₂O für 3 h bei RT dialysiert. Daraufhin wurde die Lösung mit 0,1 M HCl angesäuert und das Produkt nach Zugabe von 5 ml Isopropanol bei 4 °C präzipitiert. Nach Filtration wurde das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 515 mg (2 µmol), entspricht 49 % bezogen auf CMC

EA (%): C: 44,21 (th. 43,33), H: 7,36 (th. 6,01), S: 0,9 (th. 1,65)

II.2.2.2 Darstellung von thiomodifizierten Dendrimeren

II.2.2.2.1 Darstellung von Dendrimer 4

Es wurden 3 mg (14 µmol) 3,3'-Dithiodipropionsäure mit 4,5 mg (9 µmol) PyBOP und 2 µl (1,5 mg, 12 µmol) DIEA in 200 µl getrocknetem DMF gelöst und 1 h bei 40 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend zu einer Lösung aus 90 µl (91 mg, 54 µmol) 4,25-Bis-(3-aminopropyl)-8,21-bis-{3-[bis-(3-aminopropyl)-amino]-propyl}-12,17-bis-{3-[bis-(3-(bis-(3-aminopropyl)-amino)-propyl)-amino]-propyl}-1,20-diamino-4,8,12,17,21,25-hexaazaocosaicosan (**2**) in 5 ml getrocknetem THF gegeben und für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das während der Reaktion ausgefallene Rohprodukt filtriert. Durch Zugabe von 10 ml Ethanol zum Filtrat wurde weiteres Rohprodukt gefällt, filtriert und mit 15 ml getrocknetem THF gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das Produkt säulenchromatographisch mittels HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 49 mg (22 µmol), entspricht 40 % bezogen auf **2**

Summenformel: C₁₀₆H₂₃₂O₉S₆N₃₀

EA (%): C: 55,9 (th. 56,25), H: 11,63 (th. 10,33), S: 7,43 (th. 8,5), N: 18,88 (th. 18,56)

HPLC: Retentionszeit (250 nm): 8 min, Gradient 1, Säule Vydac300-C8

ESI-MS: m/z = 1132,6 g/mol [1/2 (M + 2 H⁺)]

II.2.2.2.2 Darstellung von Dendrimer 5

Zu einer Suspension aus 34 mg (15 µmol) **4** in 2 ml getrocknetem THF wurden 75 mg (750 µmol) Bernsteinsäureanhydrid in 5 ml getrocknetem THF gegeben und die Reaktion

über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde das präzipitierte Rohprodukt mit 15 ml THF und 5 ml Methanol gewaschen und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 32 mg (10 μ mol), entspricht 65 % bezogen auf **4**

Summenformel: $C_{146}H_{272}O_{39}S_6N_{30}$

EA (%): C: 54,32 (th. 53,72), H: 9,2 (th. 8,4), S: 5,02 (th. 5,89), N: 12,12 (th. 12,87)

HPLC: Retentionszeit (215 nm und 250 nm): 11 min, Gradient 1, Säule Vydac300-C8

II.2.2.3 Darstellung von p-Aminophenyl- α -D-galaktopyranosid (pAP-Gal)

100 mg (332 μ mol) p-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid (pNP-Gal) wurden in 10 ml absolutem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 10 mg Palladium auf Aktivkohle wurde die Suspension unter Lichtausschluß für 16 h in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation bei 1000 xg sedimentiert und der produktthaltige Überstand filtriert. Die Aktivkohle wurde mit insgesamt 15 ml absolutem MeOH gewaschen, die organischen Phasen mit dem Überstand vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde anschließend an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 88,5 mg (325 μ mol), entspricht 98 % bezogen auf p-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid

DC (Butanol, Eisessig, H_2O 7:2:1): $R_f = 0,18$

ESI-MS: $m/z = 273,3$ g/mol ($M + H^+$)

II.2.2.4 HPLC-Reinigung

Zur chromatographischen Reinigung der Rohprodukte wurden analytische und semi-präparative C8-Säulen (Vydac 300, Herrenberg) und die in II.1.4 beschriebene HPLC-Anlage verwendet. Die Rohprodukte wurden in einem der Anfangszusammensetzung des Gradienten entsprechenden Gemisch von Wasser und Acetonitril gelöst und über eine 2 ml-Probenschleife auf die entsprechende Säule aufgetragen. Die Laufmittel waren ddH₂O (A) und 70 % Acetonitril (B), jeweils mit 0,1 % TFA. Folgende Gradienten wurden verwendet:

Gradient 1 (analytische Trennung): 3 min 30 % B, 20 min 100% B, 23-28 min 30 % B

Gradient 2 (semipräparative Trennung): 5 min 30 % B, 30 min 100 % B, 35-40 min 100 % B

Die Flußrate betrug 1 ml/min bei analytischen und 5 ml/min bei semipräparativen Trennungen. Die Detektionswellenlängen betragen 250 nm für Disulfidgruppen und 215 nm für Amidbindungen.

II.2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit DNA und Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden benötigte Lösungen autoklaviert oder steril filtriert (0,22 µm-Filter, Millipore, Eschborn). Mit einer Bunsenbrennerflamme am Arbeitsplatz wurde eine keimfreie Zone erzeugt und so eine Kontamination der Reaktionsansätze und Lösungen aus der Luft verhindert.

Beim Umgang mit RNA wurde unter sterilen und RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Pipetten, Reaktionsgefäßständer und Arbeitsoberflächen wurden mit *RNase away* (MBP, San Diego, USA) oder 3 %iger H₂O₂-Lösung behandelt. Die Arbeitsschritte fanden an einer dekontaminierten Arbeitsfläche mit vertikaler Luftzirkulation statt. Doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) wurde vor der Benutzung mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. Die verwendeten Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße waren sterile RNase-freie Einwegware und wurden auch bei der Arbeit mit Bakteriophagen benutzt. Die angewandten Methoden wurden auf der Grundlage von Standardprotokollen (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1991) etabliert und optimiert.

II.2.3.1 mRNA-Isolierung aus Soja (*Glycine max*)

Getrocknete Sojabohnen quollen zunächst über Nacht in einer 1 %igen (w/v) α-D-Melibiose-Lösung. Anschließend wurden sie unter Lichtausschluß bei 28 °C in Gegenwart von 1 % (w/v) α-D-Melibiose in Blumenerde oder auf einfachem Filterpapier kultiviert. Nach täglicher Erneuerung der α-D-Melibiose-Lösung wurden die Sprossen nach 2-3 Wochen geerntet und 150-200 mg Pflanzengewebe einer totalRNA-Isolierung unterzogen. Dazu wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Ultraturrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Nach Zugabe von 500 µl RLT-Lysis-Puffer wurde der Ansatz gründlich vermischt und für 5 min bei 14000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 250 µl 96 %igem Ethanol versetzt und die Probe anschließend auf eine Silicasäule überführt und für

15 sek bei 8000 xg zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend nacheinander mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die Säule durch Zentrifugation für 2 min bei 20000 xg getrocknet und die gebundene RNA mit 40 µl RNase-freiem ddH₂O eluiert.

Aus der totalRNA wurde die mRNA in Gegenwart chaotroper Reagenzien wie Guanidiniumthiocyanat mittels magnetischen Oligo-dT-Oligotex-Partikeln (Qiagen, Hilden) über den 3'-poly-A-Überhang isoliert. Zu 10 µl der totalRNA-Lösung wurden 490 µl RNase-freies ddH₂O, 500 µl OBB-Puffer und 45 µl äquilibrierte Oligotex-Partikel-Suspension gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden die Partikel anschließend in einem Magnetstand separiert, mehrmals mit entsprechenden Puffern gewaschen und die mRNA anschließend in Gegenwart von 70 °C warmem OW2-Puffer eluiert. Anschließend wurde die mRNA durch Ethanolpräzipitation in Gegenwart von Glykogen gereinigt und die Menge nach Resuspendierung in 25 µl RNase-freiem ddH₂O photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei einer Lagerungstemperatur von -80 °C war mRNA bis zu 8 Wochen haltbar.

II.2.3.2 cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Im Anschluß an eine mRNA-Isolierung erfolgte direkt eine cDNA-Erststrang-Synthese. Das virale Enzym Reverse Transkriptase ist nach Anlagerung von Oligonukleotiden an mRNA in der Lage, diese in die entsprechende komplementäre DNA umzuschreiben. Hierfür wurde das *Revert Aid cDNA Synthesis Kit* von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Bei 4 °C wurden 5 µg der isolierten mRNA mit 1 µl Oligo-dT-Nukleotiden oder degenerierten Hexanukleotiden zusammenpipettiert, anschließend für 5 min bei 70 °C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen der mRNA zu zerstören und sofort auf Eis gestellt. Danach wurden je 5 µl Reaktionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl dNTP-Mix dazu pipettiert und für 5 min bei 37 °C bzw. im Falle des Hexanukleotid-Ansatzes bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 µl *M-MuLV*-Reverser Transkriptase wurde der Hexanukleotid-Ansatz erst für 10 min bei 25 °C und anschließend, ebenso wie der Oligo-dT-Ansatz direkt, für 1 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert und die Lösung entweder direkt oder nach Isolierung der DNA-Fragmente für PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden verwendet.

II.2.3.3 Plasmid-DNA-Isolierung

Die klassische Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979).

Die Übernachtskultur eines Bakterienklones, bestehend aus 3 ml 2xYT-Medium, 1 % Glukose und 100 µg/ml Ampicillin, wurde für 10 min bei 4 °C und 4000 xg zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 100 µl eiskalter Plasmid-Präparationslösung I resuspendiert. Danach wurden 200 µl frisch angesetzte Plasmid-Präparationslösung II dazugegeben und 5 min mehrmals invertiert. Nach Bildung einer homogenen Suspension wurden 150 µl eiskalter Plasmid-Präparationslösung III dazugegeben und durch Invertieren gut durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei RT und 20000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und nach einer Alkoholpräzipitation mit 1 µl einer 10 mg/ml RNase-Lösung versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA in reiner Form aus der wäßrigen Phase durch Alkoholpräzipitation erhalten.

Ein moderner Weg der Plasmid-DNA-Isolierung wurde unter Verwendung des *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kits* (peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben eingeschlagen. Dabei wurde Plasmid-DNA aus alkalisch lysierten Zellen an eine feste Phase gebunden und konnte so von übrigen Zellbestandteilen getrennt werden. Es wurde anschließend mit geeigneten Puffern gewaschen bevor die Plasmid-DNA durch Elution mit ddH₂O in gereinigter Form erhalten werden konnte.

II.2.3.4 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus kleinsten Mengen DNA (Saiki *et al.* 1985). Dabei binden kurze Oligonukleotide in angrenzenden Bereichen des gewünschten DNA-Fragmentes und werden durch eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert, so daß die entsprechende DNA-Region neu synthetisiert wird. Insgesamt gliedert sich die PCR in drei Phasen: 1. Denaturierung: Doppelsträngige DNA wird durch Hitze einwirkung in einzelsträngige überführt; 2. Anlagerung: Oligonukleotide binden spezifisch an die komplementäre Sequenz auf der einzelsträngigen DNA; 3. DNA-Synthese: Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert bei Temperaturen um 70 °C die kurzen doppelsträngigen Bereiche in Gegenwart von freien dNTPs und vervielfältigt so das dazwischenliegende DNA-Fragment. Dieser Prozeß wird

iterativ wiederholt, so daß nach 30 Zyklen das gewünschte DNA-Fragment in etwa 2^{30} Kopien angereichert vorliegt.

Es wurde die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) eingesetzt, die bei 72 °C ihr Temperaturoptimum besitzt und bei einer Synthesegeschwindigkeit von etwa 1 kb/min eine Fehlerrate von $2 \cdot 10^{-5}$ aufweist.

Standard-Ansatz:	DNA-Matrix	0,5 – 1 µg
	10x Puffer complete	5 µl
	12,5 mM dNTPs	2 µl
	Oligonukleotid 1	200 pmol
	Oligonukleotid 2	200 pmol
	<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
	H ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprogramm:

Denaturierung:	20 sek	94 °C	} 30 Zyklen
Anlagerung:	30 sek	T _a °C	
DNA-Synthese:	t _s min	72 °C	
DNA-Synthese:	5 min	72 °C	1 Zyklus

Die Anlagerungstemperaturen (T_a) und Synthesezeiten (t_s) waren abhängig von den eingesetzten Oligonukleotiden sowie den Größen der zu erwarteten DNA-Fragmente und sind jeweils bei den Ergebnissen angegeben. Der letzte DNA-Syntheseschritt diente der Vervollständigung zuvor abgebrochener Prozesse.

II.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA- und RNA-Moleküle getrennt, isoliert und identifiziert werden. Zugrunde liegt die Tatsache, daß das Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA-Molekülen negativ geladen ist und diese im elektrischen Feld zur Anode wandern. Durch ein Agarosenetzwerk wird diese Migration verlangsamt und die DNA-Fragmente werden nach ihrer Größe getrennt. Für 1 %ige Agarosegele wurden 500 mg Agarose in 50 ml 0,5xTAE-Puffer zum Sieden erhitzt, auf ca. 50 °C abgekühlt, mit 2 µl einer 10 mg/ml (w/v) Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in einen Gießstand gegossen. Nach dem Aushärten

wurden die zu trennenden Proben mit 6x Beladungspuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung von 130 V für 40-50 min wurde das Gel mit einem UV-Transilluminator analysiert. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente im Gel durch Interkalation des Ethidiumbromids sichtbar.

II.2.3.6 Isolierung von DNA aus Gelen oder DNA-Gemischen

Die Reinigung von DNA aus DNA-Gemischen wurde entweder mittels Alkoholpräzipitation, nach Trennung durch Agarosegelelektrophorese oder aus PCR-Ansätzen mit dem *Concert Rapid PCR Purification System* (Gibco BRL, Eggenheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Aus Agarosegelen wurde die zu isolierende DNA mit Hilfe des *Qiaex II Agarose Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Bei den beiden letzteren Verfahren bindet doppelsträngige DNA in Gegenwart von chaotropen Ionen an eine Matrix, kann so von Oligonukleotiden oder Gelbestandteilen getrennt, gewaschen und durch Zugabe von ddH₂O wiedergewonnen werden.

Bei der Alkoholpräzipitation wurden 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5,4 und 1 Volumen Isopropanol zu der DNA-Lösung gegeben. Anschließend wurde für 15 min bei 4 °C und 20000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 300 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation an der Luft getrocknet.

II.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Konzentrationen von DNA-Lösungen wurden am BioPhotometer oder UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000 bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm, wobei eine Absorption von $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml entsprach. Für eine weitere Reinheitsanalyse wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, das zwischen 1,7 und 1,8 liegen sollte.

II.2.3.8 Enzymatische DNA-Modifizierung

Spaltung von DNA-Molekülen

DNA-Moleküle wurden in einem Endvolumen von 50 µl in entsprechendem Puffer von Restriktionsendonukleasen in herstellerepezifischer Menge an der jeweiligen

Erkennungssequenz gespalten. Die Inkubationszeiten dauerten zwischen 3 h für analytische und über Nacht für präparative Ansätze. Nach einer Hitzeinaktivierung sowie einer Agarosegel-Elektrophorese erfolgte eine Isolierung mit dem *Qiaex II Agarose Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

Ligation

Um gerichtete Endprodukte zu erhalten, wurden der Vektor und das zu insertierende DNA-Fragment über kohäsive Enden, die jeweils durch zwei Restriktionsendonukleasen generiert wurden, ligiert. Der Vektor wurde vor der Ligation durch Inkubation mit CIAP für zweimal 30 min bei 37 °C dephosphoryliert, um Religationen zu vermeiden. In einem typischen Ligationsansatz wurden Vektor und zu insertierendes Fragment in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt und nach Zugabe der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt, eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Alkoholpräzipitation durchgeführt und die DNA in 20 µl ddH₂O aufgenommen, bevor kompetente Zellen damit transformiert wurden.

Parallel dazu wurde jeweils ein Ansatz nur mit dem Vektor ohne zu insertierendes Fragment durchgeführt, um die Religationsrate im Hauptansatz abschätzen zu können.

Ligation in pCR2.1-Vektoren (Invitrogen, Karlsruhe)

Eine zeitsparende Methode ist die ungerichtete Insertion von PCR-Fragmenten, die polymerasenbedingt über 3'-A-Überhänge verfügen, in speziell präparierte pCR2.1-Vektoren. Diese besitzen an beiden Enden des linearisierten Vektors über einen 3'-T-Überhang fixierte Topoisomerasen, die die Insertion des PCR-Fragmentes ermöglichen (Shuman 1994). Die Reaktion wurde nach 30 min beendet. Für die anschließende Einschleusung der DNA in kompetente Zellen wurden 1-3 µl eines Ansatzes verwendet.

II.2.3.9 DNA-Sequenzierung

T7-Sequenzierung

Die T7-Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde die zu untersuchende DNA denaturiert und in vier verschiedenen Reaktionsgefäßen mit einem Cy5-markierten Oligonukleotid, dNTP-Mix und einem kettenabbrechenden Didesoxy-Nukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) versetzt. Die

eingesetzte T7-DNA-Polymerase verlängerte die mit der DNA hybridisierten Oligonukleotide so lange, bis der Vorgang durch die Integration eines Didesoxy-Nukleotids gestoppt wurde. In jedem Reaktionsgefäß wurden so basenspezifische DNA-Stränge unterschiedlicher Länge hergestellt, die anschließend separat auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und von einem Fluoreszenz-Laser detektiert wurden.

Für eine T7-Sequenzierung wurde die DNA-Menge einer 10 ml ÜNK eingesetzt und das *AutoRead Sequencing Kit* (ABP, Freiburg) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Dye-Terminator-Sequenzierung

Genau wie die T7- beruht auch die Dye-Terminator-Sequenzierung, auch Cycle-Sequencing genannt, auf der Didesoxy-Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). In einer PCR wurde die Ziel-DNA in Gegenwart von dNTPs, einer Oligonukleotidsorte sowie allen 4 ddNTPs, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, amplifiziert. Dabei wurde jedes PCR-Fragment individuell mit einem der ddNTPs markiert. Anschließend wurde die Reaktion gelelektrophoretisch getrennt und die jeweiligen DNA-Fragmente mit vier Lasern unterschiedlicher Wellenlänge detektiert.

Sequenzieransatz:		Temperaturprogramm:				
DNA	500 ng	Primärdenaturierung	96 °C	30 sek	} 30 Zyklen	
Big Dye Mix	3 µl	Denaturierung	96 °C	30 sek		
Oligonukleotid	10 pmol	Hybridisierung	T _a °C	30 sek		
H ₂ O	ad 20 µl	DNA-Synthese	60 °C	4 min		

Die Hybridisierungstemperatur (T_a) war abhängig von der Schmelztemperatur (T_s) des eingesetzten Oligonukleotids (Tab. 3).

Oligonukleotid	Sequenz [5'-3']	T _s [°C]	T _a [°C]
lmb3	CAG GAA ACA GCT ATG GAC	49	49
fdseq	GAA TTT TCT GTA TGA GG	45,5	48
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	57,7	55
M13 universal	GTA AAA CGA CGG CCA GTG CCA A	63,6	59

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide mit Schmelz-(T_s)- und Hybridisierungs-(T_a)-temperaturen

Nach der PCR wurde der Sequenzieransatz alkoholpräzipitiert und luftgetrocknet. Die weitere Analyse sowie die Prozessierung der Daten wurden am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie am UKE, Hamburg durchgeführt.

II.2.3.10 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe-Zellen

Basierend auf einem etablierten Verfahren (Hoffman und Winston, 1987) wurde die Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe-Zellen durchgeführt. Dazu wurde eine ÜNK einer Kolonie in 10 ml YPD-Medium mit 100 µg/ml Zeocin angesetzt und die Zellen anschließend bei 4 °C und 1500 xg für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit 500 µl ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 500 µl Breaking Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform und 300 mg sterilen Glasperlen für 5 min intensiv gevortext. Nach dem mechanischen Aufschluß wurden 200 µl ddH₂O hinzugefügt und der Ansatz für 5 min bei 4 °C und 10000 xg zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol und 15 min Inkubation bei 4 °C die DNA präzipitiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 14000 xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden 3 µl einer RNase A-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt und nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach Ethanol-Präzipitation der DNA wurde sie in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

II.2.4 Phagen-Display-Technologie

Die Selektionen von spezifisch bindenden Antikörperfragmenten gegen toxische Proteine wurden mit Hilfe der humanen synthetischen scFv-Bibliothek Griffin1 durchgeführt. Diese Bibliothek besaß eine Vielfalt von etwa $1,9 \times 10^9$ unterschiedlichen scFv, die in dem Phagemid-Vektor pHEN2 (Griffiths *et al.* 1994) vorlagen. Die scFv sind auf genetischer Ebene mit g3 verknüpft, das ein Hüllprotein des M13-Phagen kodiert. Die Sekretion des gebildeten Proteins in den periplasmatischen Raum prokaryontischer Zellen wird von einer N-terminal vorhandenen pelB-Signalsequenz (Keen *et al.* 1984) bestimmt. Am C-Terminus befinden sich sowohl ein myc-Epitop als auch ein Histidin-Hexamer, wodurch die Isolierung und Detektion exprimierter scFv möglich ist. Direkt hinter dem Histidin-Hexamer befindet sich ein Amber-Stopkodon, das von entsprechenden Zelllinien entweder als Glutamat mit dem

Ergebnis eines g3-Fusionsproteins translatiert oder als Translationsabbruchsignal erkannt wird. Im letzteren Fall werden lösliche scFv-Fragmente exprimiert.

Für die Selektion von bindenden scFv muß ein iterativer Kreislauf durchlaufen werden (Abb. 15). Dazu werden scFv-präsentierende Phagen in einem Affinitätschromatographischen Prozeß an immobilisierte Zielproteine gebunden. Überschüssige nichtgebundene Phagen werden entfernt und die übrigen Phagen durch eine Änderung der pH-Bedingungen, kompetitiv oder proteolytisch wiedergewonnen. Durch diese Affinitätsreifung und Variationsmöglichkeiten in der Stringenz werden affine Phagen angereichert und der Hintergrund minimiert. Die angereicherten Phagen werden amplifiziert und eine neue Selektionsrunde gestartet. Nach drei bis vier Runden resultieren durch die erfolgten Anreicherungen hochspezifisch bindende Phagen. Die auf genetischer Ebene kodierte monoklonale Antikörper-Fragmente können als lösliche scFv exprimiert werden.

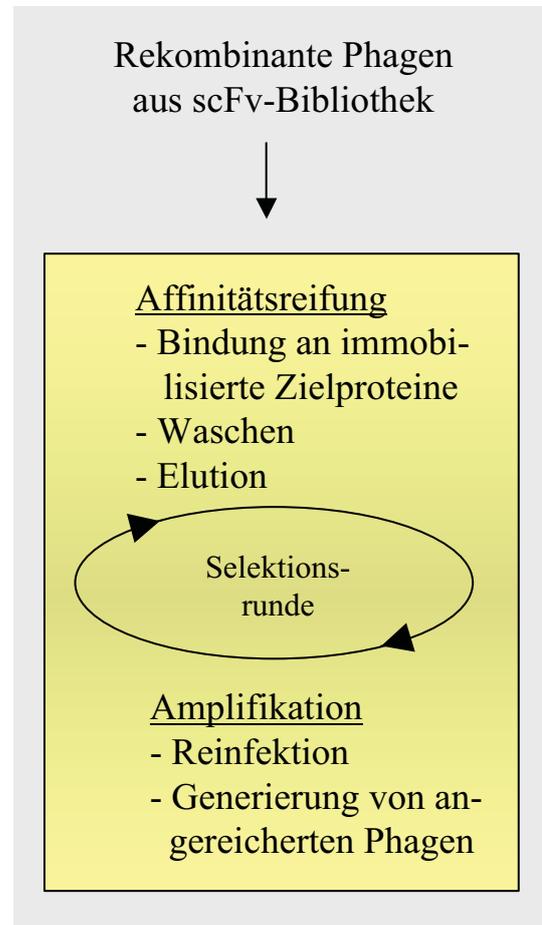


Abb. 15: Selektionsschema beim Phagen-Display

II.2.4.1 Darstellung von M13K07- und KM13-Helferphagen

Zunächst wurden Helferphagen auf einer 1xYT-Platte ausgestrichen und anschließend mit 4 ml einer 42 °C warmen Soft-Agar-Lösung, die 0,5 ml einer logarithmisch wachsenden TG-1-Kultur enthielt, gleichmäßig bedeckt. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C wurden die gewachsenen Kolonien von der Platte in 200 ml 2x YT-Kanamycin-Medium überführt und für weitere 12 h bei 37 °C und 240 rpm kultiviert. Danach wurde die Zellsuspension für 30 min bei 4 °C und 4000 xg zentrifugiert, der Überstand mit 1/5 Volumen PEG/NaCl versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation der präzipitierten Phagen für 30 min bei 4 °C und 4000 xg wurde das Pellet in 10 ml PBS pH 7,4 aufgenommen und erneut für 30 min bei 4 °C und 10000 xg zentrifugiert, um koprazipitierte Zellfragmenten abzutrennen.

Anschließend wurden die Phagen in 30 %iger Glycerollösung in 1 ml Fraktionen bei -20 °C gelagert.

II.2.4.2 Titerbestimmung von M13-Phagen

Die Infektiösität von Phagen ist für die Einstellung des Infektionsverhältnisses (MOI) von elementarer Wichtigkeit und wird über eine Titerbestimmung ermittelt.

In 10 ml 2xYT-Medium wurden TG-1-Zellen inokuliert und bei einer $OD_{600} = 0,5$ zu je 200 μ l aliquotiert. Dazu wurden jeweils 200 μ l einer Helferphagen-Verdünnung von 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} in 2xYT-Medium der entsprechenden Stocklösung sowie einer Nullkontrolle gegeben, vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Davon wurden je 100 μ l auf TYE-Platten mit entsprechendem Antibiotikagehalt ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien konnte der durchschnittliche Titer bestimmt werden. Üblicherweise betrug er zwischen 10^{12} und 10^{13} cfu/ml.

II.2.4.3 Darstellung von scFv-präsentierenden, rekombinanten Phagen

TG-1-Zellen, die Phagemide trugen, wurden in 10 ml 2x YT-AG-Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert, was einer Zellzahl von $4 \cdot 10^8$ Zellen/ml entspricht. Davon wurden 5 ml mit Helferphagen in einem Infektionsverhältnis (MOI, Verhältnis Phagen:Zellen) von 20:1 infiziert. Daraus resultierte eine maximal monovalente scFv-Präsentation auf der Phagenoberfläche. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die nun infizierten Zellen nach Zentrifugation für 10 min bei 2500 xg in 20 ml 2x YT-Medium, das neben 1 % Glucose und Ampicillin auch Kanamycin enthielt, resuspendiert wurden. Durch das zusätzliche Antibiotikum wurde sichergestellt, daß nur Zellen wachsen, die sowohl das Phagemid mit Ampicillin- wie auch den Phagenvektor mit Kanamycinresistenz tragen. Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C und 240 rpm inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 4 °C und 4000 xg zentrifugiert und die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung für 2 h bei 4 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C bei 3000 xg wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml PBS pH 7,4 aufgenommen und erneut für 10 min bei 4 °C und 10.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei 4 °C gelagert, nachdem der jeweilige Titer bestimmt worden war.

II.2.4.4 Amplifikation, Selektion und Reinfektion einer scFv-Antikörper-Bibliothek

Amplifikation

Zunächst wurde ein Aliquot einer eingefrorenen scFv-Bibliothek in 250 ml 2x YT-AG-Medium gegeben und bei 37 °C und 240 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert. Davon wurden 20 ml, entsprechend 10^{10} Zellen und damit die Bibliotheksvielfalt repräsentierend, mit Helferphagen infiziert und die resultierenden rekombinanten Phagen wie unter II.2.4.3 beschrieben hergestellt.

Für spätere Selektionen wurde die Bibliothekskultur für weitere 3 h unter o.g. Bedingungen kultiviert, anschließend zu 1 ml aliquotiert und als 30 %ige Glycerol-Stocklösungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Selektionsrunde

Zunächst wurden proteinaffine Immunoröhrchen (Bindungskapazität 600 ng/cm², Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4 °C unter Rollen mit 4 ml des Zielproteins in einer Konzentration von 20-100 µg/ml in PBS pH 7,4 oder 100 mM Carbonatpuffer pH 8,5 belegt. Anschließend wurde der Überstand entfernt, dreimal mit je 5 ml PBS pH 7,4 gewaschen und mit 5 ml 3 % acetoneextrahiertem Milchpulver in PBS pH 7,4 für 3 h bei RT unter Rollen blockiert. Danach wurde erneut dreimal mit je 5 ml PBS pH 7,4 gewaschen bevor mit 4 ml einer 10^{12} - 10^{13} rekombinante Phagen enthaltenen Lösung in 2 % MPBS pH 7,4 für 30 min unter Rollen und für 90 min stehend bei RT inkubiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Immunoröhrchen jeweils zehnmal mit eiskaltem 0,1 % TPBS pH 7,4 und zehnmal mit eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden bei Verwendung von M13K07-Phagen durch 9 minütige Inkubation mit 1 ml 100 mM TEA eluiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 500 µl 1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 neutralisiert. Mit weiteren 250 µl 1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 wurden verbliebene Reste TEA im Immunoröhrchen neutralisiert. Die vereinigten Lösungen wurden ebenso wie das Immunoröhrchen bis zur Reinfektion bei 4 °C gelagert.

Bei Einsatz von KM13-Phagen wurde durch 15 minütige Inkubation mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung eluiert. Anschließend wurden 4 ml 10 % FKS-haltiges Medium dazugegeben, um Trypsin durch ein Überangebot von Serumproteinen zu neutralisieren. Die KM13-Phagen wurden insbesondere bei späteren Selektionsrunden verwendet, um den durch unspezifisch bindende Phagen hervorgerufenen Hintergrund zu minimieren. Hierbei wurden Eluat und Immunoröhrchen ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Reinfektion

Die Elutionsfraktion einer Selektionsrunde, in der angereicherte Phagen enthalten waren, wurde zur Reinfektion mit 10 ml einer logarithmisch wachsenden ($OD_{600} = 0,5$) TG-1-Kultur versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Ebenso wurden 5 ml der gleichen Kultur in das Immunröhrchen gegeben und damit analog verfahren. Damit wurde gewährleistet, daß auch unspezifisch gebundene, aber möglicherweise affine, rekombinante Phagen in der nachfolgenden Selektionsbibliothek präsent waren. Anschließend wurden die infizierten Zellen vereinigt, 100 µl für eine Titerbestimmung der angereicherten Bibliothek abgenommen und für 10 min bei 2500 xg und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 2 ml 2xYT-Medium resuspendiert, auf zwei großen TYE-AG-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Für die Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} in 2xYT-Medium angesetzt, je 100 µl davon ebenso wie eine Nullkontrolle ohne Phagen auf kleinen TYE-AG-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

II.2.4.5 Vervielfältigung von angereicherten Bibliotheken

Die angereicherte Phagenbibliothek nach einer Selektionsrunde wurde von den großen TYE-AG-Platten nach Zugabe von wenig 2xYT-Medium vorsichtig abgeschabt und 30 min unter Rollen inkubiert. Anschließend wurden mit der Zellsuspension 100 ml 2xYT-AG-Medium zu einer $OD_{600} \leq 0,1$ inokuliert und bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt. Der übrige Teil der abgeschabten Zellen wurde in einer Endkonzentration von 20 % Glycerol zu 1 ml in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

Von der angeimpften Kultur wurden 10 ml bei einem OD_{600} -Wert von 0,5 mit Helferphagen mit einem Infektionsverhältnis von 20 infiziert und für 30 min bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 2500 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50 ml 2xYT-AK-Medium resuspendiert. Die Generierung und Präzipitation der rekombinanten Phagen erfolgte wie unter II.2.4.3 beschrieben.

II.2.4.6 Poly- und monoklonale Phagen-ELISA

Nach jeder Selektionsrunde wurde mit Hilfe von ELISA-Analysen festgestellt, ob eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen stattgefunden hat. Ebenso wurden nach der dritten

Runde aus einzelnen Kolonien rekombinante Phagen nach II.2.4.3 aus einem Kulturvolumen von je 1 ml hergestellt und auf ihre Reaktivität hin untersucht. Dazu wurde das Zielprotein in einem Volumen von 50 µl über Nacht bei 4 °C in den Kavitäten einer ELISA-Platte inkubiert. Danach wurden diese dreimal mit je 250 µl eiskaltem 0,1 % TPBS pH 7,4 und dreimal mit je 250 µl eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen. Nach einer Blockierung mit 3 % Milchpulver in PBS pH 7,4 für 3 h bei RT wurden 50 µl 1:2 Verdünnungen des phagenhaltigen Eluates in 4 % MPBS pH 7,4 in die Kavitäten überführt und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 250 µl eiskaltem 0,1 % TPBS pH 7,4 und dreimal mit je 250 µl eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen, bevor 50 µl einer anti-M13-HRP-Konjugat-Lösung in einer Verdünnung von 1:5000 in 2 % Milchpulver in PBS pH 7,4 in die Vertiefungen gefüllt wurden. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut dreimal mit je 250 µl eiskaltem 0,1 % TPBS pH 7,4 und dreimal mit je 250 µl eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen, anschließend jeweils 100 µl HRP-Detektionslösung in die Vertiefungen pipettiert und die Absorption nach sichtbarem Farbumschlag bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen.

II.2.4.7 Infektion von Non-Supressor-Zelllinien

Zur Expression von löslichen scFv-Fragmenten mußten pHEN2-Vektoren in sogenannte Non-Suppressor-Zelllinien (z.B. HB2151) überführt werden. Diese erkennen das stromabwärts liegende Amber-Kodon TAG als Stop-Codon und brechen dort die Proteinsynthese ab. Suppressor-Zelllinien (z.B. TG-1) dagegen translatieren das Amber-Codon als Glutamin. Zu diesem Zweck wurden je 200 µl einer Kultur von logarithmisch wachsenden HB2151-Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit einer entsprechenden Verdünnung rekombinanter Phagen versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Davon wurden 50 µl auf TYE-AG-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden für die Expression von scFv-Fragmenten eingesetzt.

II.2.5 Proteinchemische Methoden und Expression

II.2.5.1 Herstellung elektrokompenter *E.coli*-Zellen und Transformation

In 200 ml 2xYT-Medium wurden *E.coli*-Zellen inokliert und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,7 kultiviert. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 4000 xg

zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in je 50 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und erneut für 10 min bei 4 °C und 4000 xg zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 10 % Glycerol aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

Eine Transformation von Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode, die eine höhere Effizienz aufweist als klassische Methoden. Elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 90 µl davon mit ca. 10 µl eines alkoholpräzipitierten Ligationsansatzes für 1 min bei 4°C in einer 2mm-Elektroporationsküvette inkubiert. Anschließend wurden durch einen intensiven Spannungsimpuls (2500 V, 5 ms, 201 Ω) die Poren der Zellemban für diesen kurzen Zeitraum durchlässig und so die Aufnahme von DNA ermöglicht. Sofort danach wurde 1 ml 37 °C warmes SOC-Medium dazugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Gehalt ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

II.2.5.2 Herstellung elektrokompenter *P. pastoris*-Zellen und Transformation

Zunächst wurde ein Aliquot des Hefestammes *P. pastoris* GS 115 in einer ÜNK mit 3 ml YPD-Medium bei 29 °C und 240 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. 500 µl davon wurden zu 100 ml YPD-Medium gegeben und dieser Ansatz unter identischen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1500 xg sedimentiert. Es folgten sukzessive Resuspendierungs- und Zentrifugations-schritte der Zellen in 500 ml eiskaltem ddH₂O, 300 ml eiskaltem ddH₂O, 20 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung und abschließend 2 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung. Die nun elektrokompenten Zellen wurden für jede Transformation frisch hergestellt, da sie sehr empfindlich gegenüber Einfrierungsvorgängen waren.

Vor einer Transformation wurden 50 µg des pPICZα-Vektors mit SacI linearisiert, in 50 µl ddH₂O aufgenommen und mit 800 µl der elektrokompenten Zellen in eine eisgekühlte 2mm-Elektroporationsküvette gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde die Elektroporation durchgeführt (1500 V, 12 ms, 481 Ω) und sofort danach 1 ml vorgewärmte 1 M Sorbitol-Lösung dazugegeben. Anschließend wurden 500 µl davon mit 1 ml YPD-Medium versetzt und die Zellen für 1 h bei 30 °C und 240 rpm inkubiert, bevor 200 µl der Zellsuspension auf

YPDS-Zeocin-Platten ausgestrichen wurden. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die ersten Kolonien sichtbar, die erneut auf frischen YPDS-Zeocin-Platten ausgestrichen wurden, um eine tatsächliche genomische Integration des zeocinresistenten pPICZ α -Vektors sicherzustellen.

II.2.5.3 Lagerung transformierter Bakterien- oder Hefe-Zellen

Transformierte *E. coli*- oder *P. pastoris*-Zellen wurden auf entsprechenden Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Gehalt ausgestrichen und waren bei 4 °C 4-8 Wochen haltbar. Für eine Langzeitlagerung wurden Zellen in 30 % glycerolhaltigem Medium mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

II.2.5.4 Proteinexpression in *E. coli*

Exprimierte Antikörperfragmente wurden aufgrund der stromaufwärts liegenden 22 AS großen pelB-Signalsequenz (Keen *et al.*, 1984) in den bakteriellen periplasmatischen Raum transportiert. Auf diesem Wege wurde sichergestellt, daß Disulfidbrücken des Proteins in dem oxidativen Milieu des Periplasmas korrekt gebildet werden, eine Isolierung des exprimierten Proteins durch wenig vorhandene kontaminierende Proteine erleichtert und die Gefahr des proteolytischen Abbaus aufgrund geringerer Präsenz von Proteasen gesenkt werden.

Für analytische Ansätze im 10-50 ml-Maßstab wurde eine Vorkultur von 3-5 ml 2xYT-A-Medium mit einer Kolonie des entsprechenden Klones inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Bei Expressionen im 5 l-Fermenter wurde eine 10 ml ÜNK in 150 ml 2xYT-A-Medium gegeben und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 2-3 weiter fortgefahren. Mit der Vorkultur wurden 100 ml bzw. 3 l 2xYT-A-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml inokuliert und die Zellen bei 37 °C und 220 rpm bzw. im Wasserbad bei 37 °C unter permanenter Luftzufuhr (2200 cm³/min) bis zu einer OD₆₀₀ von 1 wachsen gelassen. Daraufhin wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM die Proteinexpression induziert und die Kultur über Nacht bei 25-30 °C und 220 rpm inkubiert.

II.2.5.4.1 Präparation von periplasmatischen Extrakten

Der Expressionsansatz wurde für einen Zeitraum von 15 min bei 4 °C und 5000 xg zentrifugiert. Die Zellen wurden danach bei analytischen (präparativen) Expressionen in 2 ml

(40 ml) eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und anschließend mit 3 ml (60 ml) eiskaltem 1:4 verdünnten TES-Puffer versetzt, gut vermischt und für 90 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde der Expressionsansatz alle 30 min invertiert. Durch osmotischen Schock wurde dabei die äußere Zellmembran zerstört und der Inhalt des periplasmatischen Raumes, darunter die exprimierten Proteine, freigesetzt. Zelluläre Fragmente wurden durch Zentrifugation bei 6000 xg und 4 °C für 15 min von löslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde aufgrund des EDTA-Gehaltes vor der anschließenden IMAC gegen 5-10 l PBS pH 7,4 über Nacht bei 4 °C dialysiert.

II.2.5.5 Proteinexpression in *P. pastoris*

Der methylotrophe Hefestamm *P. pastoris* (GS115) ist in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das Lösungsmittel kann zur Induktion der Expression genutzt werden, da der verwendete Vektor pPICZ α ein funktionelles Alkoholoxidase-(AOX1)-Gen trägt, das durch homologe Rekombination in das Genom der Hefen integriert werden und so das dort vorhandene defekte AOX1-Gen ersetzen kann. In Gegenwart von Methanol wird das AOX1-Gen transkribiert und damit auch das zu exprimierende rekombinante Protein, welches sich hinter dem AOX-1-Gen befindet. Durch ein vorhandenes Signalpeptid, den α -Faktor, wird das Protein sekretiert und kann so aus dem Überstand isoliert werden.

Als Vorkultur wurden 50 ml BMGY-Medium mit einer Kolonie angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 3-6 bei 29 °C und 240 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 1500 xg zentrifugiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 in Expressionsmedium BMMY (ca. 200 ml) resuspendiert. Während der 72 h dauernden Expression wurde alle 24 h Methanol bis zu einem Gehalt von 0,5 % (v/v) dazugegeben um Verdunstungsverluste auszugleichen. Anschließend wurden die Zellen bei 2000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert, bis der Überstand keine Trübung mehr zeigte. Das Zellpellet wurde verworfen und der gelbliche Überstand auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt bevor er mit 0,22 μ m-Filtern sterilfiltriert wurde.

II.2.5.6 Proteinreinigung mittels IMAC

An einer Ni-NTA-Matrix können aufgrund chelatierender Eigenschaften His-Tag tragende Proteine präzipitiert werden. Dazu wurde dem Dialysat des periplasmatischen Extraktes bzw.

dem sterilfiltrierten Überstand der Hefeexpression Imidazol bis zu einer Endkonzentration von 20 mM und 1 ml Ni-NTA-Matrix hinzugefügt. Die Proteinpräzipitation an der festen Phase wurde unter Rollen über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 700 xg für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand entfernt, die Matrix mit 5 ml 20 mM Imidazol in PBS gewaschen und erneut bei 700 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Matrix wurde in eine kleine Durchflußsäule gegeben und die gebundenen Proteine mit 300 mM Imidazol in PBS eluiert. Dabei wurden Fraktionen zu je 1 ml in Reaktionsgefäßen, in denen jeweils 50 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5 zur Neutralisation vorgelegt war, aufgefangen. Anschließend wurden die Fraktionen mittels eines 12 %igen PAGE-Gels auf ihren Proteingehalt und ihre Reinheit überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, gegen 3 l PBS pH 7,4 dialysiert und abschließend durch eine SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Die Ni-NTA-Matrix wurde nach Gebrauch regeneriert. Dazu wurde zunächst mit 20 ml 0,2 M Essigsäure für 15 min unter Durchmischung inkubiert, anschließend mit 700 xg bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde nacheinander mit 0,5 M NaOH, ddH₂O, 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, ddH₂O, 0,1 M NiSO₄ und PBS pH 7,4 gleichermaßen verfahren. Die Matrix wurde abschließend mit 1 Volumen 20 %igem Ethanol versetzt und bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert.

II.2.5.6.1 Proteinreinigung mittels IMAC an einer FPLC-Anlage

Die Reinigung von scFv-Fragmenten aus Expressionen im 3 l-Maßstab wurde mittels einer Proteinreinigungsanlage (Äkta-Purifier, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt und konnte online durch Detektion des Durchlaufes bei 280 nm verfolgt werden. Der dialysierte periplasmatische Extrakt von 3 l-Expressionen wurde nach Äquilibrierung der Anlage mit 2 ml S-Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min über eine Superflow-Ni-NTA-Matrix gegeben. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Proteine durch Spülen mit 6 ml S-Puffer gefolgt von 8 ml 20 mM Imidazol in S-Puffer wurde gebundenes Protein mit 6 ml 300 mM Imidazol in S-Puffer eluiert und zu Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Die Ni-NTA-Säule wurde mit 5 ml 0,5 M NaOH gereinigt und bei längerer Nutzungspause in 20 % Ethanol gelagert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert, die entsprechenden Fraktionen vereint und gegen 3 l PBS dialysiert.

II.2.5.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Photometrisch

Proteinlösungen wurden am Biophotometer bei 280 nm vermessen. Bei bekannter AS-Sequenz konnte über den errechneten Extinktionskoeffizienten (Gill und von Hippel, 1989) die Konzentration bestimmt werden. Für IgG-Moleküle entsprach üblicherweise ein Absorptionswert von $A_{280} = 1,35$ einer Konzentration von 1 mg/ml.

BCA-Methode

Diese Methode ist eine Weiterentwicklung etablierter Proteinbestimmungen (Bradford 1976, Lowry *et al.* 1951). Sie beruht auf einer farbigen Komplexbildung von Cu(I)-Ionen mit Peptidbindungen im basischen Milieu, der sogenannten Biuret-Reaktion. Durch Verwendung von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) wird die Bildung des farbigen Komplexes stabilisiert. Diese Methode ist schneller durchzuführen und unempfindlicher gegenüber Störsubstanzen wie z.B. Detergenzien.

Zunächst wurden Konzentrationsreihen von 5 µg/ml bis 1 mg/ml mit Lysozym (14 kDa) oder BSA (66 kDa) angesetzt. Je 10 µl der zu untersuchenden Proben in mehreren Verdünnungen wurden ebenso wie die Konzentrationsreihen mit 200 µl einer Lösung aus BCA-Lösung A und BCA-Lösung B (1:50) versetzt, gut vermischt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach Abkühlung auf RT bei 550 nm vermessen. Aus den Werten der Konzentrationsreihe wurde eine Kalibrierkurve erstellt und die Konzentration der Proben daraus bestimmt.

II.2.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Eine effiziente Trennung von Proteingemischen oder Reinheitsbestimmungen von Proteinlösungen wurde durch die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) erreicht. Die dafür benötigten Gele wurden aus einer Stammlösung aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,81 % (w/v) N,N'-Bis-methylenacrylamid als Quervernetzungsreagenz hergestellt. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel variierte je nach Separationsproblem zwischen 7,5 % (w/v) für größere und 15 % (w/v) für kleinere Proteine, im Sammelgel betrug sie 4 % (w/v). Nach Zugabe von 0,075 % (v/v) TEMED und 0,03 % (w/v) APS wurde zuerst das Trenngel, nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen. Nicht sofort verwendete Gele wurden bei 4 °C feucht aufbewahrt.

Zu analysierende Proteinproben wurden mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Ladungspuffer versetzt, 3 min im kochenden Wasserbad inkubiert, kurz zentrifugiert und mit einem Größenmarker aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung (130-160 V, ca. 1,5 h) unter Wasserkühlung wurden die Proteine durch Coomassie- bzw. Silberfärbung oder nach elektrophoretischem Transfer durch Immunofärbung nachgewiesen.

II.2.5.9 Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung

Bei Coomassie-Färbungen können Proteinmengen von 0,1 bis 1 µg detektiert werden. Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in eine Coomassie-Färbelösung überführt. Nach einer Stunde unter Umschwenken auf einem Schüttler wurde das gefärbte Gel erst für 20 min in einer Coomassie-Entfärbelösung inkubiert und anschließend in ddH₂O bis zur Trocknung gelagert.

Silberfärbung

Proteinmengen von 10 ng konnten mit dieser Methode detektiert werden. Nach der Elektrophorese und Abtrennung des Sammelgels wurde das Trenngel für 1 h mit 50 ml Ag-Lösung I fixiert. Anschließend wurde das Gel in 50 ml frisch angesetzte Ag-Lösung II überführt und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem zehnmütigen Waschen mit je 50 ml dH₂O wurde das Gel in 50 ml frisch angesetzter Ag-Lösung IV für 30 min geschüttelt. Danach wurde es kurz mit dH₂O gewaschen und mit 50 ml frisch angesetzter Ag-Lösung V bis zur Bandenerkennung entwickelt. Anschließend wurde das Gel in Ag-Lösung VI bis zur Trocknung gelagert.

II.2.5.10 Trocknung von Polyacrylamidgelen

Gefärbte Polyacrylamidgele wurden mit dH₂O gewaschen und mit Hilfe eines Gel Trocknungssystems (Hofer SI, San Francisco, CA) zwischen zwei befeuchteten Cellophanfolien getrocknet. Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von mehr als 10 % (v/v) wurden vor der Trocknung in einer 2 %igen (v/v) Glycerol-Lösung eingelegt.

II.2.5.11 Elektrophoretischer Proteintransfer (Western-Blot)

Um mittels SDS-PAGE getrennte Proteine weiter charakterisieren zu können, wurden diese unter Anlegung einer konstanten Stromstärke in einer Trans-Blot Semi-Dry Blotapparatur (BioRad, München) aus dem Polyacrylamidgel auf eine proteinaffine Membran übertragen. Dabei wurden PVDF- oder NC-Membranen verwendet. Beide Membranarten wurden für 10 min in Transferpuffer inkubiert, PVDF-Membranen vorher für 5 sek mit Methanol benetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert, bevor es luftblasenfrei auf die Membran, welche sich auf drei Lagen in Transferpuffer äquilibrierten Filterpapieren befand, gelegt wurde. Anschließend wurden drei weitere in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere auf das Gel gelegt, die Apparatur verschlossen und eine konstante Stromstärke von 100 mA für 45-90 min angelegt. Die Dauer des elektrophoretischen Transfers war von der Größe des Proteins abhängig.

II.2.5.12 Immunofärbung

Nach dem elektrophoretischen Transfer (II.2.5.11) wurde die Membran für 2 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde sie für 2 h bei RT mit 5 % Milchpulver in PBS pH 7,4 blockiert. Die Membran wurde danach mit 5 ml PBS pH 7,4 gewaschen und für 2 h bei RT oder 4 °C über Nacht mit einer entsprechenden Antikörperkonzentration in 1 % Milchpulver in PBS pH 7,4 inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min mit 10 ml 0,05 % TPBS pH 7,4 und dreimal für je 5 min mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden die gebundenen primären Antikörper mit einem Antikörperkonjugat in 1 % Milchpulver in entsprechender Verdünnung (1:5000 bis 1:10000) in geeignetem Puffer nach Inkubation für 1 h bei RT mit anschließendem dreimaligen Waschen mit 0,05 % Tween 20-haltigem Puffer und dreimaligem Waschen mit entsprechendem Puffer detektiert. Dazu wurde bei Verwendung eines AP-Konjugates die Membran in 10 ml der Färbelösung (24,5 ml AP-Detektionspuffer, je 250 µl BCIP- bzw. NBT-Lösung) gelegt und unter Lichtausschluss bis zur optimalen Bandenerkennung inkubiert. Abschließend wurde die Membran mit dH₂O gewaschen und getrocknet.

II.2.5.13 Biotinylierung von IgG- und scFv-Antikörpern

Käuflich erworbene anti-Lysozym-IgG (rb) wurden zunächst zur Abtrennung des enthaltenen Azids über eine PD-10-Gelfiltrationssäule (APB, Freiburg) in PBS pH 7,8 umgepuffert. Dazu wurde eine Gelfiltrationssäule mit 20 ml PBS pH 7,8 äquilibriert und anschließend mit 2 ml anti-Lysozym-IgG beladen. Nach Zugabe von 6 ml PBS pH 7,8 wurden Fraktionen zu 1 ml gesammelt und die IgG-Konzentrationen photometrisch nach II.2.5.6 bestimmt. Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereint und bei 4 °C gelagert. Ein Teil wurde als Detektions-IgG mit einer Biotingruppe markiert. Dazu wurden 5 mg (33 nmol) der azidfreien anti-Lysozym-IgG mit 278 µg (= 500 nmol) Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat (Sulfo-NHS-LC-Biotin) in PBS pH 7,8 für 1 h bei RT gerührt und anschließend über eine mit PBS pH 7,4 äquilibrierte Gelfiltrationssäule gegeben. Von den gesammelten Fraktionen wurden wie oben beschrieben die jeweiligen Konzentrationen photometrisch bestimmt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, mit Natriumazid zu einer Endkonzentration von 0,01 % (w/w) versetzt und bei 4 °C gelagert.

Die Biotinylierung von exprimierten scFv geschah nach Dialyse und Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode. Dabei wurde ein 10facher molarer Überschuß von Sulfo-NHS-LC-Biotin in Bezug auf das Protein eingesetzt. Nach 1 h wurde der Ansatz gegen 3 l PBS für 3 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht dialysiert.

II.2.5.14 ELISA

Zunächst wurden 50 µl einer Lösung des nachzuweisenden Proteins oder Fängerantikörpers in PBS pH 7,4 oder Belegungspuffer in die Kavitäten einer Mikrolon F Mikrotiterplatte (Bindungskapazität 600 ng/cm², Greiner) gegeben und der Ansatz bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit 200 µl eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen und die freien Proteinanlagerungsstellen mit 3 % Milchpulver bzw. BSA in PBS pH 7,4 oder in Belegungspuffer für 1,5 h bei RT blockiert. Nach je zweimaligem Waschen der Vertiefungen mit 200 µl eiskaltem 0,05-0,1 %igen TPBS und PBS pH 7,4 wurden 50 µl einer Lösung mit entsprechender Antikörperkonzentration in 1 % Milchpulver in PBS pH 7,4 in die Vertiefungen gefüllt. Die Inkubation bei RT dauerte 2 h, bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde je dreimal mit 200 µl 0,05 % TPBS und PBS pH 7,4 gewaschen, bevor die nachzuweisenden Proteine mit entsprechender Antikörperkonjugatkonzentration (1:5000-1:1000) für 1 h bei RT versetzt wurden. Danach wurde dreimal mit je 200 µl 0,05-0,1 %

Tween 20-haltigem Puffer und Tween 20-freiem Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 100 μ l der vom eingesetzten Antikörperkonjugat abhängigen ELISA-Entwicklerlösung. Dabei wurde bis zum Farbumschlag der Positivkontrolle (grün bei HRP, gelb bei AP) inkubiert und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

III. Ergebnisse

III.1 Modifizierung von Chipoberflächen

Zur Untersuchung der Beschichtungseigenschaften verschiedener Oberflächenmoleküle an Gold standen unterschiedliche elektrische Biochips (Tab. 2) zur Verfügung.

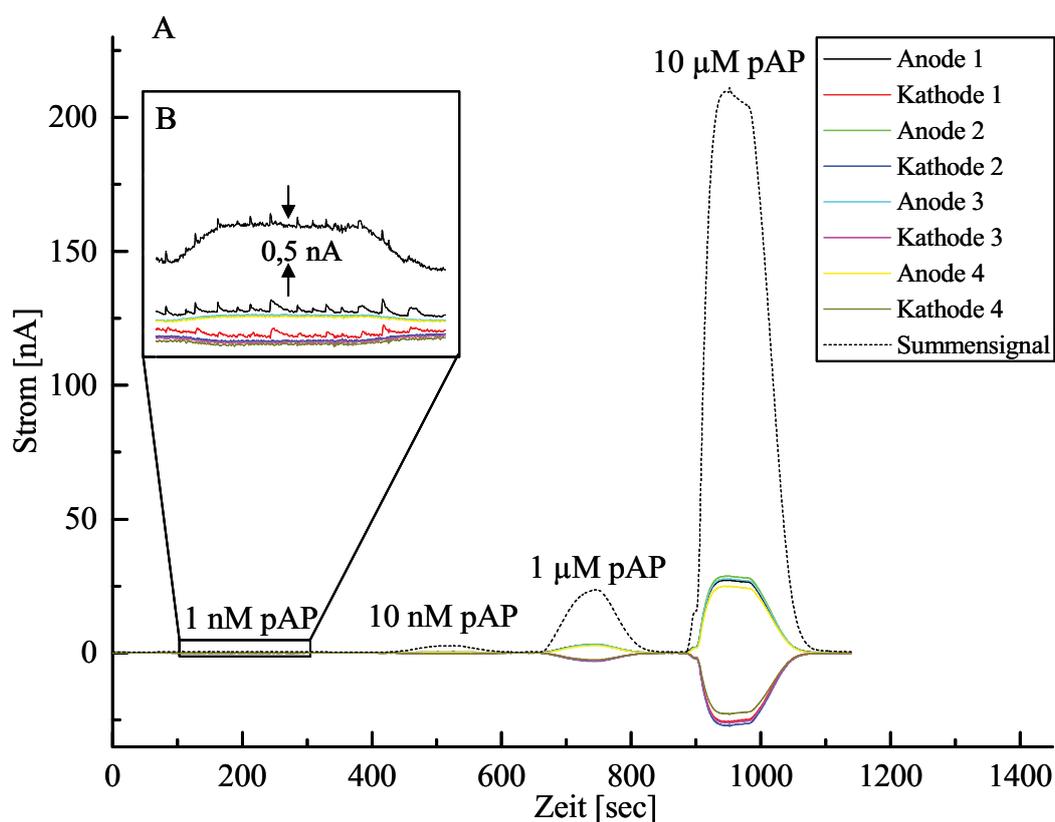
Für eine Verwendung in einem Biosensor muß die Goldoberfläche von Biochips entsprechend funktionalisiert und passiviert werden. Einerseits sollten Affinitätsmoleküle über eine Funktionalisierung in unmittelbarer Nähe zu den Mikroelektroden auf dem Biochip immobilisiert werden und andererseits die unspezifischen Wechselwirkungen von Biomolekülen während eines Assays an der hydrophoben Goldoberfläche unterbunden werden. Da die Goldfläche von Biochips gleichzeitig den elektrochemischen Transduktor darstellt, mußte sie nach der Modifikation für Redox-Mediatoren wie pAP weiterhin zugänglich sein.

III.1.1 Meßbereich verwendeter Biochips

Die Bestimmung des dynamischen Meßbereiches der Biochips wurde nach II.2.1.3 durch Messung verschiedener Konzentrationen der elektroaktiven Substanz pAP direkt an den Goldelektroden ermittelt. Dabei wurden aufsteigend Konzentrationen von 1 nM bis 10 µM pAP in 0,1 M NaCl pH 6,4 vermessen (Abb. 16). Durch die Bildung des Summensignals der insgesamt acht oxidativen und reduktiven Elektrodensignale konnten kleinste Ströme bis zu 0,5 nA eindeutig detektiert werden (Abb. 16B). Bei einigen Biochip-Chargen wurde mit 10 µM pAP knapp die obere Meßgrenze des Potentiostaten von 100 nA erreicht. Sämtliche Zugänglichkeitsmessungen wurden mit 10 µM pAP in 0,1 M NaCl durchgeführt.

III.1.2 Selbstanordnende Schichten organischer Thiolverbindungen

Über thiofunktionalisierte Moleküle konnten die verwendeten Biochipoberflächen leicht modifiziert werden (Pierrat *et al.* 1994, Franchina *et al.* 1999). Durch die Ausbildung von sta-



C

Konzentration pAP [nM]	1	10	1000	10000
Signal [nA]	0,5	2,7	23,5	209,0

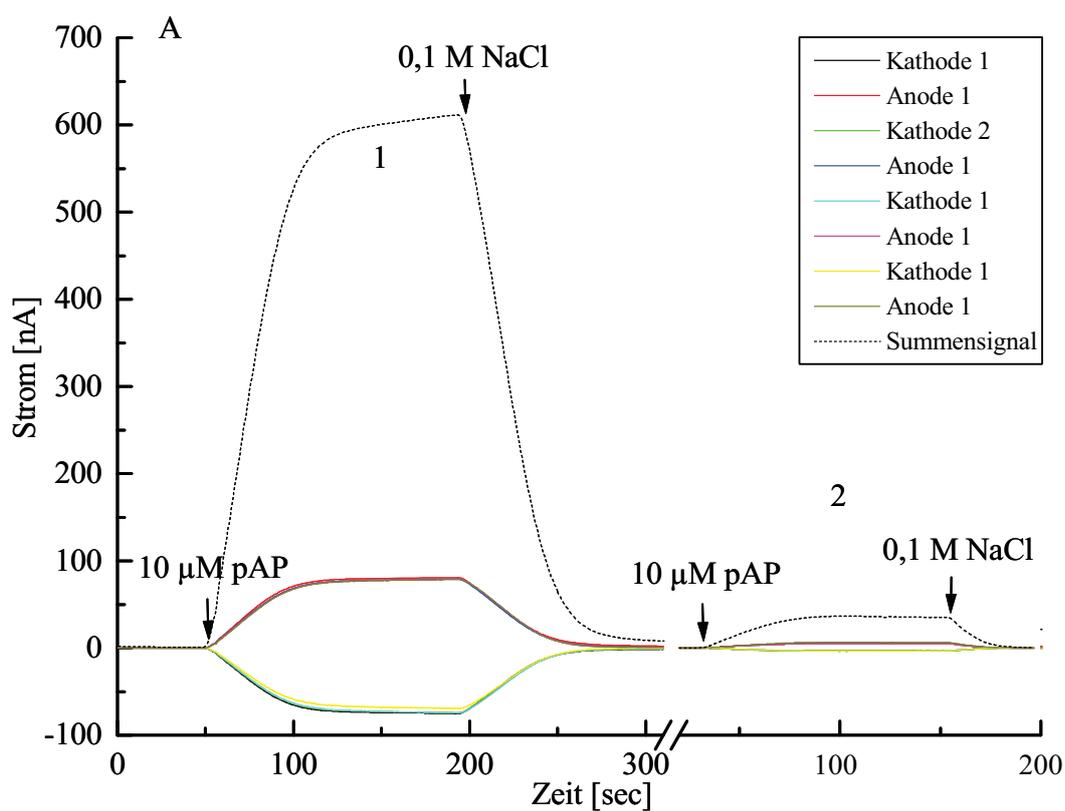
Abb. 16: Dynamischer Meßbereich eines H1-Biochips mit Elektrodenabständen von 1 μm

A: Chronoamperometrische Messung von unterschiedlichen pAP-Konzentrationen in 0,1 M NaCl bei eingestellten Potentialen von +350 mV und -50 mV. Durch Redox-Recycling von pAP an den vier zusammengehörigen Mikroelektrodenpaaren ergaben sich die symmetrischen oxidativen und reduktiven Stromkurven. Nach dem Anstieg des Signals wurde am Scheitelpunkt 0,1 M NaCl über die Mikroelektroden geleitet, so daß das Signal auf die Basislinie zurückkehrt. Zur Auswertung wurde das Summsignal aus den acht Mikroelektrodensignalen gebildet.

B: In der Vergrößerung des Meßsignals von 1 nM pAP ist erst nach Bildung des Summsignals ein deutlicher Stromanstieg zu erkennen.

C: Meßwerte in tabellarischer Form.

bilen Schwefel-Gold-Bindungen wurden monomolekulare Schichten (SAM) von organischen Thiolverbindungen auf der Chipoberfläche gebildet. Als SAM-bildende Reagenzien wurden zunächst 11-Mercaptoundekansäure (11-MUS) und p-Mercaptoanilin verwendet und auf ihre Eignung als nutzbare Oberflächenmoleküle hin untersucht. Die Belegungsdichte der Chipoberfläche wurde durch Messung der Zugänglichkeit der Mikroelektroden bestimmt. 11-MUS wurde in einer Konzentration von 0,5 mM in ddH₂O eingesetzt, nachdem es durch Er-



B

	1	2
Signal [nA]	600	36
Zugänglichkeit [%]	100	6

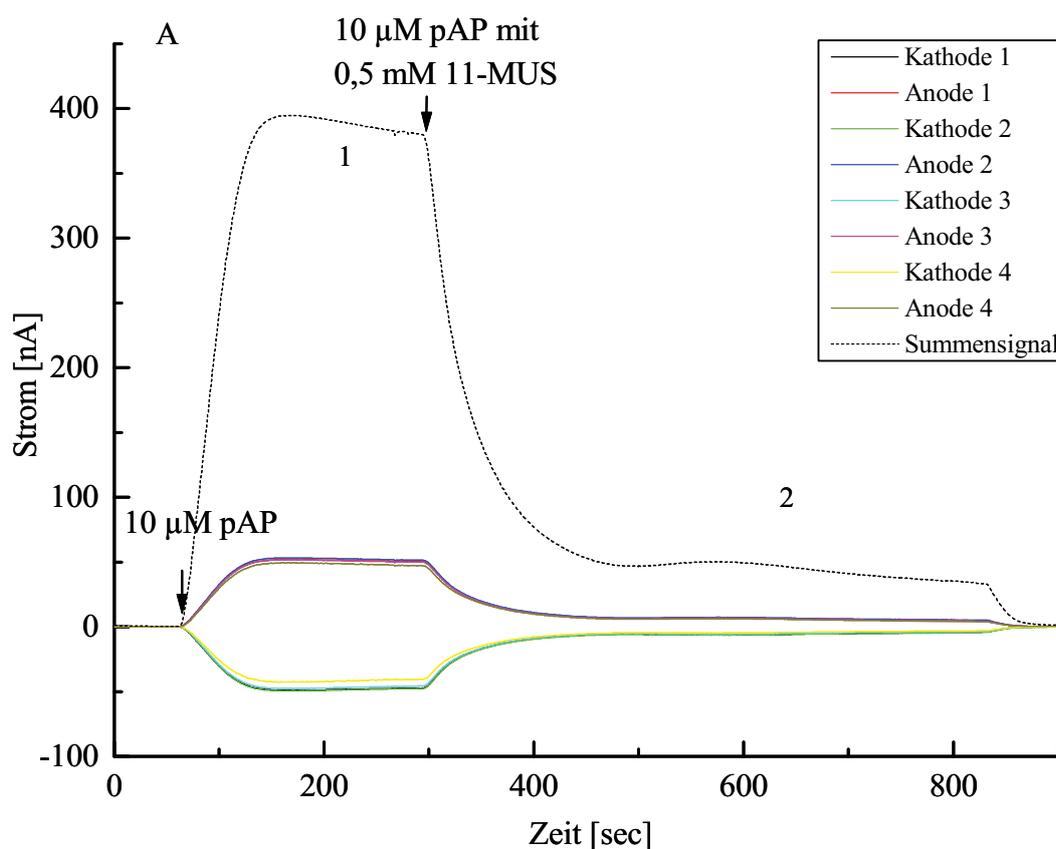
Abb. 17: Exemplarische Zugänglichkeitsmessung nach 11-MUS-Belegung eines H2-Biochips mit Elektrodenabständen von 2 µm

A: Chronoamperometrische Messungen mit 10 µM pAP in 0,1 M NaCl vor (1) und nach (2) der Belegung durch Inkubation mit 0,5 mM 11-MUS in H₂O für 1 h in einer mit H₂O gesättigten Feuchtigkeitskammer. Die Messungen erfolgten bei +350 mV und -50 mV.

B: Meßwerte in tabellarischer Form

wärmen auf 50 °C vollständig gelöst wurde. Für 11-MUS betragen die Zugänglichkeiten nach Belegung der gereinigten Goldoberfläche eines Biochips zwischen 3 % und 20 % (Abb. 17).

Weiterhin wurden mit 11-MUS online-Belegungen durchgeführt. Dazu wurde ein gereinigter Biochip erst mit 10 µM pAP bis zum Sättigungssignal und anschließend mit 0,5 mM 11-MUS in 10 µM pAP in 0,1 M NaCl vermessen. In Gegenwart von 11-MUS nahm das pAP-Signal exponentiell ab und somit die Belegungsdichte zu (Abb. 18). Bereits nach 3 Minuten waren die Elektroden gleichmäßig belegt. Die Zugänglichkeit betrug nach der Belegung 8 %.



B

	1	2
Signal [nA]	390	30
Zugänglichkeit [%]	100	8

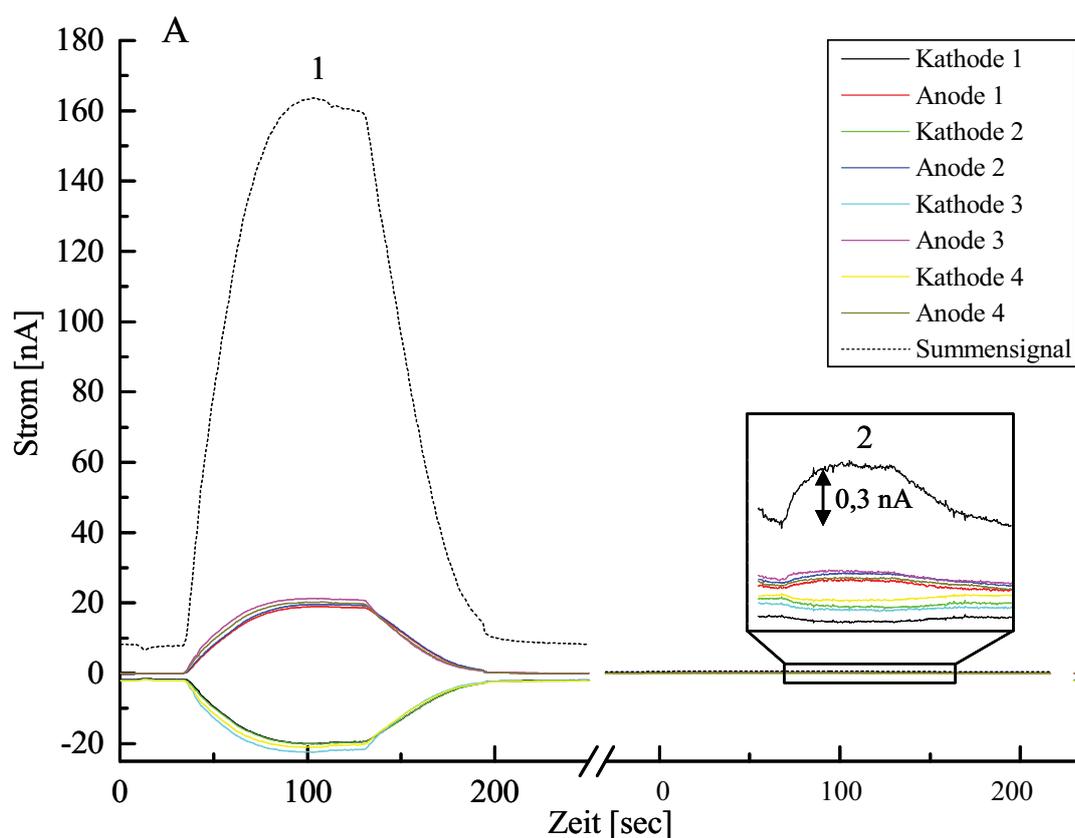
Abb. 18: Online-Belegung eines H1-Biochips mit 11-MUS

A: Das durch pAP generierte Signal (1) nahm in Gegenwart von 0,5 mM 11-MUS durch die zunehmende Belegung der Elektroden exponentiell ab (2). Die Messung fand bei +350 mV und -50 mV statt.

B: Meßwerte in tabellarischer Form

In Abb. 19 ist die Zugänglichkeitsmessung nach Belegung eines Biochips mit einem Gemisch aus p-Mercaptoanilin und 6-Mercapto-1-hexanol dargestellt. Durch den Zusatz des alkoholischen Alkylthiols sollte der Abstand zwischen den aromatischen Molekülen vergrößert (Herne und Tarlov 1997) und dadurch die Wechselwirkungen der π -Elektronen verringert werden um eine partielle Zugänglichkeit der Mikroelektroden zu erhalten.

Die Zugänglichkeit nach Belegung mit p-Mercaptoanilin und 6-Mercapto-1-hexanol betrug noch 0,2 %.



B

	1	2
Signal [nA]	155	0,3
Zugänglichkeit [%]	100	0,2

Abb. 19: Elektrodenzugänglichkeit nach Belegung eines H1-Biochips mit p-Mercaptoanilin und 6-Mercapto-1-hexanol

A: Vor (1) und nach (2) der Belegung eines Biochips mit 2 mM p-Mercaptoanilin und 3,6 mM 6-Mercapto-1-hexanol in H₂O für 1 h in einer Feuchtigkeitskammer wurden die Messungen mit 10 μM pAP in 0,1 M NaCl bei +350 mV und -50 mV durchgeführt.

B: Meßwerte in tabellarischer Form

III.1.3 Modifizierung mit Polymer-Matrices

Durch die Verwendung von dreidimensionalen Matrices mit unterschiedlich porösen Strukturen als funktionalisierte Schichten sollte durch die Vergrößerung der Oberfläche eine multiple Immobilisierung von Affinitätsmolekülen ermöglicht und gleichzeitig die Mikroelektroden geschützt werden.

III. Ergebnisse

Als Matrices wurden hydrophile Biopolymere untersucht, die als Hydrogele exzellente Biokompatibilitätseigenschaften (Frazier *et al.* 2000) besitzen und damit reduzierte unspezifische Adsorptionen aufweisen sollten.

Die Beschichtung von Biochips mit verschiedenen hydrophilen Polymeren (Tab. 4) wurde zunächst durch reine Physisorption durchgeführt. Die so gebildeten Filme wurden optisch überprüft und die jeweilige Permeabilität sowie die Diffusionshemmung bestimmt. Als Polymere wurden Agarose, Chitosan, Dextran, Carboxymethyl-Cellulose (CMC), Carboxymethyl-Stärke (CMS) und poly-L-Lysin als mögliche Kandidaten für die Biochipbelegung untersucht.

Die Polymere poly-L-Lysin und Dextran zeigten eine gute Löslichkeit in ddH₂O wohingegen sich CMS nur mit 0,1 M NaOH und Chitosan nur mit 1 M HCl in Lösung gebracht werden konnten. Bei Chitosan mußten zusätzlich nichtlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt werden, um eine homogene Lösung zu erhalten. CMC wurde leicht erwärmt, um den Quellprozeß zu beschleunigen. Agarose wurde bei 50-60 °C in ddH₂O gelöst und mußte, besonders in höheren Konzentrationen, zügig auf die Chipoberfläche gebracht werden, da es schnell wieder erstarrte (Abb. 20).

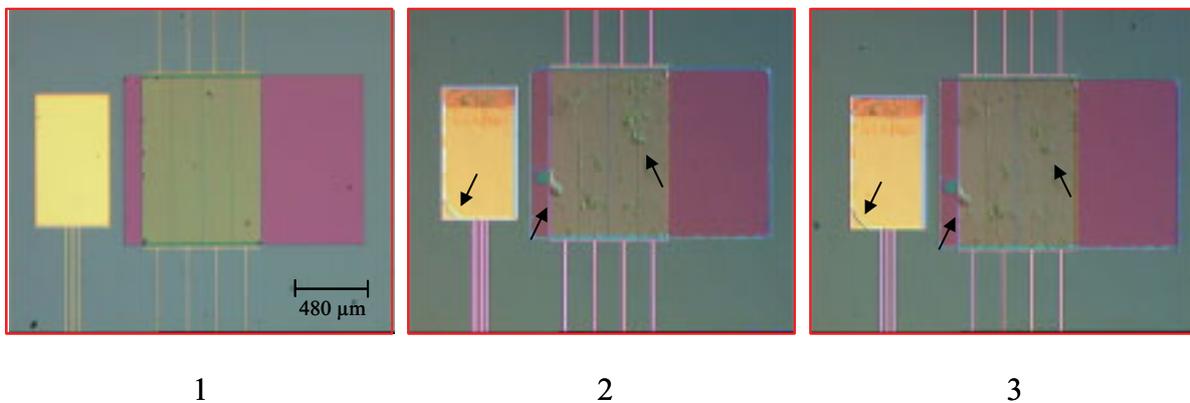
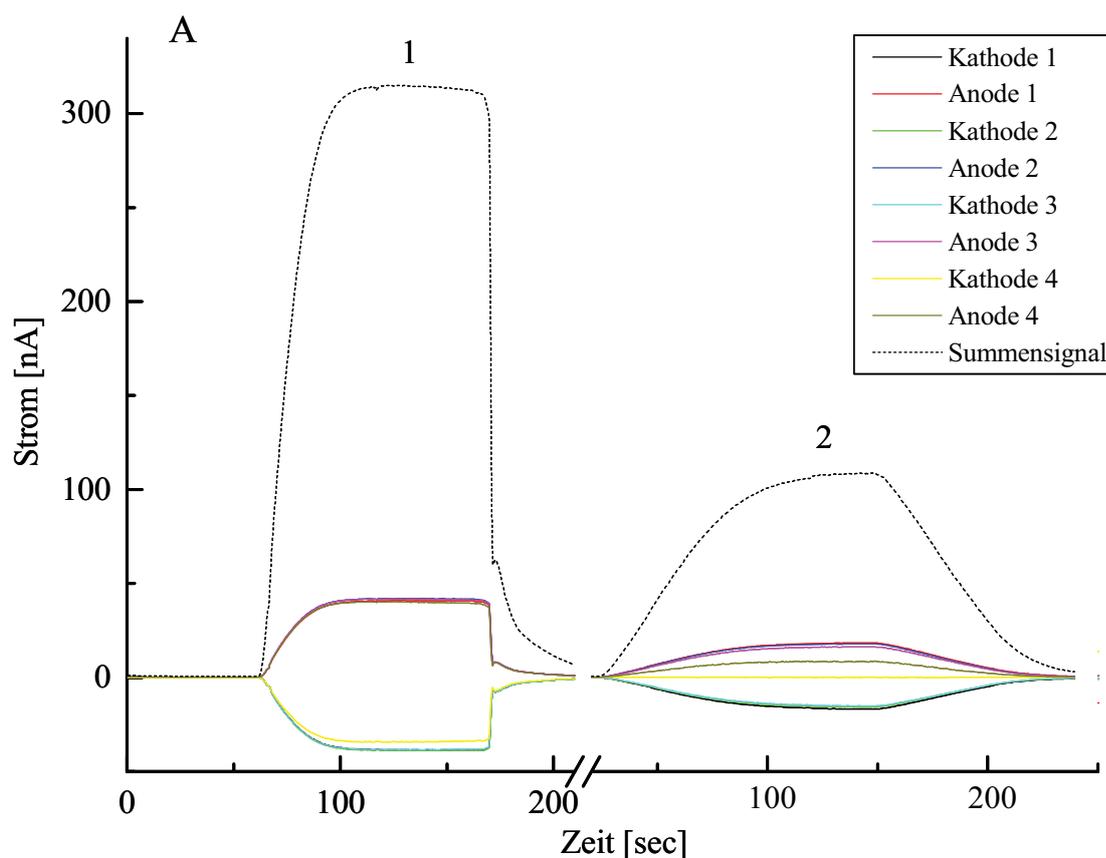


Abb. 20: H₂-Biochip vor (1) und nach (2) Belegung mit 10 ng Agarose sowie nach (3) der pAP-Messung
Die porösen Strukturen der abgeschiedenen Agarose (Pfeile) sind in Bild 2 und 3 gut sichtbar; der Hydrogelfilm war stabil gegenüber einer Flußrate von 170 µl/min.

Durch eine Beschichtung mit dem Hydrogel CMC wurde ein veränderter Kurvenverlauf der pAP-Messung (Abb. 21) hervorgerufen. Der verzögerte Anstieg des Signals zu Beginn der Messung ebenso wie die flache Abnahme nach NaCl-Zuführung auf dem belegten Biochip sind ein Maß für die Diffusionseinschränkung der Redox-Moleküle.



B

	1	2
Signal [nA]	320	109
Zugänglichkeit [%]	100	34

Abb. 21: Zugänglichkeit und Diffusionsverhalten an CMC-belegtem H2-Biochip

A: Ein Biochip wurde vor (1) und nach (2) der Belegung mit 1 µg CMC in H₂O mit 10 µM pAP bei +350 mV und -50 mV vermessen. Aus der flacheren Signalsteigung (2) war die Diffusionshemmung elektroaktiver Moleküle ableitbar.

B: Meßwerte in tabellarischer Form

In Tab. 4 sind die Ergebnisse der Messungen nach Beschichtung mit diversen Biopolymeren zusammengefaßt.

Dabei wurde festgestellt, daß die Zugänglichkeit der Mikroelektroden nach der Beschichtung mit den meisten Polymeren außer bei Agarose und minimal bei Dextran abgenommen hatte. Die durch die Porengröße in der Polymerschicht bedingte Diffusionshemmung der pAP-Moleküle war bei Agarose und CMS am geringsten.

Aufgrund der harschen Löslichkeitsbedingungen wurde in weiteren Experimenten auf CMS und Chitosan als Matrix-bildende Polymere verzichtet.

III. Ergebnisse

	Menge*	Löslichkeit	Zugänglichkeit [%]	Diffusionshemmung [%]
Dextran	10 µg*	H ₂ O	92	83
Chitosan	2 µg*	1 M HCl pH 1	19	87
poly-L-Lysin	2 µg*	H ₂ O	35	77
Agarose	1 µg	H ₂ O, Wärme	63	39
	0,1 µg		71	1
	10 ng		100	0
CMC	11 µg*	H ₂ O	34	90
CMS	1 µg*	0,1 M NaOH pH 13	87	0

Tab. 4: Übersicht Zugänglichkeiten der Mikroelektroden von H-1 und Diffusionshemmungen von pAP nach Beschichtung mit verschiedenen Biopolymeren

Belegung und Messung wurden nach II.2.1.2 und II.2.1.3 durchgeführt. Die Zugänglichkeit der Mikroelektroden wurde anhand der Höhe des pAP-Summensignals vor und nach der Belegung festgestellt. Die Diffusionshemmung von pAP wurde anhand der Summensignalsteigung zu Beginn der Messung des belegten Biochips im Verhältnis zu der des unbehandelten Biochip bestimmt.

*: Außer Agarose waren alle Polymere nach dem Spülen mit ddH₂O unter dem Mikroskop nicht mehr sichtbar.

Für reproduzierbare Beschichtungen wurden funktionalisierte Polymere nachfolgend mit Disulfidgruppen versehen, die zur molekularen Verankerung des Polymers auf der Goldoberfläche dienen sollten.

III.1.3.1 Synthese und Charakterisierung thiomodifizierter Carboxymethyl-Cellulose (t-CMC)

3-3'-Dithiodipropionsäure (DTP) wurde nach II.2.2.1 mit Thionylchlorid in ein Säurechlorid überführt (Abb. 22) und unter Ausbildung einer Esterbindung an Carboxymethyl-Cellulose

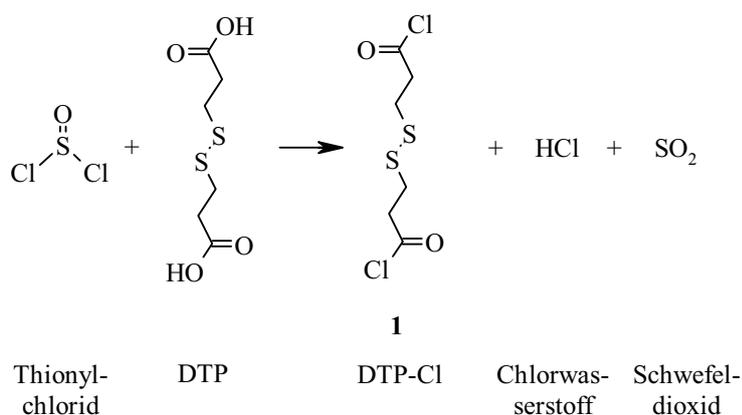


Abb. 22: Schematische Darstellung der Aktivierung von DTP mittels Thionylchlorid

(CMC) gekoppelt (Abb. 23). CMC mit einem Derivatisierungsgrad von 1,2 besaß an 10 Glukose-Einheiten insgesamt 12 Carboxymethylgruppen und lag als Natriumsalz vor. Es wurde vor der Synthese in H₂O gelöst und nach Ansäuerung mit HCl in Gegenwart von Isopropanol gefällt. Die Kopplungsreaktion

III. Ergebnisse

des Säurechlorids an sekundäre Alkoholgruppen wurde in trockenem Pyridin durchgeführt um entstehendes HCl sofort zu neutralisieren (Lewis *et al.* 1963).

Die erfolgreiche Einführung von DTP in das Polysaccharid konnte durch Elementaranalyse bestätigt werden. Danach waren von 100 Glukose-Einheiten sieben mit einer DTP-Gruppe modifiziert.

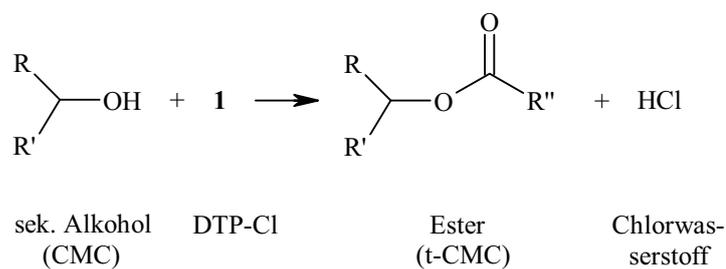


Abb. 23: Schematische Darstellung von t-CMC

Für die weitere Charakterisierung der t-CMC wurden elektrochemische Verfahren angewandt. Bei Permeabilitätsmessungen wurde 1 µl einer 0,1 %igen (w/v) Lösung t-CMC in ddH₂O nach Erwärmung für 5 min bei 50 °C auf einen gereinigten Chip gegeben. Die Zugänglichkeit der Mikroelektroden für pAP betrug zwischen 60 % und 90 %. Die Diffusionshemmung konnte dabei im Vergleich zum unbehandelten Biochip auf 4 % bis 8 % erhöht werden.

Bei Untersuchungen der Bindungskapazitäten von zweidimensionalen 11-MUS- und dreidimensionalen t-CMC-Schichten auf 200 µm-Array-Biochips (Abb. 24) wurde Extravidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Ex-AP) an entsprechend beschichtete Biochips gekoppelt und mit pAPP der Umsatz gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß das modifizierte Hydrogel eine um den Faktor drei höhere Bindungskapazität im Vergleich zur zweidimensionalen Schicht besaß. Das Signal-Hintergrund-Verhältnis betrug beim Hydrogel 6:1 und bei der 11-MUS-Schicht 8:1.

III.1.4 Modifizierung mit Dendrimeren

Eine weitere Möglichkeit der Oberflächenmodifikation von Mikroelektroden zur Bildung verzweigter Strukturen ist die Verwendung von Dendrimeren. Diese baumartig aufgebauten Moleküle besitzen eine definierte Anzahl von funktionellen Gruppen auf ihrer Oberfläche (Tomalia *et al.* 1990, Tomalia 1993). Durch die Einführung von Disulfidgruppen sollte die Immobilisierung eines Dendrimers an Gold ermöglicht werden. In einer zweistufigen Synthese wurden thio- und carboxyl-modifizierte Dendrimere hergestellt (Singh 1998, Shchepinov *et al.* 1997).

III. Ergebnisse

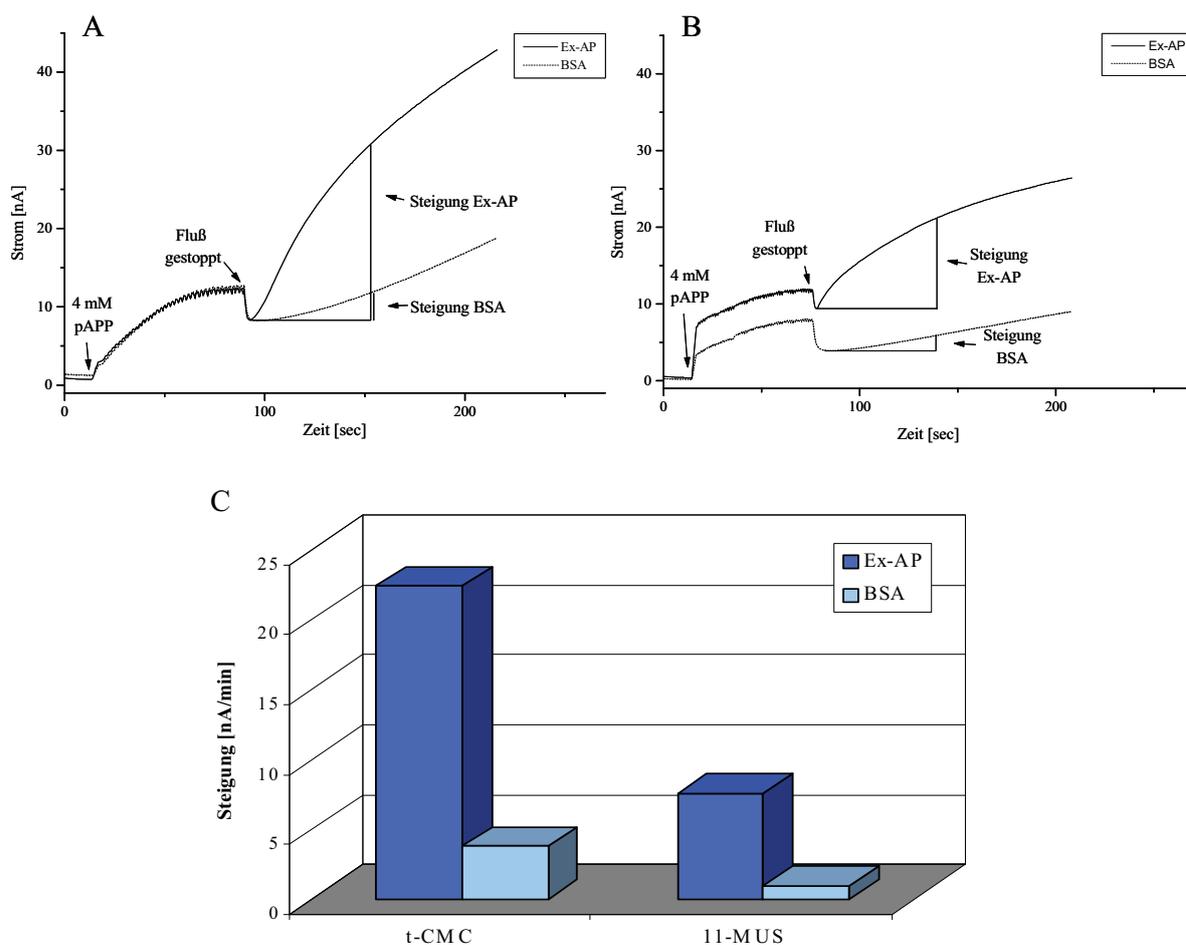


Abb. 24: Vergleich der Bindungskapazitäten von 11-MUS- und t-CMC-beschichteten 200 µm-Array-Biochips. Nach Belegung der Positionen von 200 µm-Array-Biochips mit 1 mM 11-MUS- (A) bzw. 0,1 % t-CMC-Lösung (B) wurden die Säuregruppen mittels PyBOP/DIEA in DMF aktiviert und an je zwei Positionen Ex-AP bzw. BSA gekoppelt. Nach Blockierung mit BSA wurden die Biochips mit 5 mM pAPP bei +350 mV und -50 mV vermessen. Der erste Anstieg bis zum Sättigungsplateau war bedingt durch intrinsisch vorhandenes pAP in der pAPP-Lösung. Nach Erreichen des Plateaus wurde der Fluß gestoppt und die lokale Generierung von pAP im statischen Zustand gemessen. Der Anstieg der jeweiligen Summensignalkurven ist in (C) dargestellt.

III.1.4.1 Synthese von Dendrimer 4

Zunächst wurde nach II.2.2.1.1 thiomodifizierte Aminodendrimere (Abb. 25, 4) gebildet. DTP wurde durch PyBOP in halbmolarem Unterschluß in Gegenwart von DIEA an einer Säurefunktion zu 3-{{3-(1H-1,2,3-benzotriazol-1-yloxy)-3-oxopropyl}-dithio}-propansäure (Abb. 25, 3) aktiviert. Unter Ausbildung einer Amidbindung wurde die aktivierte Säure daraufhin an 4,25-Bis-(3-aminopropyl)-8,21-bis-{{3-[bis-(3-aminopropyl)-amino]-propyl}}-12,17-bis-{{3-[bis-(3-(bis-(3-aminopropyl)-amino)-propyl)-amino]-propyl}}-1,20-diamino-4,8,12,17,21,25-hexaazaocaeicosan (Abb. 25, 2), eine Dendrimerstruktur mit 16 terminalen

III. Ergebnisse

Aminogruppen, gekoppelt. Das zähflüssige Produkt wurde säulenchromatographisch mittels HPLC gereinigt (Abb. 26A) und konnte aufgrund seiner Disulfidbindungen bei 250 nm detektiert werden. Das DTP-modifizierte Dendrimer **4** konnte in einer Ausbeute von 40 % erhalten werden.

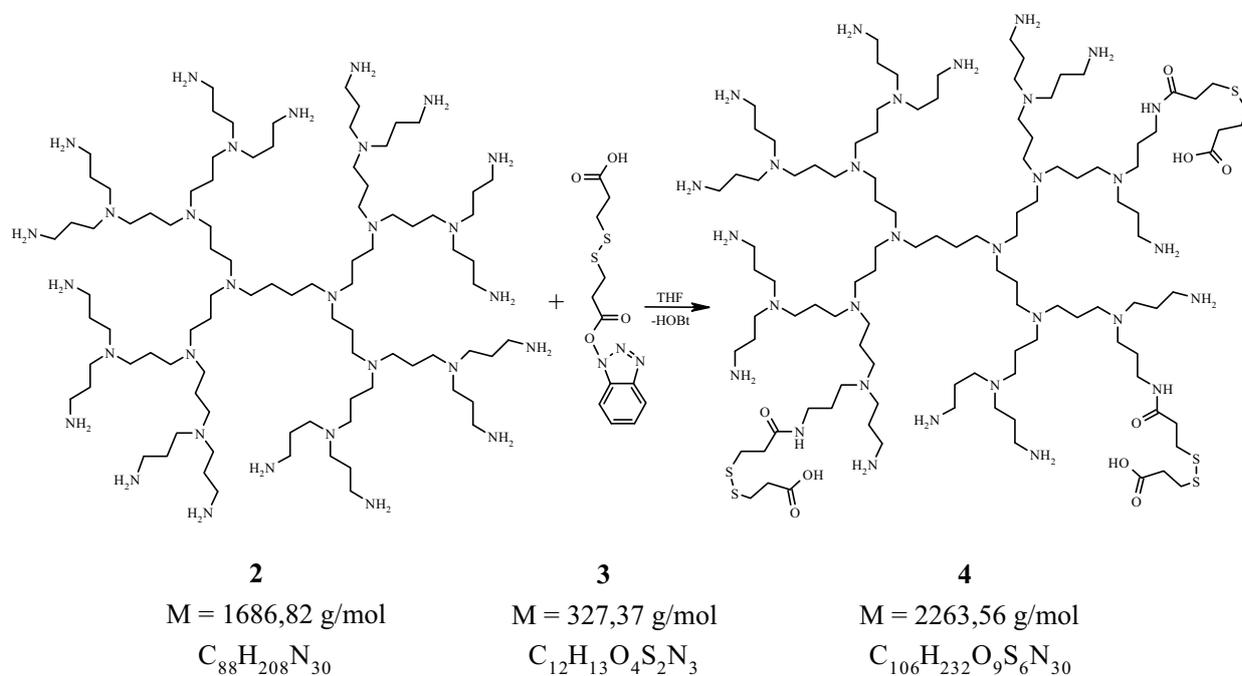


Abb. 25: Schematische Darstellung der Synthese und Strukturvorschlag des thiomodifizierten Dendrimers **4**

Ein aufgenommenes ESI-MS-Spektrum (Abb. 26B) zeigte einen Massenpeak bei $m/z = 1132,6$ g/mol, der dem doppelt protonierten Molekül mit halber Masse entspricht.

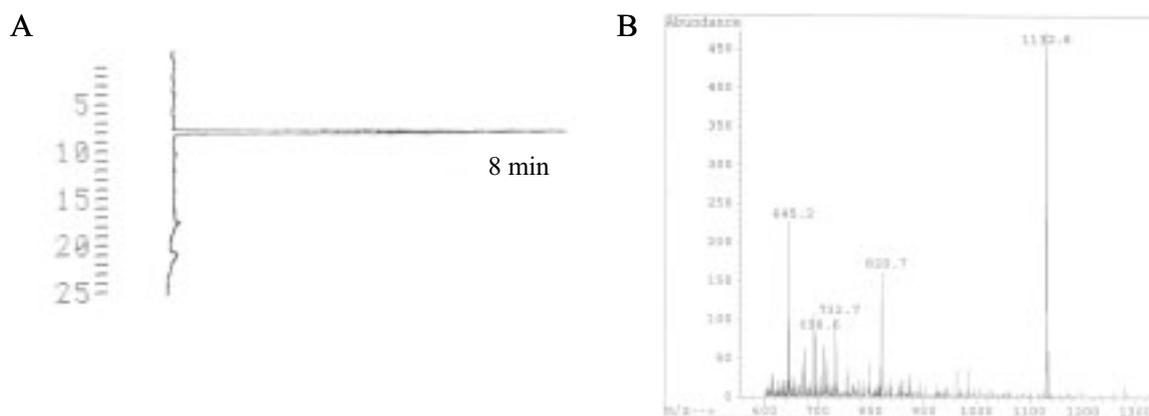


Abb. 26: Charakterisierung von Dendrimer **4**

A: HPLC-Chromatogramm unter Verwendung einer analytischen C18-Säule, Gradient 1 und einer Detektionswellenlänge von 250 nm.

B: ESI-MS-Spektrum von **4**

III. Ergebnisse

Demnach sind drei DTP-Gruppen in das Molekül eingeführt worden, was zusätzlich durch eine Elementaranalyse bestätigt wurde. Eine exakte Mikrostruktur von **4** kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht näher angegeben werden.

III.1.4.2 Synthese von Dendrimer **5**

Im nächsten Schritt wurden die terminalen Amino- in Carboxylgruppen umgewandelt. Dazu wurde das thiomodifizierte Aminodendrimer **4** nach II.2.2.1.2 mit einem Überschuß an Bernsteinsäureanhydrid versetzt. Das zyklische Anhydrid wurde von Aminogruppen nukleophil angegriffen und unter Bildung einer Amidbindung geöffnet (Abb. 27). Das resul-

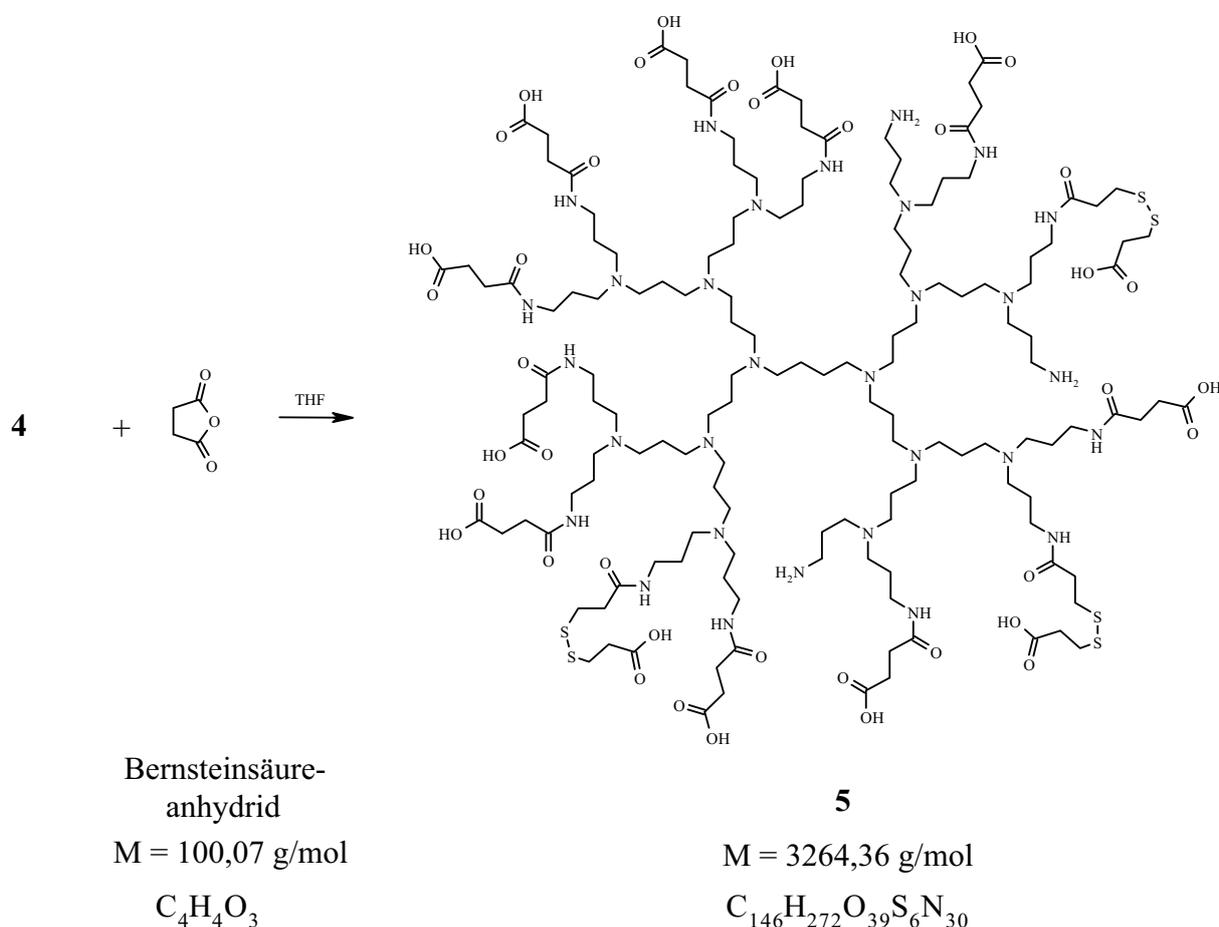


Abb. 27: Schematische Darstellung der Carboxylierung von Dendrimer **4** durch Bernsteinsäureanhydrid und Struktur-vorschlag von Dendrimer **5**

tierende Produkt **5** wurde mittels HPLC analysiert und konnte mit einer Ausbeute von 65 % dargestellt werden. Die erfolgreiche Umwandlung von zehn der dreizehn verbliebenen Amino- zu Carboxylgruppen wurde durch Elementaranalyse bestätigt.

III. Ergebnisse

Das Produkt konnte nicht nur aufgrund der enthaltenen Disulfidgruppen bei 250 nm, sondern durch die neu formierten Amidbindungen auch bei 215 nm detektiert werden (Abb. 28). Deutlich sichtbar ist außerdem der durch den steigenden Acetonitrilgehalt bedingte Anstieg der Basislinie bei einer Detektionswellenlänge von 215 nm.

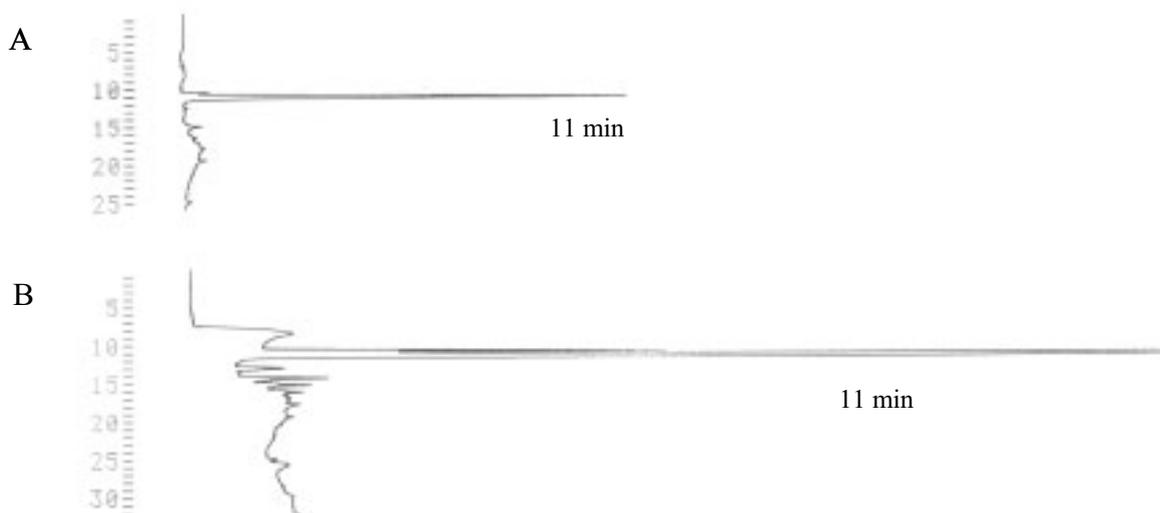


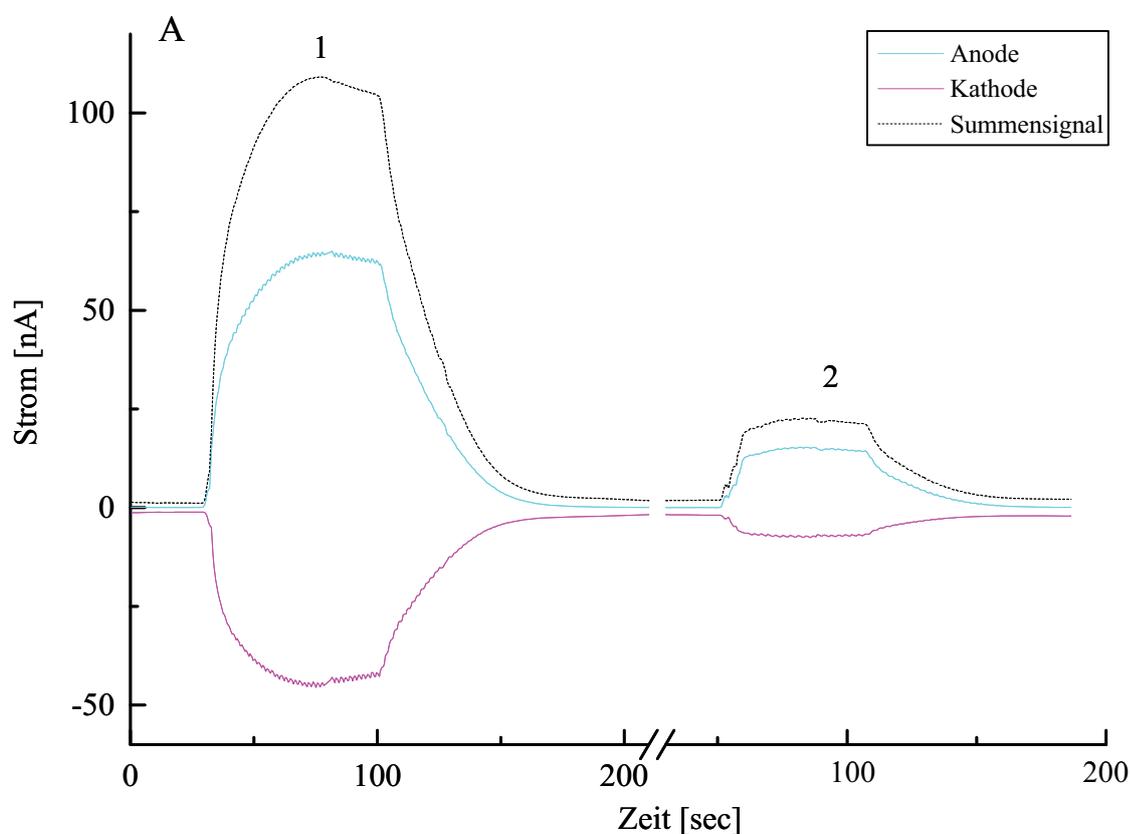
Abb. 28: Charakterisierung von Dendrimer **5**
HPLC-Chromatogramme unter Verwendung einer analytischen C18-Säule, Gradient 1 und Detektionswellenlängen von 250 nm (A) und 215 nm (B)

III.1.4.3 Charakterisierung von dendrimerbeschichteten Chipoberflächen

Die weitere Charakterisierung wurde mittels Zugänglichkeitsmessung von pAP an einem mit Dendrimer **5** beschichteten 400 μm -Array-Biochip durchgeführt (Abb. 29). Die Zugänglichkeit betrug nach der Belegung zwischen 10 % und 40 % und die Diffusionshemmung 15 % bis 30 % im Vergleich zum unbehandelten Biochip.

III.2 Herstellung von Assay-Komponenten

Zur Etablierung eines Detektionssystems im Sandwich-ELISA-Format wurden die dafür benötigten Komponenten hergestellt und überprüft. Für eine Signalverstärkung wurden Reporterenzyme und als spezifische Erkennungskomponenten für die Zielproteine wurden sowohl polyklonale Antikörper als auch monoklonale Antikörperfragmente verwendet.



B

	1	2
Signal [nA]	109	22
Zugänglichkeit [%]	100	20

Abb. 29: Zugänglichkeitsmessung eines 400 μm -Array-Chips nach Belegung mit Dendrimer 5

A: Eine Position eines 400 μm -Array-Biochip wurde vor (1) und nach (2) der Belegung mit 1 mg/ml Dendrimer 5-Lösung in H_2O mit 10 μM pAP bei +350 mV und -50 mV vermessen.

B: Meßwerte in tabellarischer Form

III.2.1 Enzyme

Die Kriterien für den Einsatz eines Reporterenzym sind für optische und elektrochemische Detektionssysteme ähnlich. Grundsätzlich ist eine hohe Aktivität des Enzyms bei pH-Werten im Bereich von 4-9,5 von Vorteil. Im Hinblick auf eine spätere Generierung von Fusionsproteinen sollte es außerdem ein geringes Molekulargewicht besitzen und idealerweise nur aus einer Polypeptidkette bestehen. Das Enzym sollte aus einem einfach zu

III. Ergebnisse

kultivierenden Organismus stammen und in einfachen Systemen rekombinant zu exprimieren sein. Weiterhin sollte die Verfügbarkeit eines Substrates, das erst bei Umsatz durch das Enzym elektrochemisch aktiv wird, gegeben sein. Einige der in Frage gekommenen Hydrolasen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Enzym	Organismus	pH-Optimum	Molekulargewicht [kDa]	Spezifische Aktivität pNP-X ¹ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]	Wechselzahl k_{cat} [$1/\text{min}$] ²	Literatur
Alkalische Phosphatase	<i>E. coli</i>	8,0	94	48	2.250	Tibbitts <i>et al.</i> 1994
Alkalische Phosphatase	<i>Bos taurus</i>	9,5	140	2.000	140.000	Jenkins und D'Ari 1966
β -D-Galaktosidase	<i>E. coli</i>	7,0	464	350	40.750	Craven <i>et al.</i> 1965, Arraj und Campbell 1975
α -D-Galaktosidase	<i>Glycine max</i>	6,5	39,5	296	11.700	Davis <i>et al.</i> 1996
Saure Phosphatase	<i>Aspergillus nidulans</i>	6,3	100	1.960	98.000	Harsanyi und Dorn 1972

Tab. 5: Auswahl Reporterenzyme mit kinetischen Daten

¹) X = -phosphat, - α - oder - β -D-galaktopyranosid; ²) Die k_{cat} -Werte wurden aus der spezifischen Aktivität berechnet unter der Annahme, daß bei den Messungen reine Enzym-Fractionen ohne inaktive Moleküle verwendet wurden.

III.2.1.1 β -D-Galaktosidase

Das Enzym β -D-Galaktosidase (EC 3.2.1.23) besteht aus vier identischen Untereinheiten mit Molekulargewichten von jeweils 116 kDa. Zu Untersuchungen der Oberflächenaktivierung von modifizierten Chipoberflächen wurde β -D-Galaktosidase als zu immobilisierendes Reporterenzym eingesetzt. Durch Modifizierung oder Wahl entsprechender Oberflächenmoleküle kann eine Vielzahl unterschiedlich aufwendiger Kopplungsreaktionen (Abb. 4) in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppe des Zielmoleküls stattfinden. Um die dafür notwendige Chemie auf einem Biochip einfach und reagenzienarm zu gestalten wurden Kopplungsmethoden für Aminogruppen gewählt. Einerseits wurden die terminalen Carboxylgruppen der Oberflächenmoleküle zunächst in aktive Ester überführt und anschließend das zu koppelnde Zielprotein über eine Aminofunktion daran immobilisiert und andererseits epoxy-modifizierte Oberflächen verwendet, die keine weitere Aktivierung benötigen.

III. Ergebnisse

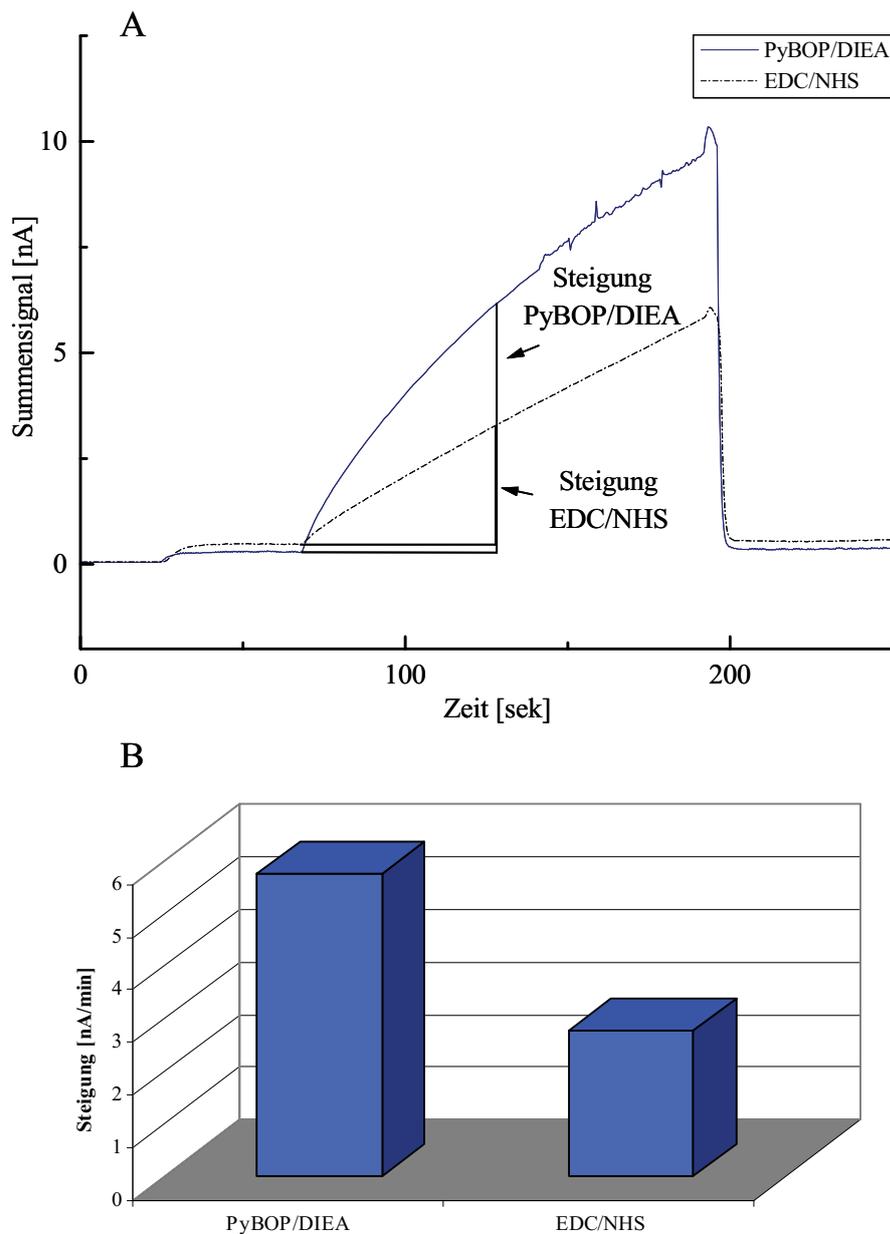


Abb. 30: Aktivierungsvergleich eines SAM aus 11-MUS auf einem 200 μm Array-Biochip

A: Enzymaktivitätsmessung mit 20 μM pAP- β -Galaktopyranosid in PBS pH 7,4 nach Aktivierung von zwei 11-MUS-Schichten auf 200 μm Positionen im organischen (PyBOP/DIEA) oder im wässrigen (EDC/NHS) Milieu und anschließender Immobilisierung von β -D-Galaktosidase. Die Messung fand bei +350 mV und -50 mV statt.
B: Graphische Darstellung der Steigung der Summensignale.

In Abb. 30 ist der Vergleich der Aktivierungsarten von 11-MUS-Schichten auf einem 200 μm -Array-Biochip im organischen und wässrigen Milieu gezeigt. Dazu wurde je eine 200 μm Position eines Array-Biochips mit der gleichen Menge 11-MUS belegt und anschließend mit 3 % BSA blockiert. Danach wurde eine Position mit PyBOP/DIEA in DMF (Coste *et al.* 1990) und eine weitere mit EDC/NHS in Wasser (Staros *et al.* 1986) aktiviert.

III. Ergebnisse

Nach Entfernung der überschüssigen Reagenzien durch Spülen mit eiskaltem PBS wurde β -D-Galaktosidase in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS pH 7,4 auf den aktivierten Oberflächen kovalent immobilisiert. Nach Blockierung der nicht reagierten aktiven Ester mit 3 % BSA in PBS wurde der Biochip in die Meßapparatur eingespannt und nach Äquilibrierung mit PBS mit 20 μ M pAP- β -D-Galaktopyranosid in PBS pH 7,4 vermessen. Die Aktivierung von 11-MUS-Schichten mit PyBOP/DIEA in DMF resultierte in einem um den Faktor 2,1 höheren Signal als mit EDC/NHS in Wasser und wurde fortan im organischen Milieu durchgeführt.

III.2.1.2 Alkalische Phosphatase

Eines der am häufigsten genutzten Reporterenzyme ist das Homodimer Alkalische Phospha-

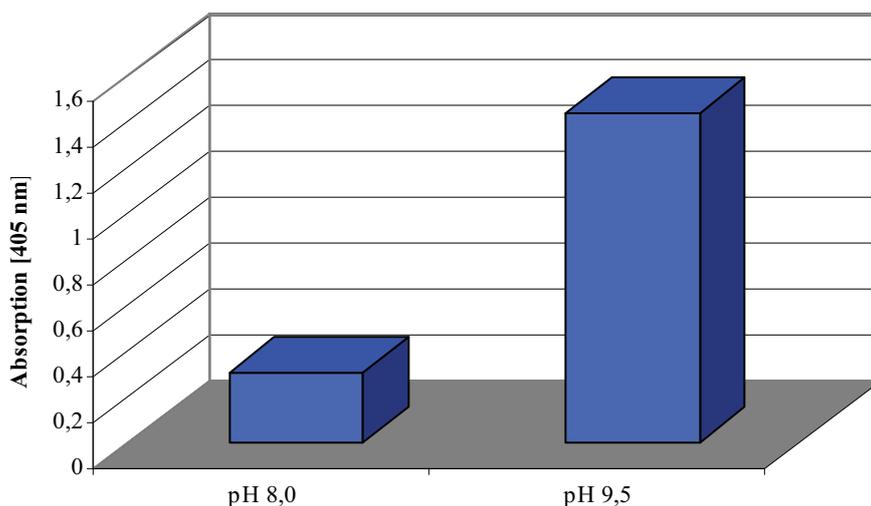


Abb. 31: Abhängigkeit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase vom pH-Wert

Je 5 mg pNPP wurden in 1 ml TBS mit pH-Werten von 8,0 und 9,5 gelöst und 50 μ l davon mit 1 μ l Ex-AP 1:2500 bei 405 nm vermessen.

tase (EC 3.1.3.1). Das verwendete eukaryontische Enzym aus *Bos taurus* besitzt im Gegensatz zum bakteriellen aus *E. coli* eine vielfach höhere Aktivität (Tab. 5). Das pH-Optimum liegt bei 9,5, jedoch ist für eine maximale Ausnutzung des Verstärkungseffektes durch das Redox-Recycling ein möglichst neutraler pH-Wert optimal, da in diesem Fall ein symmetrischer Kurvenverlauf erwartet wird. Um die vier kathodischen Signale, die bei höheren pH-Werten immer geringer werden, noch verwerten zu können, wurden die Messungen mit der Alkalischen Phosphatase bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt. Dabei wurde eine um den Faktor 5 herabgesetzte Aktivität des Enzyms festgestellt (Abb. 31).

III.2.1.3 α -D-Galaktosidase

Als Reporterenzym mit annähernd neutralem pH-Optimum und geringem Molekulargewicht (Tab. 5) wurde eine pflanzliche α -D-Galaktosidase (EC 3.2.1.22) untersucht. Als Exoglykosidasen katalysieren diese Enzyme die hydrolytische Abspaltung von terminalen nichtreduzierenden α -D-Galaktosylresten. Das natürliche Substrat 6-O-(α -D-Galaktopyranosyl)-D-glucopyranose (α -D-Melibiose, Abb. 32) ist ein Disaccharid, dessen Spaltung der Gewinnung von Glukose als Kohlenstoffquelle für den Stoffwechsel dient.

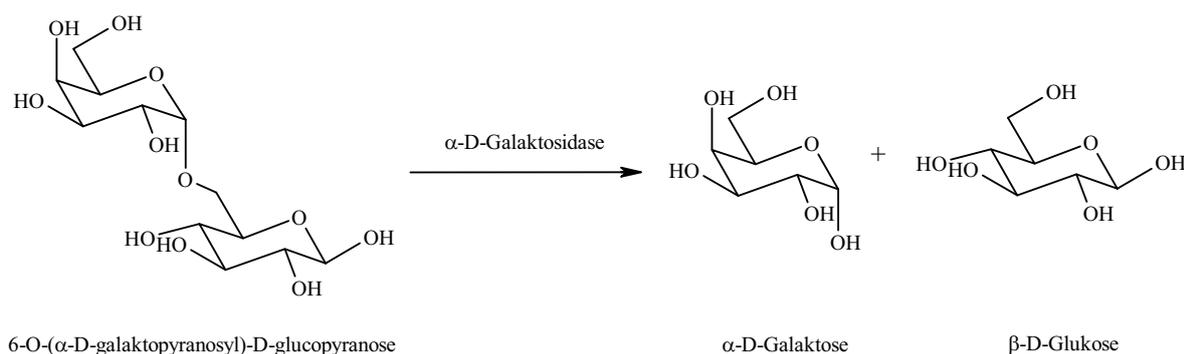


Abb. 32: Enzymatische Spaltung von α -D-Melibiose durch α -D-Galaktosidase

III.2.1.3.1 Klonierung und Expression von α -D-Galaktosidase aus Soja (*Glycine max*)

Das rekombinant exprimierte Enzym α -D-Galaktosidase aus Soja hat eine Größe von 361 AS und ein Molekulargewicht von 39,5 kDa (Davis *et al.* 1996). Soja gehört zu den Leguminosen mit kleiner Schmetterlingsblüte und ist leicht zu kultivieren, die bevorzugten Wachstumsbedingungen sind warmes Klima und ausreichend Niederschläge.

Der Ablauf der Gewinnung des pflanzlichen Proteins durch rekombinante Expression ist in Abb. 33 dargestellt.

Als Expressionssystem für das pflanzliche Enzym eignen sich Hefe-Zellen im Gegensatz zu Bakterien eher, da sie als niedrigere Eukaryonten ebenso wie der Ursprungsorganismus posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen durchführen und so die Ausbeute an funktionell exprimierten Enzymen steigern.

III. Ergebnisse

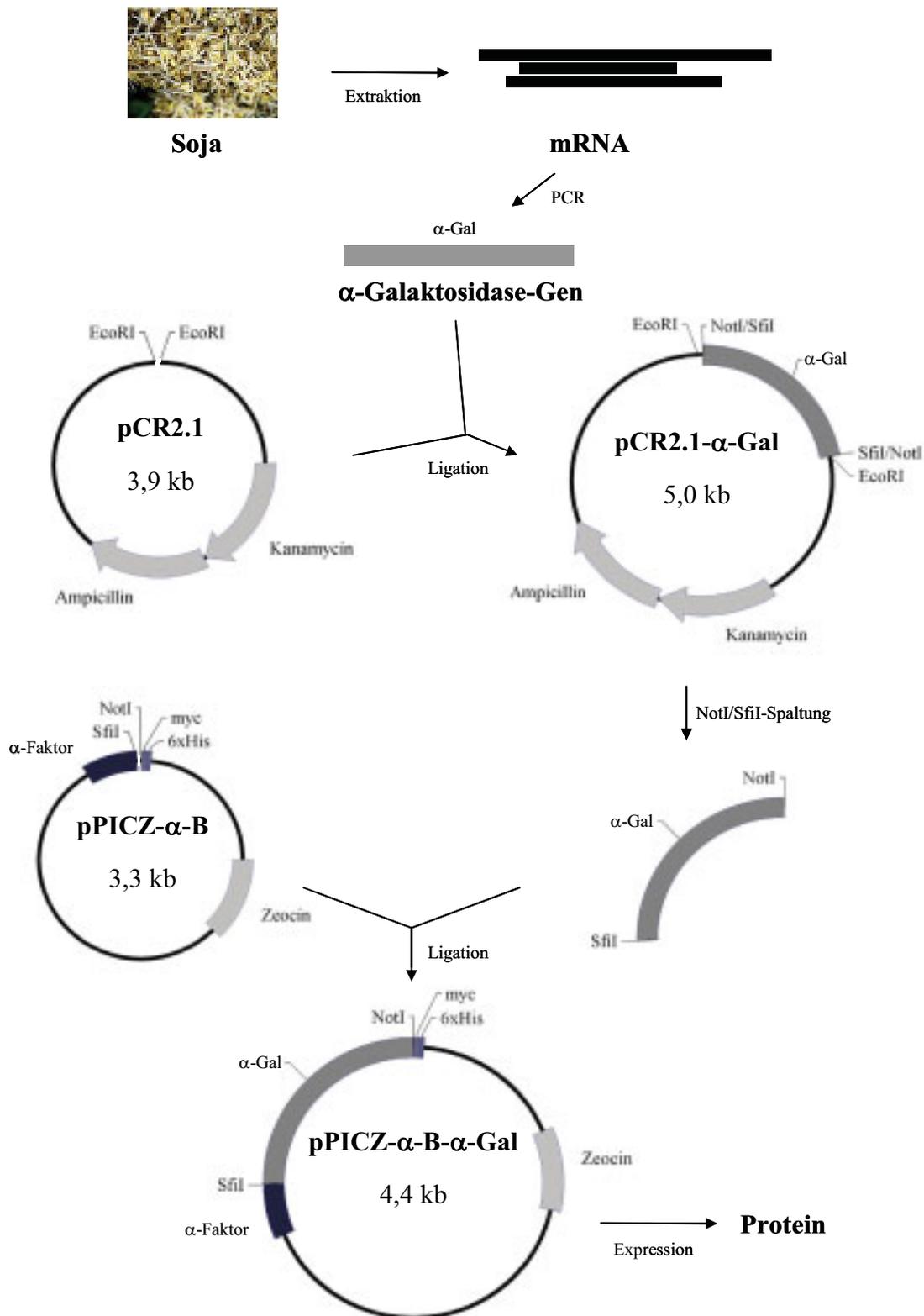


Abb. 33: Klonierungsschema für die Gewinnung von rekombinanter α -D-Galaktosidase

Aus Sojapflanzen wurde nach Kultivierung zunächst die totalRNA, anschließend die mRNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese erfolgte die spezifische Amplifikation des α -D-Galaktosidase-Gens mittels PCR. Dieses wurde erst in einen pCR2.1-Vektor ligiert, bevor es in einen pPICZ- α -B-Expressionsvektor kloniert wurde. Anschließend erfolgte die rekombinante Expression in Hefezellen.

III.2.1.3.2 mRNA-Isolierung aus Soja und cDNA-Synthese

Die getrockneten Sojabohnen wurden über Nacht in 1 %iger α -D-Melibiose gequollen und in Blumenerde oder auf Filterpapier 3 Wochen unter Lichtausschluß wachsen gelassen. Dabei sind von 30 ausgesäten Bohnen nur drei mit Filterpapier als Grundlage gekeimt.

Aus der Soja-Pflanze wurden 150 mg Wurzelgewebe zunächst einer total-RNA-Extraktion mittels des *RNeasy-Kits* (Qiagen, Hilden) unterworfen, die in einer Ausbeute von 601 μ g/ml RNA resultierte. Anschließend wurde daraus die mRNA über Oligo-dT-Magnetpartikel nach II.2.3.1 isoliert. Es konnten dabei RNA-Konzentrationen von 76 μ g/ml erreicht werden, die entweder sofort weiterverwendet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Zur Herstellung von stabilerer cDNA wurde anschließend eine Erststrangsynthese mit Hilfe des *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kits* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach II.2.3.2 durchgeführt. Bei dieser PCR wurde eine virale Reverse Transkriptase eingesetzt, die in der Lage ist, mRNA nach Anlagerung von Oligonukleotiden als Matrix für eine cDNA-Synthese zu nutzen.

Die verwendeten Oligonukleotide waren dabei Oligo-dT-Nukleotide und degenerierte Hexamere, um einen möglichst großen umgeschriebenen Anteil cDNA erhalten zu können.

III.2.1.3.3 Amplifikation und Klonierung von α -D-Galaktosidase-cDNA

Nach der unspezifischen cDNA-Synthese wurde mit 3 μ l der Lösung zur Kontrolle der Qualität der cDNA diese durch PCR mit den Oligonukleotiden GAPDHleft und GAPDHright ($T_a = 54\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_s = 1\text{ min}$) auf Anwesenheit eines Gens für ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Glykolyse, Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), überprüft. Anschließend wurde mit den als positiv identifizierten Proben eine PCR nach II.2.3.4 mit den α -D-Galaktosidase-spezifischen Oligonukleotiden SojN100% und SojC100% ($T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_s = 2\text{ min}$) durchgeführt (Abb. 34). Diese Oligonukleotide wurden derart gestaltet, daß das Amplifikat eine um 180 bp kürzere Sequenz im Vergleich zum nativen Enzym aufwies, da bereits eine entsprechend verkürzte α -D-Galaktosidase in Hefen erfolgreich rekombinant exprimiert wurde (Davis *et al.* 1996).

Das DNA-Fragment wurde mit dem *Concert Rapid PCR Purification System* (Gibco BRL, Eggenstein) zur Abtrennung von überschüssigen Oligonukleotiden und Enzymen gereinigt und anschließend eine PCR mit den Adapteroligonukleotiden SojbackN und SojCback ($T_a = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_s = 2\text{ min}$) durchgeführt, die der Einführung einer NotI-Schnittstelle am N-terminalen

III. Ergebnisse

Ende und einer SfiI-Schnittstelle am C-terminalen Ende dienten und für eine gerichtete Insertion in den Hefe-Expressionsvektor pPICZ α -B benötigt wurden.

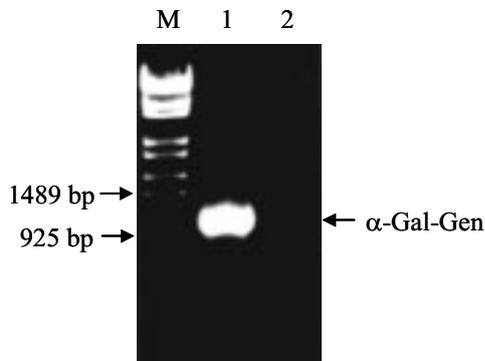


Abb. 34: Gelelektrophoretische Analyse der cDNA mittels PCR

Das resultierende DNA-Fragment aus einer PCR mit den genspezifischen Oligonukleotiden SojN100% und SojC100% und cDNA-Matrizen aus Oligo-dT-(1) oder Hexamer-(2)-Erststrangsynthesen wurde in einem 1 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung analysiert und besaß die für das α -D-Galaktosidase-Gen erwartete Größe von 1,1 kb.

Anschließend wurden 2 μ l der Lösung für eine Subklonierung des PCR-Produktes in einen pCR2.1-Vektor verwendet. Dieser Vektor ist Teil des *TA-Cloning-Kits* (Invitrogen, Karlsruhe) und derart präpariert, daß PCR-Produkte über ihren durch die *Taq*-Polymerase entstehenden A-Überhang an beiden Enden einfach und schnell in diesen Vektor ligiert werden können. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben angesetzt und dauerte 30 min. Danach wurden elektrokompente *E. coli*-Zellen (Top10) mit 1 μ l dieser Reaktionslösung

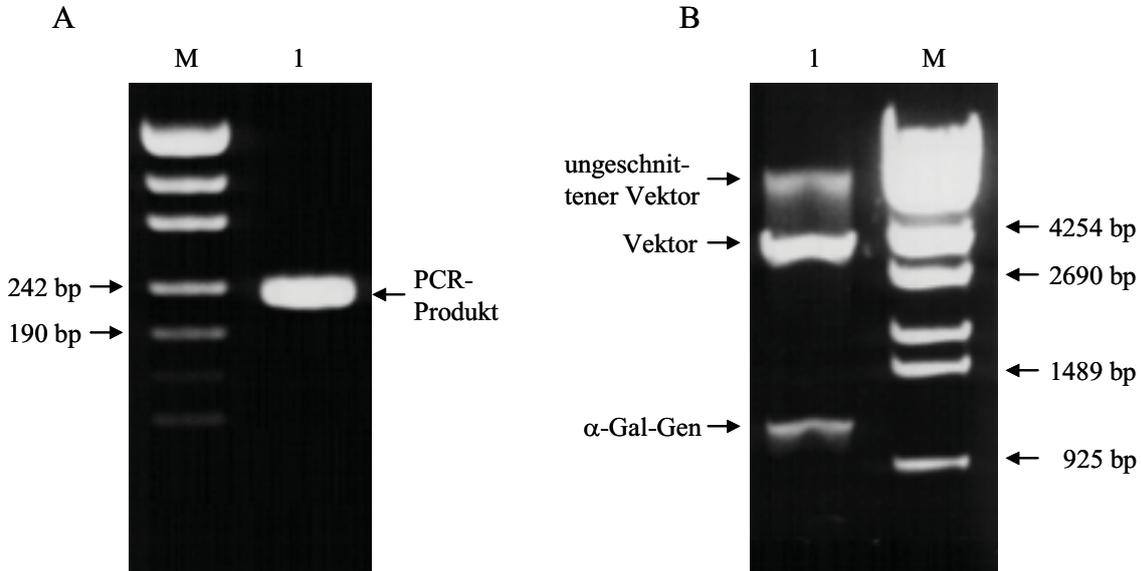


Abb. 35: Analyse von pCR2.1-Vektoren auf erfolgreiche Insertion des α -D-Galaktosidase-Gens im 1 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung

A: Auftragung von 10 μ l eines PCR-Ansatzes mit genspezifischen Oligonukleotiden SMvor und SMback. Zur Größenabschätzung wurde Marker 23 (M) verwendet. Das PCR-Produkt (1) zeigte die erwartete Höhe von 235 bp. B: Gelanalyse nach 3 h Inkubation vektorierter DNA mit EcoRI. Das Restriktionsmuster (1) zeigt neben dem ausgeschnittenen α -D-Galaktosidase-Gen bei 1,1 kb den dazugehörigen Vektor bei 3,9 kb sowie den linearisierten Vektor bei 5,0 kb. Als Marker (M) wurde Marker 16 eingesetzt.

III. Ergebnisse

nach II.5.1 transformiert und auf Ampicillin-Platten ausgestrichen. Mit den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden ÜNK im 15 ml-Maßstab angesetzt und daraus die Plasmid-DNA mit dem *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kits* (peqlab, Erlangen) nach II.2.3.3 extrahiert. Anschließend wurde sie mittels PCR und dem Restriktionsenzym *EcoRI* untersucht. Dazu wurden die genspezifischen Oligonukleotide SMvor und SMback ($T_a = 54\text{ °C}$, $t_s = 1\text{ min}$) verwendet und im Agarosegel überprüft (Abb. 35A). Parallel dazu wurde aus isolierter Plasmid-DNA das insertierte Fragment mit *EcoRI* herausgeschnitten (Abb. 35B).

Eine Sequenzierung mit den vektorspezifischen Oligonukleotiden M13-universal und -reverse identifizierte die α -D-Galaktosidase-tragenden Klone eindeutig. Anschließend wurde die entsprechende DNA sukzessive mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* gespalten, das Produkt mit einer Größe von 1083 bp aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und mittels *Qiaex II Agarose Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) nach II.2.3.6 isoliert. Parallel dazu wurde der Hefeexpressionsvektor pPICZ α -B ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* gespalten und nach Dephosphorylierung durch CIAP analog gereinigt (Abb. 36). Anschließend wurde das DNA-Fragment nach II.2.3.8 in den Vektor ligiert und elektrokompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α) mit dem isolierten Ligationsprodukt transformiert.

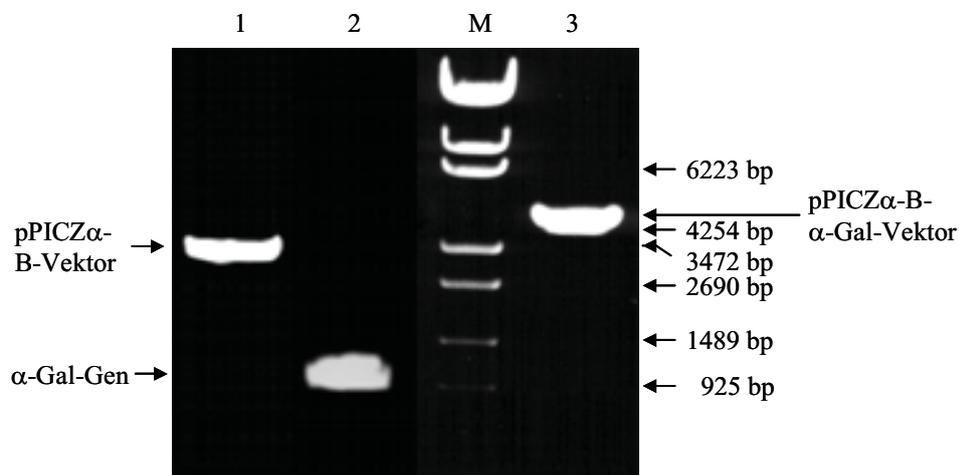


Abb. 36: Analyse der Klonierung des Expressionsvektors

Vor der Ligation wurden Vektor (1; 3,3 kb) und einzufügendes Fragment (2; 1,1 kb) mit *NotI* und *SfiI* geschnitten und nach Dephosphorylierung des Vektors durch ein 1%iges Agarosegel analysiert. Nach Ligation und Transformation wurde die Plasmid-DNA gewachsener Klone mit *NotI* linearisiert (3; 4,4 kb) und durch Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel die Größe bestimmt. Zur Abschätzung wurde Marker 16 (M) aufgetragen.

Nach Ausstrich des Elektroporationsansatzes auf Zeocin-Platten wurden die gewachsenen Klone mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide SMvor und SMback ($T_a = 50\text{ °C}$,

$t_s = 1$ min) auf eine erfolgreiche Insertion hin überprüft. Durch Sequenzierung wurde die fehlerfreie Integration des α -D-Galaktosidase-Gens in den Expressionsvektor bestätigt.

III.2.1.3.4 Expression von α -D-Galaktosidase in *P. pastoris* und Reinigung

Im Anschluß an die Klonierung des Expressionsvektors wurde eine 50 ml-ÜNK eines singulären Klones mit 25 μ g/ml Zeocin angesetzt und die Plasmid-DNA klassisch nach II.2.3.3 isoliert. Dieser Ansatz wurde für 7 h mit 10 μ l SacI linearisiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die präzipitierte DNA in 50 μ l ddH₂O aufgenommen und elektrokompente *P. pastoris*-Zellen (GS115) nach II.2.5.2 damit transformiert. Die nach Ausstrich der Zellen gewachsenen Klone wurden nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C erneut auf Zeocin-Platten ausgestrichen. Die daraufhin gewachsenen Klone wurden mittels PCR auf die erfolgreiche Insertion des gesamten DNA-Abschnitts hin überprüft. Dazu wurde nach II.2.3.10 die genomische DNA einzelner Klone isoliert und mit 2 μ l der DNA-Lösung eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'-AOX und 3'-AOX ($T_a = 55$ °C, $t_s = 2,5$ min) durchgeführt.

Die Expression eines ausgewählten Klones wurde nach II.2.5.5 in einem Kulturvolumen von 200 ml durchgeführt. Während der Expression wurde der pH-Wert alle 24 h gemessen (Abb. 37).

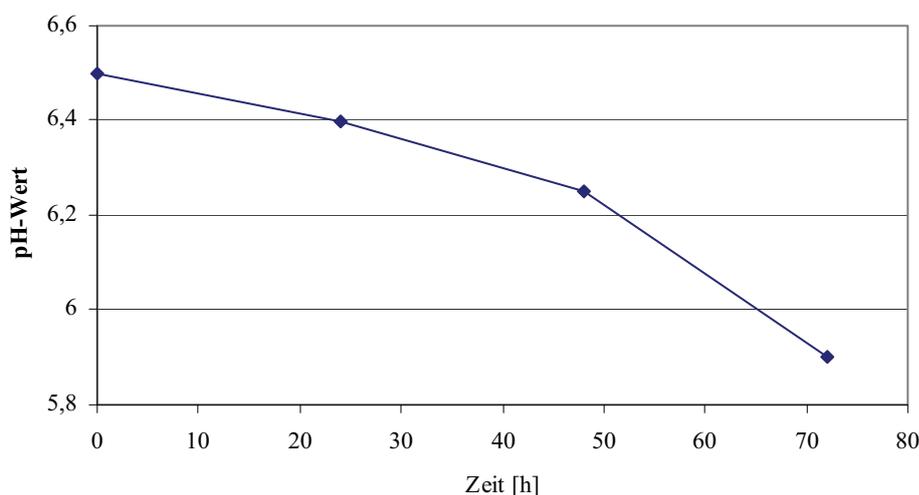


Abb. 37: Änderung des pH-Wertes während der Enzym-Expression in *P. pastoris*

III. Ergebnisse

Nach 72 h wurde der proteinhaltige Überstand nach Änderung des pH-Wertes auf pH 7,5 sterilfiltriert und nach Zugabe von Imidazol zu einer Endkonzentration von 20 mM mit 5 ml Ni-NTA-Matrix über Nacht bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Nach Waschen der Matrix mit 10 ml PBS pH 7,5 wurde mit 300 mM Imidazol in PBS pH 7,5 eluiert und die neutralisierten Fraktionen mittels Western-Blot und Aktivitätsassay mit dem optischen Substrat pNP-Gal auf ihren Enzymgehalt hin analysiert (Abb. 38). Die rekombinante α -D-Galaktosidase wies ein apparentes Molekulargewicht von etwa 45 kDa auf.

A

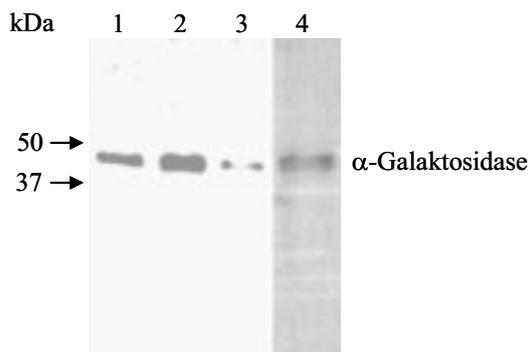
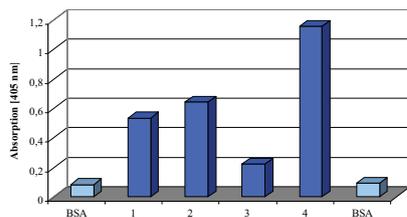


Abb. 38: Expressionsanalyse von rekombinanter α -Galaktosidase

A: Westernblot der Elutionsfraktionen nach Reinigung über Ni-NTA-Matrix (Bahnen 1,2,3). Die Membran wurde mit Anti-HIS-Antikörper 1:1000 mit 1 % BSA in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert und mit Anti-Maus-AP-Konjugat für 1 h markiert bevor die Detektion mit NBT/BCIP erfolgte. Das 12 %ige PA-Gel (Bahn 4) zeigt das gereinigte Enzym nach Dialyse der vereinten Fraktionen gegen 2 l 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5.

B: Aktivitätsassay der eluierten Fraktionen und des gereinigten und dialysierten Enzyms nach Zugabe von 2,5 mM pNP-Gal in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 und Messung bei 405 nm.

B



Die dargestellte enzymatische Aktivität vergrößerte sich nach Dialyse und Verwendung des optimalen Puffers (Abb. 38B). Die Ausbeute betrug nach Durchführung eines BCA-Assays mit BSA als Referenzprotein 864 μ g Enzym/100 ml Kultur.

III.2.1.3.5 Synthese von p-Aminophenyl- α -D-galaktopyranosid (pAP-Gal)

Das für die elektrochemische Detektion benötigte Reagenz pAP-Gal wurde nach II.2.2.2 durch katalytische Hydrierung des Nitrophenyl-Derivats pNP-Gal hergestellt (Abb. 39).

Es konnte als gelblicher Sirup in einer Ausbeute von 98 % erhalten werden. Ein aufgenommenes ESI-MS-Spektrum (Abb. 40A) zeigt einen Massenpeak bei 273,3 m/z, was dem erwarteten ($M+H^+$)-Molekül entspricht. Der R_f -Wert (Abb. 40B) von pAP-Gal (0,18) war erwartungsgemäß niedriger als der von pNP-Gal (0,65), da die gebildete Aminogruppe durch das Laufmittel protoniert wurde und dadurch stärker mit der Kieselgelphase wechselwirkte.

III. Ergebnisse

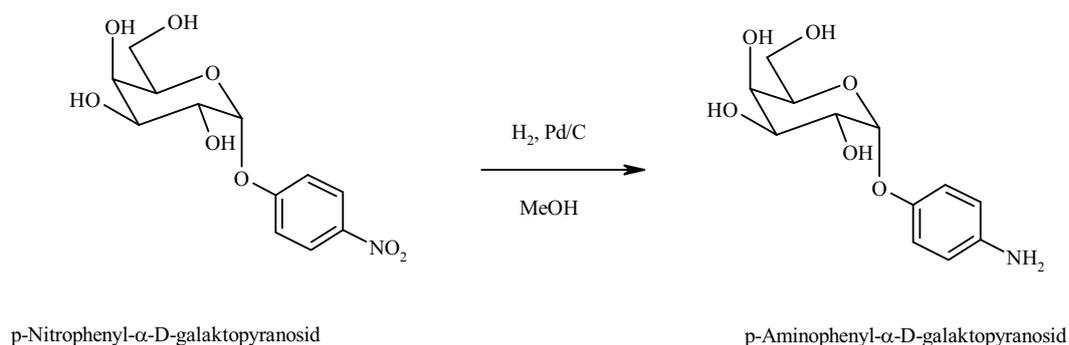


Abb. 39: Syntheschema für pAP-Gal

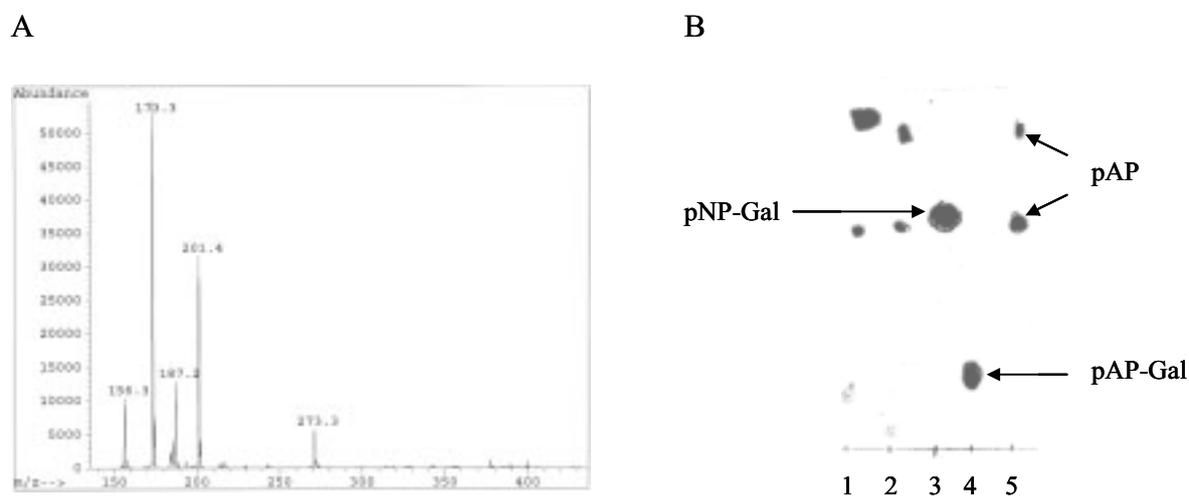


Abb. 40: Massenspektrometrische und dünnstichtchromatographische Analyse von pAP-Gal

A: Das ESI-MS zeigt die erwartete Masse von 273,3 g/mol ($M+H^+$)

B: Dünnschichtchromatogramm 1, 2: pNP-Gal, pAP-Gal in Gegenwart von α -Galaktosidase nach 10 min Inkubation bei 37 °C, 3: pNP-Gal, 4: pAP-Gal, 5: pAP. Als Laufmittel wurde Butanol, Eisessig und H₂O im Verhältnis 7:2:1 verwendet, die Detektion erfolgte nach Besprühung mit 10 %iger (v/v) H₂SO₄ in EtOH mittels Wärmebehandlung.

III.2.1.3.6 Elektrochemische Enzymaktivitätsmessungen

Zur Überprüfung der Eignung von pAP-Gal als elektrochemisches Reporter-molekül wurden Messungen an einem H₂-Biochip durchgeführt. Nach Kontakt mit α -D-Galaktosidase sollte das Molekül in einen Kohlenhydratrest und pAP gespalten werden, welches an den Mikroelektroden erfaßt werden konnte. Das Enzym wurde an eine aktivierte Chipoberfläche, die zuvor mit einer 11-MUS-Schicht belegt wurde, immobilisiert und mit 4 mM pAP-Gal vermessen (Abb. 41).

III. Ergebnisse

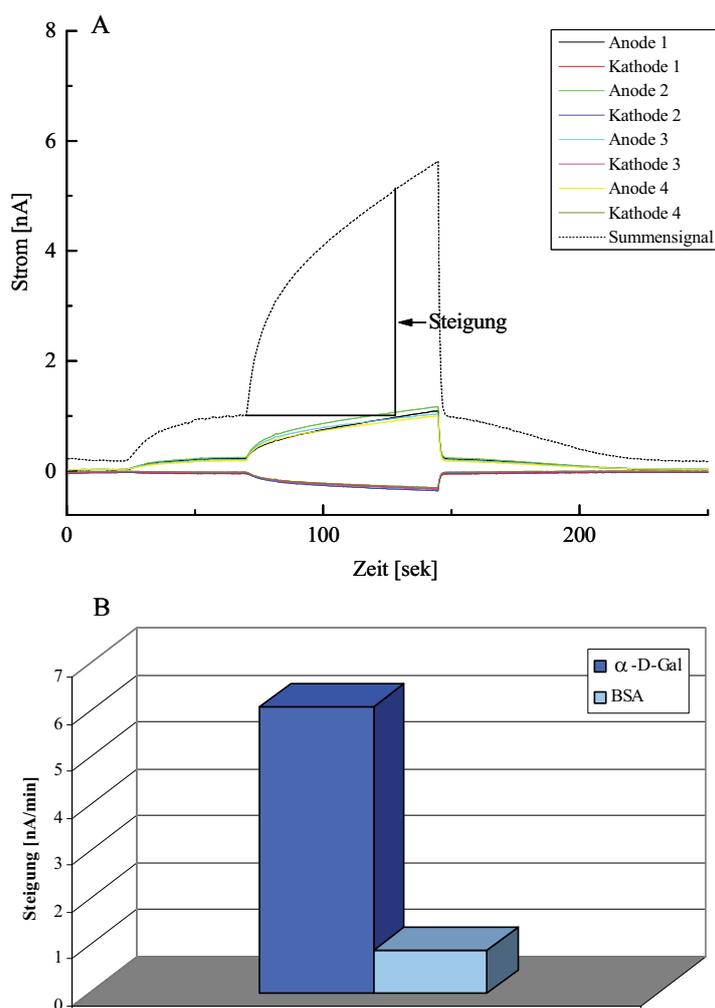


Abb. 41: Elektrochemische Aktivitätsmessung von immobilisierter α -D-Galaktosidase

A: Nach Belegung eines H2-Biochips mit 0,5 mM 11-MUS, der eine Elektrodenzugänglichkeit von 10 % aufwies, wurde die Oberfläche mit PyBOP/DIEA aktiviert und α -D-Galaktosidase immobilisiert. Anschließend wurde die Messung mit 4 mM pAP-Gal bei +350 mV und -50 mV durchgeführt.

B: Graphische Darstellung der Steigung der Summsignale. Als Kontrolle diente ein H2-Biochip, der nur mit BSA belegt war.

Dabei stellte sich heraus, daß ein geringerer pAP-Strom zu Beginn der Messung vorhanden war als bei den Messungen mit Alkalischer Phosphatase und pAPP. Die Signalhöhe war mit 6,1 nA/min allerdings deutlich niedriger. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis betrug 6,8:1.

III.2.2 Antikörper

Für eine spezifische molekulare Erkennung wurden sowohl polyklonale Antikörper als auch monoklonale Agenzien eingesetzt.

III.2.2.1 Polyklonale Antikörper

III.2.2.1.1 Quantifizierung von immobilisierten Antikörpern

Die Quantifizierung von immobilisierten Antikörpern erfolgte über an fester Phase gebundenes Protein A, das diese über den Fc-Teil bindet. Dazu wurden erworbene polyklonale Anti-Lysozym-Antikörper mittels Gelfiltration azidfrei in PBS pH 7,4 umgepuffert. Zur Ermittlung der immobilisierten Menge Antikörper wurde auf einem 4 mm² großen Goldchip ein SAM aus 11-MUS gebildet. Nach Aktivierung der terminalen Carboxylgruppen mit PyBOP/DIEA in DMF (s. II.2.1.4) wurde Protein A in einer Konzentration von 2 mg/ml unter Ausbildung eines Esters an die 11-MUS-Schicht immobilisiert. Anschließend wurden Anti-Lysozym-Antikörper in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in PBS pH 7,4 nach Inkubation für 1 h daran gebunden. Nachdem der Chip mit 2 ml PBS gewaschen wurde, wurden die gebundenen AK zweimal mit je 4 µl 0,2 M Glycin-Puffer pH 2,2 eluiert und die Lösungen mit 1 M NaOH sofort neutralisiert. Nach densitometrischer Bestimmung der Proteinkonzentrationen konnte eine eluierte Menge der immobilisierten Antikörper von etwa 25 ng ermittelt werden. Daraus wurden für die eingesetzten Biochips die theoretischen Mengen an immobilisierten IgG-Molekülen berechnet (Tab. 6). Auf Biochips schlugen Quantifizierungsversuche dieser Art fehl, da für die Immobilisierung eine so geringe Oberfläche zur Verfügung stand, daß die Nachweisgrenze eines Silbergels nicht erreicht werden konnte.

Biochipbezeichnung	Fläche [mm ²]	Immobilisierte IgG [ng]
Goldchip	4	25,0
H2	0,28	1,6
H1	0,14	0,8
400 µm Array	0,07	0,4
200 µm Array	0,02	0,1

Tab. 6: Theoretische Mengen an immobilisierten IgG-Molekülen auf Chip oberflächen

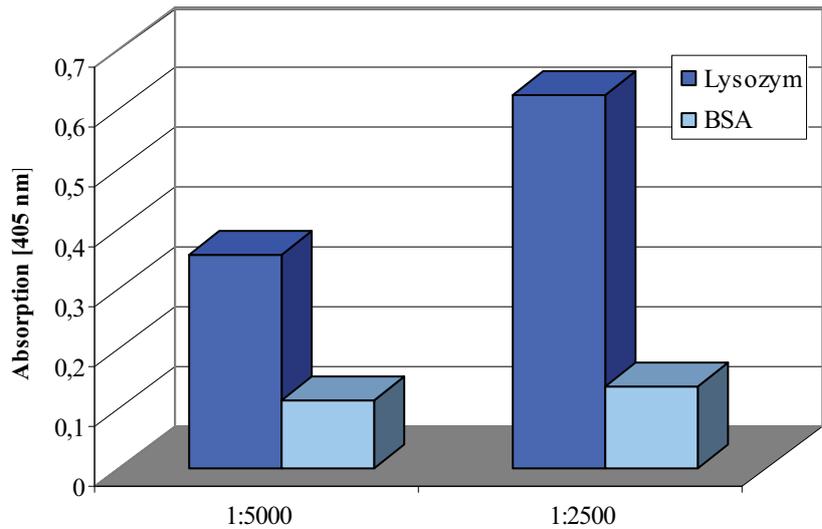
III.2.2.1.2 Überprüfung der Komponenten für polyklonale Lysozym-Sandwich-ELISA-Analysen

Die Komponenten für einen Sandwich-ELISA zur Detektion von Lysozym setzen sich aus polyklonalen Fängerantikörpern, nach II.2.5.13 biotinylierten polyklonalen Detektionsantikörpern und Ex-AP zusammen. Die Überprüfung der einzelnen Funktionalitäten wurde mittels Bindungsstudien im ELISA-Format durchgeführt (Abb. 42).

III. Ergebnisse

Abb. 42: Funktionalitätsüberprüfung von biotinylierten Anti-Lysozym-IgG

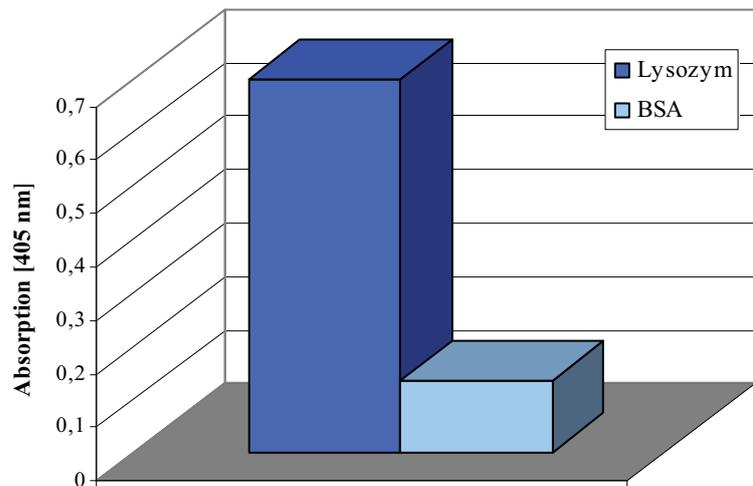
Nach Belegung einer Mikrotiterplatte mit 3 mg/ml Lysozym oder 3 % BSA als Kontrolle und Blockierung mit 3 % BSA wurden entsprechende Fraktionen biotinylierter Antikörper nach der Gelfiltration in Verdünnungen von 1:2500 oder 1:5000 inkubiert. Durch Markierung mit Ex-AP in einer Verdünnung von 1:2500 und Zugabe von 13 mM pNPP in TBS pH 9,5 fand die Detektion bei 405 nm statt.



Die ausgewählten biotinylierten Antikörperfraktionen zeigten eindeutiges Bindungsverhalten. Weiterhin wurden durch polyklonalen Sandwich-ELISA gegen Lysozym die einzelnen Funktionalitäten der Komponenten in Kombination überprüft (Abb. 43).

Abb. 43: Polyklonaler Lysozym-Sandwich-ELISA

Die Belegung einer Mikrotiterplatte erfolgte mit einer azidfreien Fraktion Anti-Lysozym-Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. mit 3 % BSA als Kontrolle. Nach Inkubation mit 5 µg/ml Lysozym wurde der Komplex mit biotinyliertem Anti-Lysozym-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2500 und Ex-AP markiert. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 13 mM pNPP in TBS pH 9,5 bei 405 nm.



III.2.2.2 Darstellung von scFv-Fragmenten gegen Toxine

Die Herstellung monoklonaler Antikörper auf dem klassischen Weg über immortalisierte Milzzellen ist sehr aufwendig und teuer. Aus diesem Grund wurden mittels Phagen-Display-Verfahren Antikörperfragmente gegen toxische Zielmoleküle selektiert. Als Zielmoleküle wurden Toxine gewählt, die von den CDC als gefährliche Substanzen eingestuft sind und außerdem einen relevanten Hintergrund für die Lebensmitteldiagnostik haben. Aus der

höchsten CDC-Kategorie A der biologischen Agenzien wurde Botulinum Toxin A (BoNT A) und aus der Kategorie B Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) gewählt. Beide können über die Nahrungskette in den menschlichen Organismus gelangen und zu Lebensmittelvergiftungen führen.

Die verfolgte Strategie sah zunächst vor, Antikörperfragmente gegen Epitope der Toxine zu selektieren, diese zu exprimieren und charakterisieren. Anschließend sollte das mit Lysozym etablierte Modellsystem zur Detektion von Zielproteinen im Sandwich-ELISA-Format auf die Toxine übertragen werden.

III.2.2.2.1 Selektion von scFv-Fragmenten gegen BoNT A und SEB

Zur Affinitätsselektion bindender scFv-Fragmente wurde die synthetische humane Griffin-1-Bibliothek (Griffiths *et al.* 1994) verwendet. Die Vielfalt der Bibliothek belief sich auf insgesamt $1,9 \cdot 10^9$ verschiedene Affinitätsmoleküle, bei denen die hypervariablen Regionen (CDR 3) durch synthetisierte zufällige Basenabfolgen ersetzt wurden. Die Affinitätsmoleküle lagen im scFv-Format im Phagemid-Vektor pHEN2 vor. Am N-Terminus des Antikörperfragmentes befand sich eine pelB-Sequenz, die das exprimierte Protein in den periplasmatischen Raum dirigierte. An ihrem C-Terminus besaßen sie eine myc-(EQKLISEEDL)- sowie eine Hexa-Histidin-(HHHHHH)-Sequenz, wodurch eine einfache Detektion und Reinigung ermöglicht wurde. Zwischen dem scFv-Fragment und dem Phagenhüllprotein-kodierenden g3 befand sich ein Amber-Stop-Kodon, das nur von Non-Suppressor-Zelllinien wie z. B. HB2151 als Abbruchsignal erkannt. Durch Wahl der entsprechenden Zelllinie wurde das Protein entweder als lösliches Antikörper-Fragment oder als scFv-Gen3-Konstrukt exprimiert, wobei die Expression unter Regulation des lac-Promotors stand.

III.2.2.2.2 Analyse und Charakterisierung selektierter Klone

Zu Beginn einer Selektion wurde zuerst das Zielprotein an eine feste Phase, in diesem Fall ein Immunröhrchen mit hydrophober Polystyrol-Oberfläche, gebunden. Hierfür wurden 2 ml einer 173 µg/ml Lösung von BoNT A bzw. 100 µg/ml SEB in PBS pH 7,4 verwendet. Parallel dazu wurden die Bibliotheksvielfalt auf ihrer Oberfläche repräsentierenden rekombinanten Phagen nach Superinfektion von phagemid-tragenden TG-1-Zellen mit M13KO7-Helferphagen nach II.2.4.3 hergestellt. Die Selektion wurde wie in II.2.4.4 beschrieben

III. Ergebnisse

durchgeführt und verlief über zwei (SEB) bzw. drei (BoNT A) Runden, wobei die Elution der rekombinanten Phagen von der festen Phase nur in der ersten Runde durch einen abrupten pH-Wechsel mittels TEA erfolgte. Nach der anschließenden Reinfektion und Kultivierung von phagemid-tragenden TG-1-Zellen wurden nun Helferphagen des Typs KM13 zur Superinfektion verwendet. Der Vorteil der daraus resultierenden angereicherten rekombinanten Phagen war ihre spezifische Elutionsmöglichkeit nach Bindung an das Zielprotein mittels Trypsin. Nach der ersten Runde wurden die gebundenen Phagen mit dieser milden Methode eluiert.

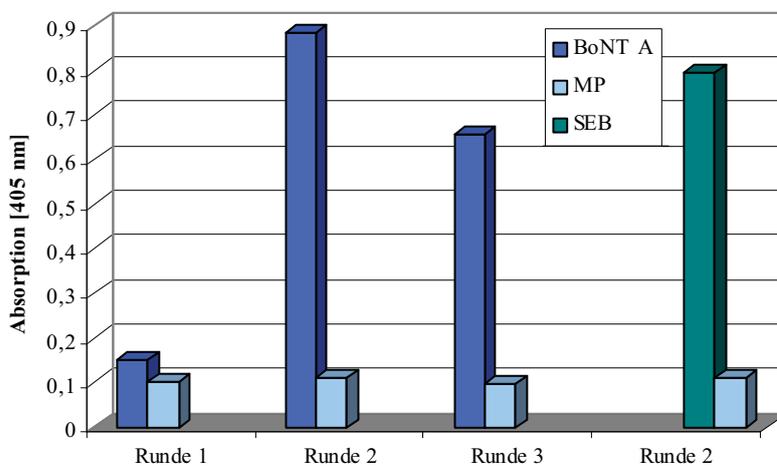


Abb. 44: Polyklonaler ELISA zur Überprüfung der Selektionsrunden

Nach Belegung von Kavitäten einer ELISA-Platte mit 10 µg/ml BoNT A bzw. SEB in PBS über Nacht bei 4°C wurde für 3 h bei RT mit 4 % MP in PBS blockiert und anschließend 50 µl nach II.2.4.3 hergestellter rekombinanter Phagen mit 2 % MP in PBS für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit Anti-M13-HRP 1:5000 mit 2 % MP in PBS für 45 min bei RT und nach Zugabe von 0,5 mM ABTS in Citratpuffer pH 4,0 sowie Messung der Absorption bei 405 nm.

Die Überprüfung der Selektionseffizienz geschah durch ELISA-Analyse der rekombinanten Phagen der jeweiligen Runde (Abb. 44). Bei der SEB-Selektion wurden aufgrund der limitierten Menge des Toxins nur die Phagen nach der zweiten Runde analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß aufgrund des Signal-Hintergrund-Verhältnisses von 7,2:1 eine Anreicherung an bindenden Phagen stattgefunden hat. Der polyklonale ELISA zur Analyse von BoNT A zeigt eine unerwartete Reduzierung in der Anzahl der bindenden Klone in der dritten Runde.

Aufgrund der deutlichen Anreicherung der bindenden Phagen bereits in Runde 2 wurden für SEB 12 Klone und für BoNT A je 10 Klone aus dieser und aus der dritten Runde analysiert. Aus den Klonen wurden jeweils monoklonale Phagenpopulationen generiert und ihr Bindungsverhalten gegenüber dem Zielprotein mittels ELISA überprüft (Abb. 45).

III. Ergebnisse

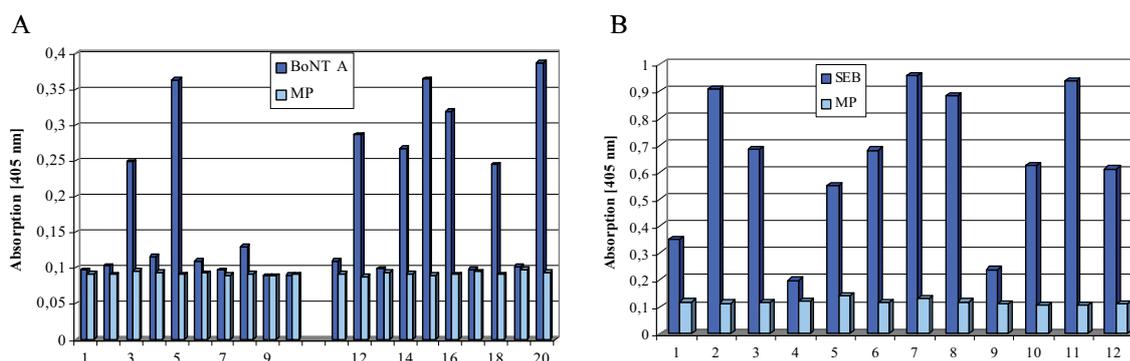


Abb. 45: Monoklonaler Phagen-ELISA zur Überprüfung der Reaktivität gegenüber BoNT A und SEB
Nach Belegung von Kavitäten einer ELISA-Platte mit 10 µg/ml BoNT A (A) bzw. SEB (B) in PBS über Nacht bei 4°C wurde für 3 h bei RT mit 4 % MP in PBS blockiert und anschließend die rekombinanten Phagen in einer Verdünnung von 1:2 mit 2 % MP in PBS für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit Anti-M13-HRP 1:5000 mit 2 % MP in PBS für 45 min bei RT und nach Zugabe von 0,5 mM ABTS in Citratpuffer pH 4,0 bei 405 nm.

Für SEB konnten elf und für BoNT A insgesamt neun erfolgreich bindende Repräsentanten identifiziert werden. Mit den rekombinanten Phagen dieser Klone wurden daraufhin HB2151-Zellen mit dem Ziel der Expression löslicher scFv-Fragmente infiziert. Zur Überprüfung des Expressionsvermögens wurden die entsprechenden Klone erst im analytischen Maßstab als 10 ml-Kultur nach II.2.5.4 exprimiert, jeweils ein periplasmatischer Extrakt der sedimentierten Zellen nach II.2.5.4.1 hergestellt und dieser mittels Western-Blot mit Anti-myc-Antikörper als Markierungsreagenz auf eventuellen scFv-Gehalt hin untersucht.

Dabei stellte sich heraus, daß von den SEB-bindenden Klonen S2 eine Expression zeigte, unter den BoNT A-bindenden scFv exprimierten die Klone B5, B8 und B20. Eine Sequenzier-

Klon	CDR H1	CDR H2	CDR H3
B5/B8	GFTFSNAWMS	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	GNPFRGRS
B20	GGTFSSYAIS	GIPIFGTANYAQK	NE*VFSPATLAS
S2	GFTFSSYAMS	AISGSGGSTYYADSVKG	SHANISS

Klon	CDR L1	CDR L2	CDR L3
B5/B8	SGSSSNIGSNVYV	RNNQRPS	AAWDDSLVAGV
B20	SGSSSNIGSNVYV	RNNQRPS	AAWDDSLV
S2	QGDSLRSYYAS	GKNNRPS	NSRDSSGTV

Tab. 7: Sequenzen der CDR von bindenden scFv gegen BoNT A und SEB, bestimmt aufgrund der die CDR flankierenden Aminosäuresequenzen (Chothia und Lesk 1987).*) Stop-Kodon

ung der exprimierenden Klone (Tab. 7) ergab, daß B5 und B8 identisch waren, während B20 hauptsächlich Unterschiede in der schweren Kette aufwies. Allerdings besaß letzterer in der

III. Ergebnisse

CDR 3 der schweren Kette ein Amber-Stop-Kodon, das in HB2151-Zellen größtenteils zum Translationsabbruch führt.

Mit den exprimierenden Klonen wurden 2 l- und 3 l-Expressionen durchgeführt und aus den hergestellten periplasmatischen Extrakten nach Dialyse die scFv-Fragmente mittels IMAC gereinigt. Nach der Elution mit Imidazol wurden die Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 46), die scFv-haltigen vereint und gegen 5 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde über eine Proteinkonzentrationsbestimmung die Expressionsausbeute bestimmt. Sie betrug zwischen 1,4-3 mg Protein/l Kultur (Tab. 9).

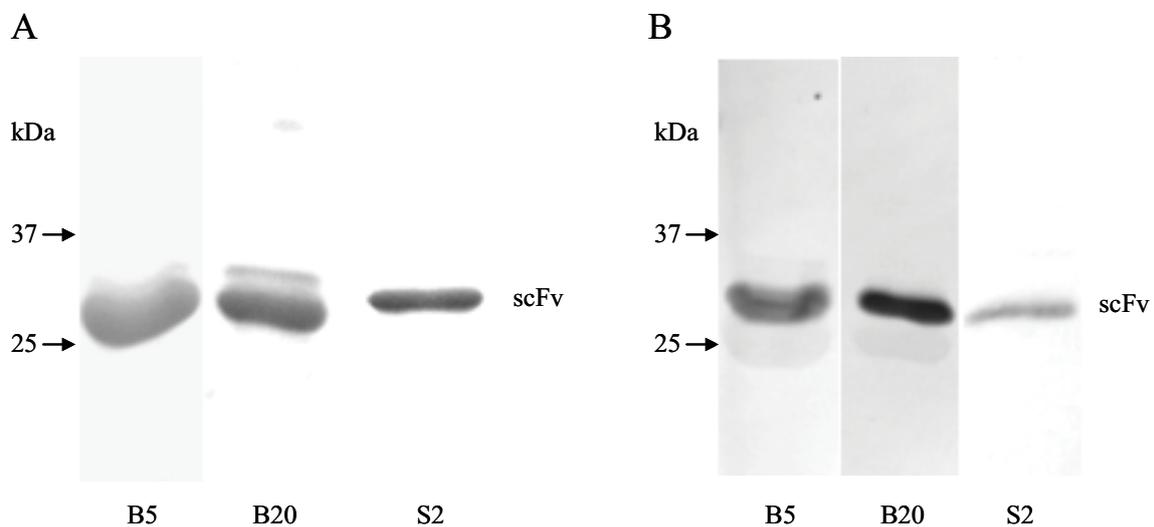


Abb. 46: PAGE- und Westernblot-Analyse der exprimierten scFv B5, -B20 und -S2

A: 12,5 %iges PA-Gel mit je 10 μ l der vereinten Fraktionen nach Expression der scFv, Reinigung über IMAC und anschließender Dialyse.

B: Westernblot der unter A beschriebenen Proben. Die Immunofärbung fand nach Inkubation mit Anti-myc-AP-Konjugat 1:2000 und Zugabe von NBT/BCIP statt.

Ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Eignung als spezifischer Fänger- oder universeller Detektionsantikörper ist die eventuelle Kreuzreaktivität der scFv. Es wurden die beiden gegen BoNT A selektierten scFv nach kovalenter Einführung einer Biotingruppe nach II.2.5.13 auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber anderen Toxinen wie BoNT B, BoNT E und SEB untersucht (Abb. 47).

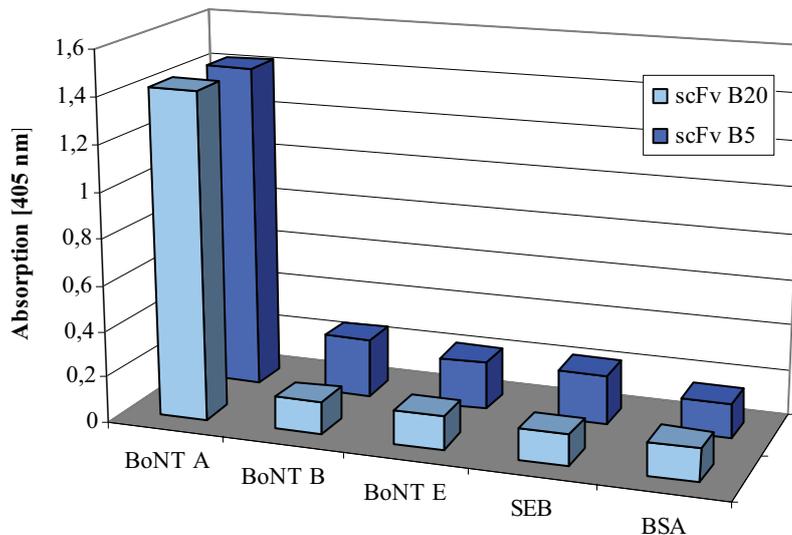


Abb. 47: Kreuzreaktivitäten von biotinylierten scFv B5 und -B20
Die scFv B5 und -B20 wurden nach ihrer Biotinylierung für 1 h bei RT in mit den entsprechenden Toxinen beschichteten Kavitäten einer ELISA-Platte inkubiert. Anschließend wurde mit Ex-AP markiert und nach Zugabe von 13 mM pNPP in TBS pH 9,5 bei 405 nm detektiert.

Aus der Abbildung geht hervor, daß sich scFv B5 und -B20 nach der Biotinylierung als selektive Affinitätsmoleküle eignen.

III.2.2.2.3 Sandwich-Selektion an gerichtet immobilisierten Toxinen und Charakterisierung

Um selektierte scFv als Fänger-/Detektorpaare in einem Sandwich-ELISA einsetzen zu können wurde mit der angereicherten Bibliothek der zweiten Runde eine weitere Selektionsrunde durchgeführt. Allerdings wurde das Toxin in diesem Fall gerichtet immobilisiert, indem zunächst die Oberfläche eines Immunoröhrchens mit den scFv B5 bzw. -S2 belegt wurde und nach Blockierung der freien Stellen mit MP das Toxin an die scFv gebunden wurde. Mit diesen präparierten festen Phasen wurde nun je eine Runde im Sandwich-Verfahren selektiert. Die resultierende angereicherte Bibliothek wurde monoklonalisiert und daraus 18 Klone für SEB und 9 Klone für BoNT A auf ihre Expressionseigenschaften hin untersucht. Dazu wurden zunächst analytische Expressionen im 10 ml-Maßstab durchgeführt, periplasmatische Extrakte hergestellt und diese mittels Westernblot mit Anti-myc-Antikörpern als Markierungsreagenz auf die Präsenz von scFv-Protein überprüft (Abb. 48).

III. Ergebnisse

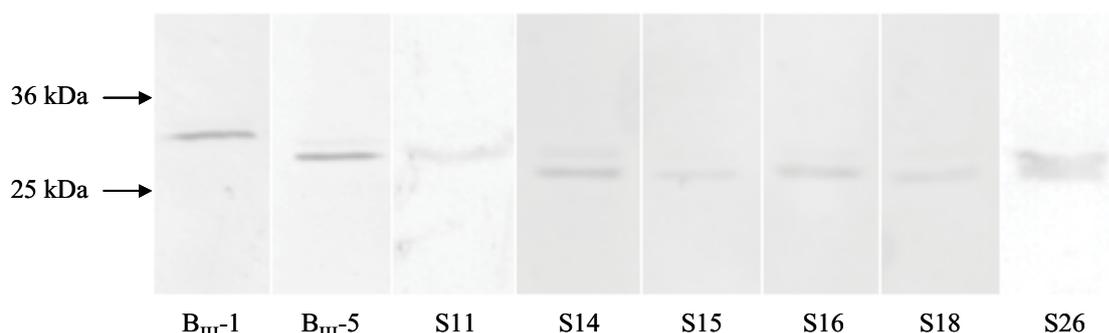


Abb. 48: Expressionskontrolle durch Western-Blot-Analyse periplasmatischer Extrakte nach Sandwich-Selektion

Nach Expression einzelner Klone im 10 ml-Maßstab und Herstellung des periplasmatischen Extraktes wurden davon je 20 µl unter denaturierenden Bedingungen in einem 12,5 % PA-Gel elektrophoretisch getrennt. Nach Durchführung eines Western-Blots wurde vorhandenes scFv-Protein durch Anti-myc-Antikörper markiert und nach 60 min Inkubation mittels Anti-Kaninchen-AP-Konjugat und NBT/BCIP detektiert.

Deutlich erkennbar waren Banden in dem erwarteten Größenbereich von etwa 27-30 kDa bei den Klonen B_{III}-1 und B_{III}-5, S11, S14, S15, S16, S18 und S26. Die höherlaufenden dünneren Banden sind wahrscheinlich Konstrukte, bei denen die pelB-Signalsequenz, die einen Massenunterschied von etwa 2 kDa ausmacht, nicht vollständig abgespalten wurde. Es wurden anschließend Expressionen im 500 ml-Maßstab durchgeführt und nach Reinigung der scFv aus den periplasmatischen Extrakten mittels IMAC analog analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß die Klone S14, S15, S16 und S18 keine Expression zeigten. Eine durchgeführte

Klon	CDR H1	CDR H2	CDR H3
B _{III} -1	GFTFSSYWMH	RINSDGSSTSYADSVKG	DDAKR
B _{III} -5	GFTVSSNYMS	VIYSGGSTYYADSVKG	AASN
S11/S26	GFTFSNAWMS	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	SSKRDLNHSMK

Klon	CDR L1	CDR L2	CDR L3
B _{III} -1	QGDSLRSYYAS	GKNNRPS	NSRDSSGTV
B _{III} -5	RSSQSLLHSHNGYNYLN	LGSNRAS	MQALQTRRPT
S11/S26	QGDSLRSYYAS	GKNNRPS	NSRDSSGNHV

Tab. 8: Aminosäuresequenzen der CDR der im Sandwich-Verfahren selektierten scFv gegen BoNT A und SEB

Sequenzierung der übrigen Klone (Tab. 8) mit den Oligonukleotiden lmb3 und fdseq enthüllte u.a. eine Sequenzidentität von S11 und S26.

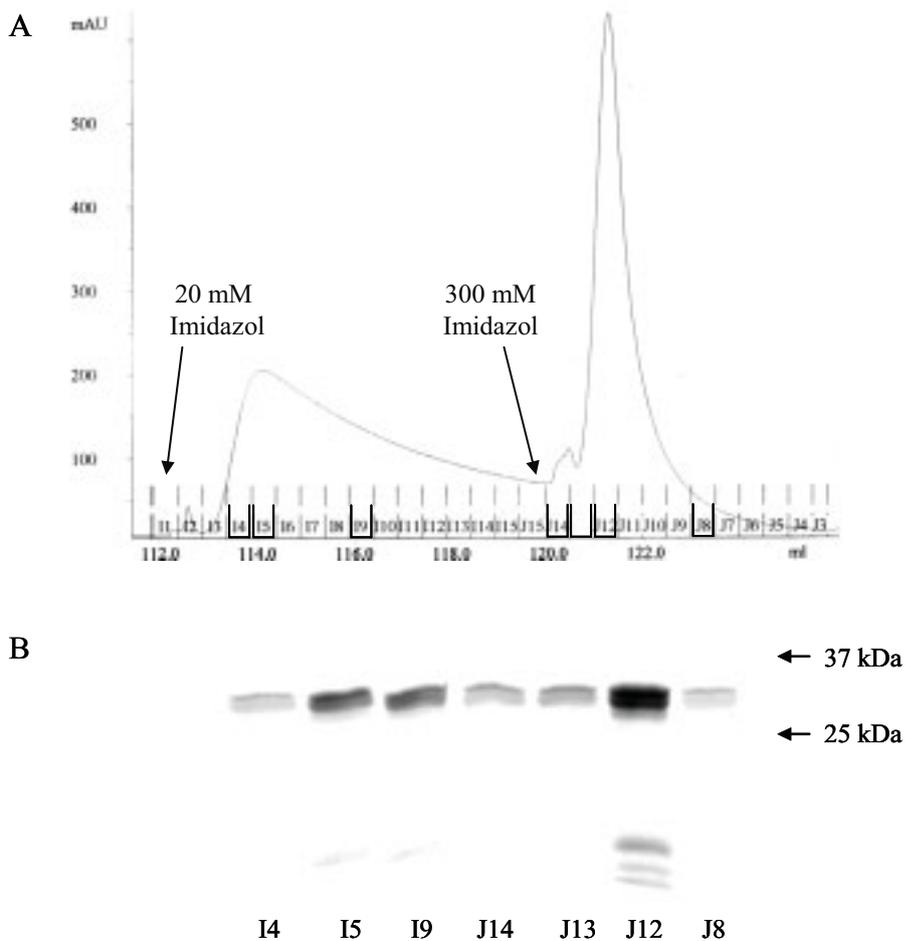


Abb. 49: Elutions-Chromatogramm von B_{III}-5 und Analyse der Fraktionen

Der Beladung einer Super-Flow Ni-NTA-Säule der Äkta mit dem dialysierten periplasmatischen Extrakt einer 3 l-Expression von B_{III}-5 folgte nach Spülen mit S-Puffer pH 8,0 eine weitere Waschprozedur mit 30 mM Imidazol in S-Puffer pH 8,0. Anschließend wurde mit 300 mM Imidazol in S-Puffer pH 8,0 eluiert. Das Elutionsprofil (A) wurde bei 280 nm aufgenommen. Die Fraktionen wurden mittels eines 12,5%-Gels gelelektrophoretisch analysiert.

Für weiterführende Versuche wurden S26, B_{III}-1 und B_{III}-5 jeweils einer 3 l-Expression im Fermenter unterzogen und die periplasmatischen Extrakte nach gründlicher Dialyse gegen insgesamt 10 l PBS über Nacht bei 4 °C durch IMAC über eine Ni-NTA-Matrix mit einer Äkta-Proteinreinigungsanlage nach II.2.5.6.1 isoliert. Das Elutionschromatogramm (Abb. 49A) wies bereits nach der Zugabe von 20 mM Imidazol einen Proteingehalt auf. Der scharfe Peak nach Zugabe von 300 mM Imidazol sollte das gewünschte scFv-Fragment enthalten. Durch gelelektrophoretische Analyse konnte gezeigt werden, daß die bei unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen eluierten Fraktionen identisches Protein enthielten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, gegen 5 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert und

III. Ergebnisse

die Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode nach II.2.5.6 bestimmt. Es konnten Expressionsausbeuten von 1,1-1,4 mg scFv/l Kultur erreicht werden (Tab. 9).

Klon	Kulturvolumen [l]	Ausbeute [mg scFv/l Kultur]	Größe [AS]	Gewicht [kDa]
B5	3	3,0	274	28,4
B20	2	1,4	273	28,1
B _{III} -1	3	1,1	270	27,6
B _{III} -5	3	1,0	265	28,5
S2	3	1,7	268	27,5
S26	3	1,4	274	28,6

Tab. 9: Expressionsausbeuten und Größen exprimierter scFv-Fragmente nach BCA-Bestimmung mit Lysozym als Referenz

In Abb. 50 sind die exprimierten scFv nach ihrer Reinigung über IMAC gezeigt.

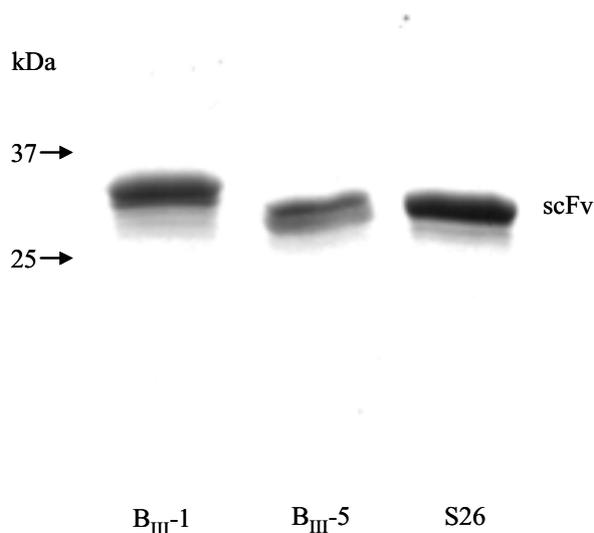


Abb. 50: PA-Gel der im Sandwich-Verfahren selektierten und exprimierten scFv B_{III}-1, B_{III}-5 und S26
12,5 %iges PA-Gel nach Coomassie-Färbung mit je 15 µl der exprimierten und gereinigten scFv

III.2.2.2.4 Überprüfung der Anti-Toxin-Seren und -scFv

Zur Detektion von Toxinen standen zusätzlich zu den selektierten scFv ein Anti-BoNT-Serum (Pferd), das gegen die BoNT-Serotypen A, B, C, D und E gerichtet war, sowie ein Anti-SEB-Serum (Kaninchen) zur Verfügung.

III. Ergebnisse

Bei ausschließlicher Verwendung von toxinspezifischen scFv in Sandwich-ELISA-Verfahren muß sich die Detektionskomponente von der Fängerkomponente unterscheiden. Dazu wurde untersucht, inwieweit sich die bereits vorhandene c-myc-Domäne und eine vorgenommene Einführung einer Biotingruppe als Markierung eignen. Zur Biotinylierung von scFv nach II.2.5.13 wurden variable molare Mengen des Biotinylierungsreagenzes Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt, die Ansätze nach der Reaktion gegen 1 l PBS pH 7,4 über Nacht dialysiert und die markierten scFv einer Überprüfung ihrer Bindungsfähigkeit unterzogen (Abb. 51). Da bei einem Biotinylierungsverhältnis von 10:1 ein optimales Signal/Hintergrund-Verhältnis erreicht werden konnte, wurden sämtliche scFv fortan in diesem Verhältnis biotinyliert.

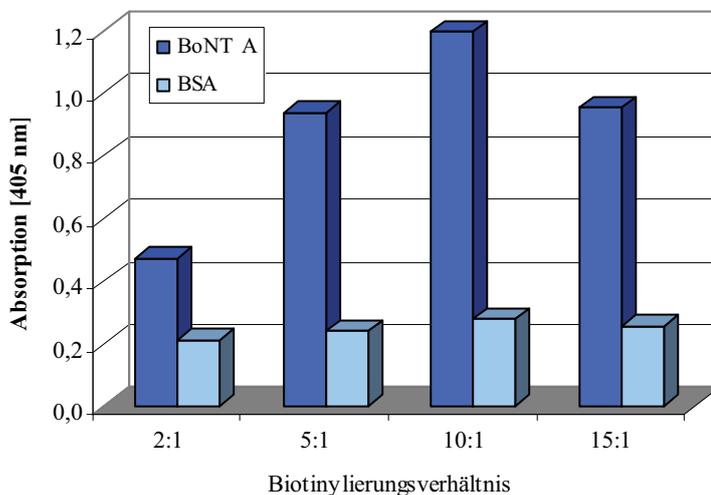


Abb. 51: Biotinylierungsverhältnisse der exprimierten scFv und korrelierende Signalstärken nach direktem ELISA

Nach Bindung an über Nacht bei 4 °C immobilisiertem BoNT A wurden die in unterschiedlichen Verhältnissen biotinylierten B5-scFv in einer Verdünnung von 1:2 in 1 % BSA für 2 h bei RT inkubiert, nach 50 min Inkubation durch Ex-AP 1:2500 markiert und nach Zugabe von 13 mM pNPP in TBS bei 405 nm detektiert.

Die exprimierten scFv wurden biotinyliert und ihre Bindungsfähigkeit nach der Modifikation mittels direktem ELISA überprüft (Abb. 52). Parallel dazu wurde untersucht, ob sich das c-myc-Epitop der scFv als Detektionsmarkierung eignet. Exemplarisch ist die Detektionsvariante mit B_{III}-1 gezeigt, die bei allen überprüften scFv analog verlief und kein Signal lieferte.

III. Ergebnisse

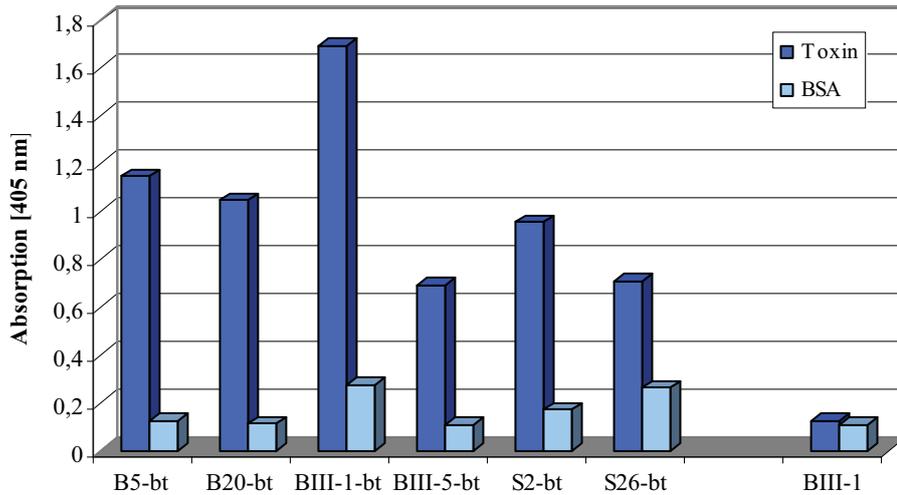


Abb. 52: Bindungsanalyse der scFv

Nach Immobilisierung von BoNT A bzw. SEB über Nacht bei 4 °C wurden die biotinylierten scFv in einer Verdünnung von 1:2 mit 1 % BSA in PBS für 1 h inkubiert und mit Ex-AP 1:2500 markiert und nach Zugabe von 13 mM pNPP bei 405 nm detektiert. Ganz rechts ist die c-myc-Detektionsvariante zu sehen, bei der mit nicht biotinyliertem scFv analog inkubiert wurde, bevor eine Markierung mit Anti-myc-Antikörper 1:1000 und Anti-Maus-AP-Konjugat 1:2500 mit anschließender Detektion nach Zugabe von 13 mM pNPP bei 405 nm stattfand.

Da das verfügbare Anti-Bot-Pferdeserum bereits über eine Dekade gelagert wurde, wurden vor dem Einsatz Aliquots über eine Protein G-Matrix zur Isolierung der IgG gegeben (Sheoran *et al.* 1996) oder mit magnetischen Partikeln präinkubiert, um unspezifische Adsorptionen zu minimieren. Mit diesen präparierten Fraktionen wurden Bindungsuntersuchungen an direkt immobilisierten Toxinen durchgeführt (Abb. 53B).

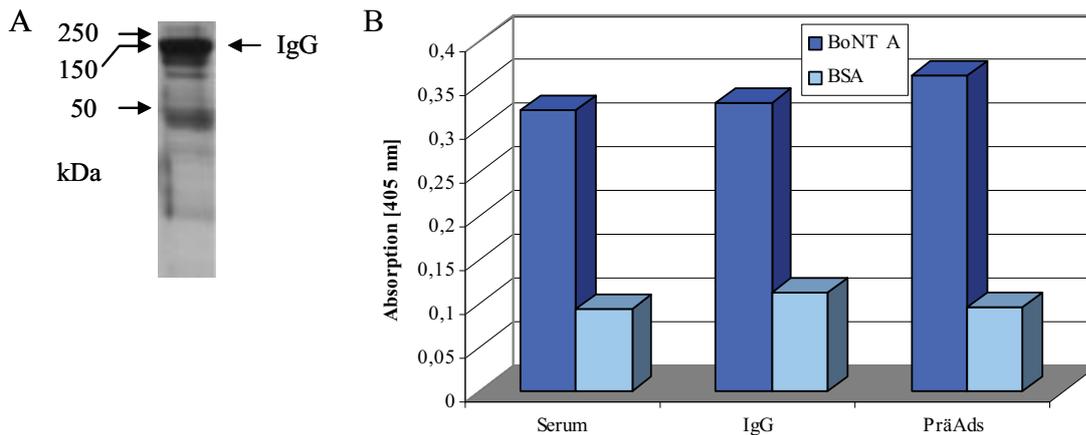


Abb. 53: Gel und Bindungsanalyse des Anti-BoNT-Serums

A: 5%iges PA-Gel nach elektrophoretischer Trennung einer 1:100 Verdünnung des Serums

B: Bindungsanalyse der IgG des Serums in unterschiedlichen Reinheitsgraden nach Immobilisierung von BoNT A über Nacht bei 4 °C. Eine anschließende Inkubation von unverändertem Serum, Protein G gereinigten IgG bzw. präadsorbiertem (PräAds) Serum in Verdünnungen von je 1:100 für 1 h bei RT gefolgt von einer 50minütigen Markierung mit Anti-Pferd-Antikörper-AP-Konjugat 1:2500 gingen der Detektion durch Zugabe von 13 mM pNPP bei 405 nm voraus.

Es war kein signifikanter Unterschied in den Hintergrundsignalen zu erkennen, sodaß das Serum in unveränderter Form in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt wurde.

III.3 Optimierung des Modellsystems

Als Modell-System für die Anwendung des Sandwich-ELISA auf elektrochemischer Basis wurde Lysozym als Antigen gewählt und das Verfahren zunächst mit optischer, anschließend mit elektrochemischer Detektion durchgeführt.

III.3.1 Elektrochemische Immunoassays an 2D- und 3D-Schichten

Die funktionale Immobilisierung von Antikörpern an modifizierten Oberflächen wurde jeweils mittels durchgeführter Sandwich-ELISA-Verfahren mit elektrochemischer Detektion getestet. Dazu wurden Aktivierungsmodi für die Säuregruppen der Oberflächenmoleküle getestet und die auf einem Goldchip immobilisierbare Menge IgG-Antikörper quantifiziert.

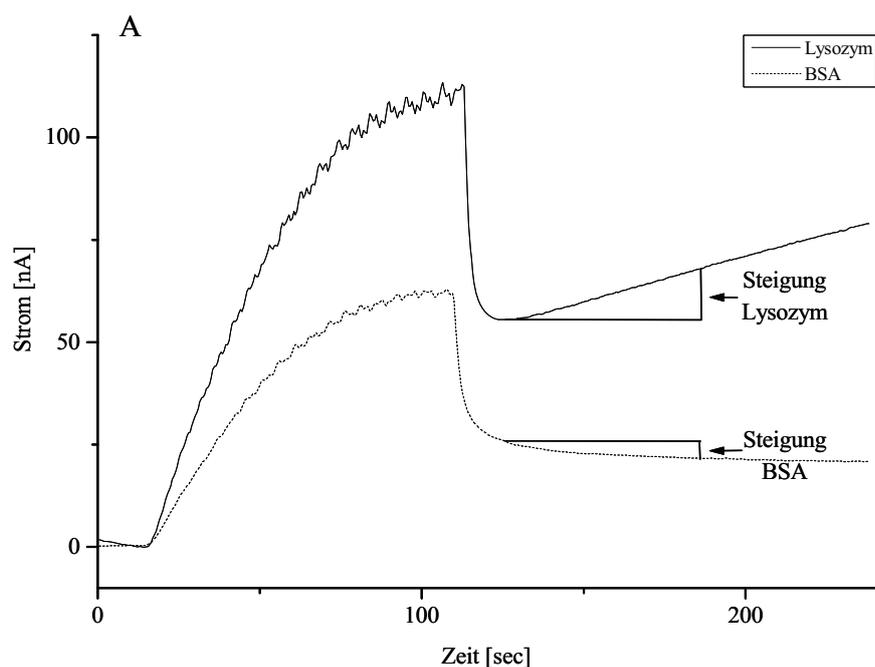
Zur Etablierung und Optimierung des Systems wurde zunächst mit Lysozym als Zielprotein gearbeitet. Als Fängerantikörper standen polyklonale IgG zur Verfügung, die Detektion erfolgte über biotinylierte IgG mit anschließender Ex-AP-Markierung und pAPP-Umsatz, bei dem elektrochemisch aktives pAP freigesetzt und bei eingestellten Potentialen von -50 mV und +350 mV detektiert wurde.

III.3.1.1 Lysozym-Chip-Assays

Die Übertragung der optischen auf eine elektrochemische Detektion erfolgte durch voltammetrische Messung des enzymatischen Umsatzes von pAPP, wobei im Gegensatz zum optischen System anstelle des sichtbaren pNP das elektrochemisch aktive pAP freigesetzt wurde (Abb. 54).

Abb. 54: Polyklonaler Lysozym-Sandwich-ELISA an H1-Biochips

Nach Belegung mit 11-MUS wurden die H1-Biochips mit H₂O gewaschen und getrocknet. Der Aktivierung mit PyBOP/DIEA in DMF folgte die Kopplung von Fängerantikörpern bzw. BSA an die modifizierte Mikroelektrodenoberfläche. Nach Waschen mit PBS wurde nacheinander mit je 2 µl 1 µg/ml Lysozym-Lösung, biotinylierten Anti-Lysozym-IgG 1:2500 mit 1 % BSA in PBS, und Ex-AP 1:2500 mit 1 % BSA in TBS inkubiert. Anschließend wurden die H1-Biochips in die Meßapparatur eingespannt, mit pAPP in TBS bis zu einem Sättigungssignal äquilibriert und die Messung im statischen Zustand bei +350 mV und -50 mV durchgeführt.



B

	Lysozym	BSA
Steigung [nA/min]	12	-2

Es wurden Messungen mit vorinkubierten Biochips, bei denen die einzelnen Inkubations- und Waschschrte außerhalb der Meßapparatur stattfanden (off-chip-Assays, II.2.1.6), sowie direkt auf eingespannten Biochips (on-chip-Assays, II.2.1.6), bei denen die entsprechenden Reagenzien durch die Apparatur transportiert wurden, durchgeführt.

Ein direkter Vergleich von den dreidimensionalen Oberflächenmolekülen t-CMC (s. III.1.1.3) und Dendrimer **5** (s. III.1.1.4) mit einer zweidimensionalen Schicht konnte durch Sandwich-ELISA auf einem 400 µm-Array-Biochip (Abb. 55) gezeigt werden.

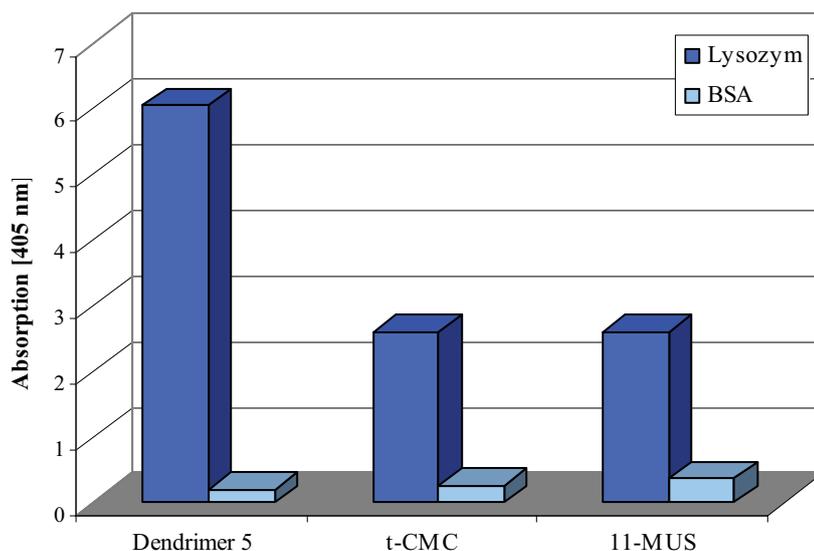


Abb. 55: Polyklonale Lysozym-Sandwich-ELISA mit diversen Oberflächenmolekülen auf Array-Biochips
 Bei 400 μm -Array-Biochips standen nur 3 Positionen zur Verfügung. Nach Belegung eines Array-Biochips mit 11-MUS, t-CMC und Dendrimer **5** wurde nach Aktivierung mit PyBOP/DIEA in DMF Anti-Lysozym-IgG (A) bzw. BSA (B) an die Oberfläche gekoppelt und nicht reagierte Ester mit BSA blockiert. Anschließend wurde außerhalb der Meßapparatur sukzessive mit 100 ng/ml Lysozym, biotinyliertem anti-Lysozym-IgG 1:2500, Ex-AP 1:2500 und entsprechenden Waschschritten inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Einspannen des Biochips in die Meßapparatur nach Äquilibration mit TBS und 5 mM pAPP in TBS durch Messung des Stromanstiegs bei konstant eingestellten Potentialen von +350 und -50 mV.

Dabei zeigte sich, daß von den gewählten Belegungsmolekülen Dendrimer **5** die besten Eigenschaften für eine Oberflächenmodifikation aufwies. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis betrug 30:1, bei t-CMC 10:1 und bei 11-MUS 7:1. Mit Dendrimer **5** konnte eine Signalsteigerung um den Faktor 2,3 im Vergleich zum Hydrogel oder einem zweidimensionalen SAM erreicht werden.

III.3.2 Oberflächenvergrößerung durch Nutzung von Magnetpartikeln

Mit der Verwendung von paramagnetischen Partikeln als Basis für einen Festphasenassay (Abb. 56) wurde ein weiteres Konzept zur Vergrößerung der Oberfläche für die lokale Anreicherung des Zielproteins verfolgt. Aufgrund ihrer paramagnetischen Eigenschaften konnte der Transport der Partikel und die gezielte reversible Immobilisierung durch An- oder Abwesenheit von lokalen magnetischen Feldern erreicht werden. Die verwendeten Partikel besaßen einen Magnetkern, der von einem Polymer ummantelt war und hatten entweder eine

Carboxy- oder eine Epoxy-Oberflächenfunktionalisierung, wodurch eine Kopplung von Antikörpern über deren Aminofunktion ermöglicht wurde. Die Magnetpartikel hatten einen Durchmesser von ca. 0,7-1 μm .

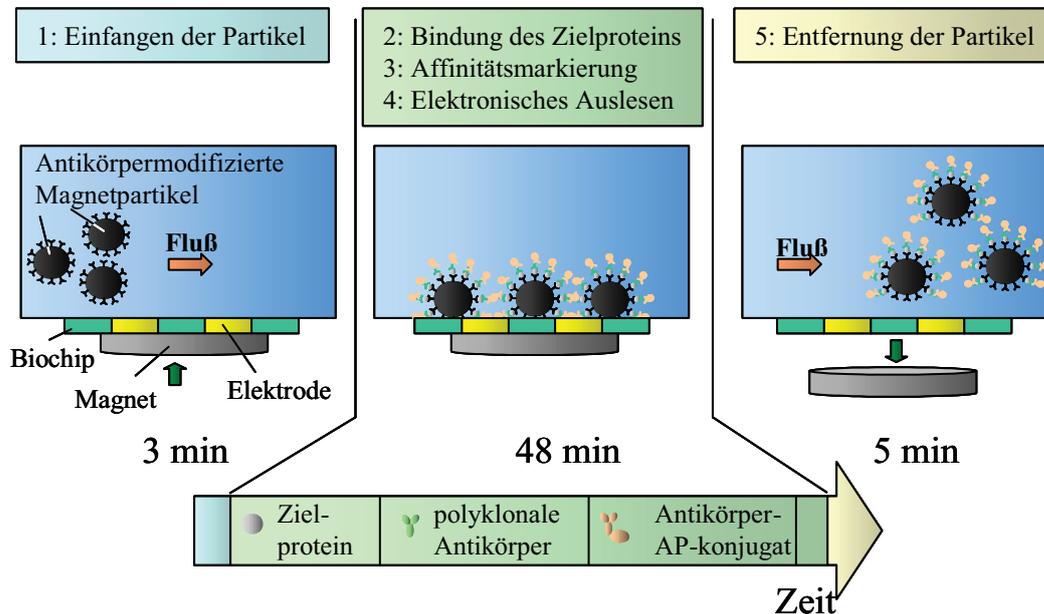


Abb. 56: Schema des elektrochemischen Detektionssystems im Sandwich-ELISA-Format

Die antikörpermodifizierten Magnetpartikel wurden auf den Mikroelektroden mittels eines unter dem Biochip platzierten Dauermagneten fixiert. Anschließend wurden sie on-chip nacheinander mit dem Zielprotein, Detektionsantikörper und Antikörper-AP-Konjugat in entsprechenden Verdünnungen inkubiert. Nach der Signalmessung wurden die Elektroden durch Entfernung der Magnetpartikel für die nächste Messung vorbereitet. Die Dauer einer Messung belief sich insgesamt auf etwa 50 min.

Unter Anwendung des polyklonalen Sandwich-Verfahrens mit elektrochemischer Detektion von Lysozym wurden die Inkubationsschritte direkt auf dem Chip als sogenannter on-chip-Assay durchgeführt.

III.3.2.1 Immobilisierungsbedingungen für Antikörper an Epoxypartikeln

Um eine optimale Ausnutzung der Oberfläche von Epoxypartikeln zu erreichen wurden Bedingungen für eine maximale Kopplungsausbeute untersucht. Dazu wurden Antikörper unter verschiedenen Pufferbedingungen und pH-Werten an Epoxyartikel gebunden. Anschließend wurden Lysozym-Sandwich-ELISA mit elektrochemischer Detektion durchgeführt. Zwischen den Messungen wurde der H2-Biochip mit 0,5 % SDS in PBS gespült und mit 1 % BSA erneut belegt. Danach wurden pAPP-Messungen an dem belegten Biochip durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen der vorhergehenden Messung auszuschließen.

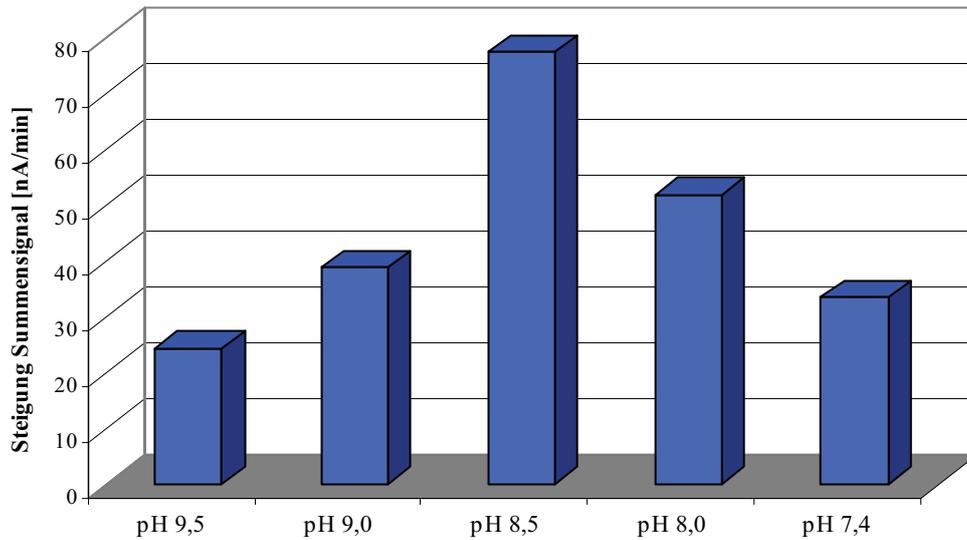


Abb. 57: On-Chip-Messungen von Lysozym-Sandwich-ELISA-Analysen nach unterschiedlichen Immobilisierungsbedingungen der Fängerantikörper an Epoxypartikeln

Je 100 µg Epoxypartikel wurden mit 10 µl einer Fängerantikörperlösung und 90 µl PBS pH 7,4 oder 8,0 bzw 0,1 M Boratpuffer pH 8,5, 9,0 oder 9,5 versetzt und über Nacht bei RT unter Rollen inkubiert. Nach Waschen mit 100 µl PBS wurden die Partikel für 4 h mit 3 % BSA in PBS inkubiert, anschließend erneut gewaschen und je 48 µg auf einen mit BSA belegten H2-Biochip transportiert und durch einen unter dem Chip platzierten Magneten direkt auf den Mikroelektroden immobilisiert. Anschließend fanden on-chip jeweils 5minütige Inkubationsschritte mit 100 ng/ml Lysozym (5 min), biotinylierten anti-Lysozym-Antikörpern 1:5000 mit 1 % BSA in PBS und Ex-AP 1:2500 mit 1 % BSA in TBS statt. Die Detektion des Immunokomplexes erfolgte durch Messung mit 5 mM pAPP in TBS bei +350 mV und -50 mV bei einer Flußrate von 90 µl/min.

Aus der resultierenden Steigung des Summensignals der Mikroelektroden (Abb. 57) ist ersichtlich, daß bei Verwendung von 0,1 M Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,5 das Optimum der funktionalen Immobilisierung von Fängerantikörpern an Epoxypartikeln liegt.

III.3.2.2 Lysozym-Nachweis on-chip an Magnetpartikeln

Bei on-chip-Assays wurde der Sandwich-ELISA ebenso wie die Detektion komplett auf dem Biochip durchgeführt (Abb. 56). Nachdem das System luftblasenfrei gespült war, wurden die Antikörperpartikel auf den Biochip transportiert und durch einen Magneten auf den Mikroelektroden fixiert. Die Protein- und Waschlösungen wurden nacheinander über die Antikörperpartikel gepumpt. Bei einer Flußrate von 100 µl/min dauerte es 60 sec, bis die Lösungen die Strecke von ihrem Vorratsgefäß bis kurz hinter die Durchflußzelle zurückgelegt hatten. Durch Pufferzusätze wie 0,05 % Tween 20 und 1 % BSA sowie längere Waschzeiten sowie Einführung von Inkubationszeiten nach Transport der Proteinlösungen auf die Magnetpartikel konnte eine Reduzierung des Hintergrundsignals erreicht werden. Zur

III. Ergebnisse

Durchführung von Immunoassays on-chip wurde nach Vorversuchen und Optimierungen das unter II.2.1.6 beschriebene Schema angewandt.

Vor der eigentlichen Messung wurde mit den reversibel immobilisierten Partikeln eine Nullkontrolle mit 1 %iger BSA-Lösung anstelle des Zielproteins durchgeführt. Nach dem Assay wurden die Magnetpartikel von dem Biochip durch das Durchleiten von Luftblasen entfernt und mit einer frischen Partikeln beladen (Abb. 58).

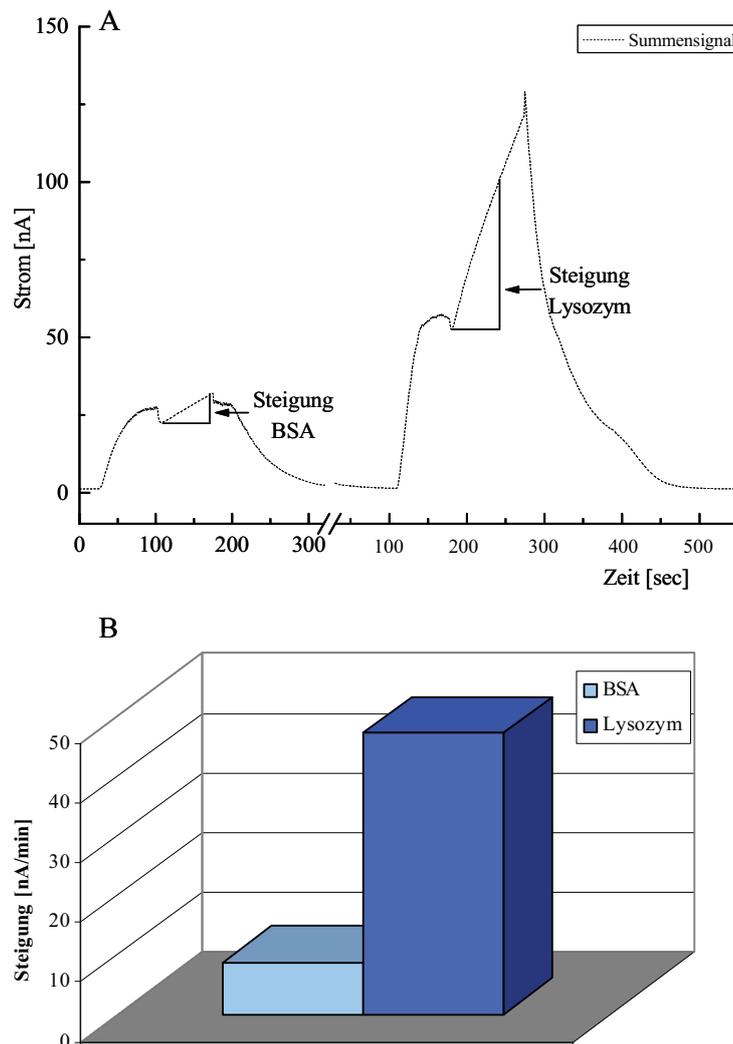


Abb. 58: Lysozym-Assay on-chip

A: Der Assay wurde nach in III.3.2.2 beschriebenem Schema durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine Negativkontrolle mit BSA anstelle des Zielproteins durchgeführt und das Summsignal ausgelesen. Anschließend wurde an neuen Partikeln der Assay zur Detektion von 100 ng/ml Lysozym analog durchgeführt.

B: Graphische Darstellung der Steigung der in A gezeigten Summsignale.

III.3.2.3 Magnetpartikel-Vergleich

Es wurden Magnetpartikel mit verschiedener Oberflächenbeschaffenheit auf ihre Eignung als feste Phase für die Kopplung von Fängerantikörpern hin untersucht. In Tabelle 10 sind die unterschiedlichen Merkmale aufgelistet.

Bezeichnung	Durchmesser [nm]	Bindungskapazität [pmol/μg]	Material
Epoxyartikel	700-1000	220	Polyvinylalkohol
Carboxypartikel	700-1000	480	Polystyrol

Tab. 10: Eigenschaften eingesetzter Magnetpartikel

An die Magnetpartikel wurden Fängerantikörper nach II.2.1.5 immobilisiert, zum direkten Vergleich Sandwich-Immunoassays auf einem H2-Biochip jeweils mit Lysozym sowie BSA als Negativkontrolle durchgeführt und elektrochemisch vermessen (Abb. 59). Bei der Kopplung von Antikörpern an Carboxypartikel wurde ausschließlich mit EDC/NHS im wässrigen Milieu aktiviert, da die Partikel nach Herstellerangaben nur bedingt stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln wie DMF waren.

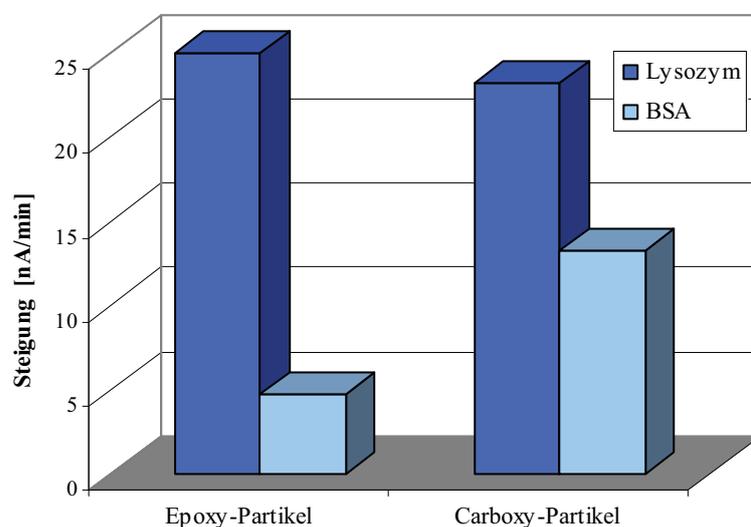


Abb. 59: Sandwich-ELISA mit Lysozym an unterschiedlich funktionalisierten Magnetpartikeln

Nach Kopplung von anti-Lysozym-Fängerantikörpern an Carboxy- bzw. Epoxyartikel (s. II.2.1.5) wurden je 25 μg davon auf einen H2-Biochip gebracht und durch einen Magneten auf den Mikroelektroden immobilisiert. Anschließend wurden on-chip Lysozym-Sandwich-ELISA mit vorgelagerter Kontrollmessung mit BSA anstelle des Zielproteins und anschließend mit 100 pg/ml Lysozym durchgeführt. Der Assay wurde durch eine Abfolge von fünfminütigen Inkubationen von biotinylierten anti-Lysozym-Antikörpern 1:5000 mit 1 % BSA in PBS und Ex-AP 1:2500 mit 1 % BSA in TBS sowie dazwischenliegenden ebenfalls fünf Minuten dauernden Waschschritten durchgeführt. Die Detektion des Immunkomplexes erfolgte durch Messung mit 5 mM pAPP in TBS bei +350 mV und -50 mV bei einer Flußrate von 95 μl/min.

III. Ergebnisse

Das Positivsignal ist bei beiden Partikelpopulationen ungefähr gleich groß, allerdings war bei den Epoxypartikeln das Signal/Hintergrund-Verhältnis mit 5,2:1 eindeutig besser als das bei Carboxypartikeln mit 1,7:1.

III.3.2.4 Optimierung on-chip-Assays

Regeneration der AK-Partikel on-chip

Hierzu wurde zunächst ein Lysozym-Sandwich-ELISA on-chip durchgeführt und vermessen. Anschließend wurde mittels 50 mM Glycinpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Inkubationszeiten versucht, das Zielprotein mit dem Detektionskomplex von den Fängerantikörper-Partikeln auf einem H2-Biochip abzutrennen. Es konnte zwar eine Reduzierung des Signals durch diese Regenerationsschritte erreicht werden (Abb. 60), jedoch nicht in ausreichendem Maße. Nach Spülen mit 50 mM Glycinpuffer pH 2,2 war noch 50 % des ursprünglichen Signals vorhanden.

Auf eine Regenerierung der Partikel wurde nach Bildung eines Immunokomplexes verzichtet und für jede Messung frische Antikörperpartikel verwendet.

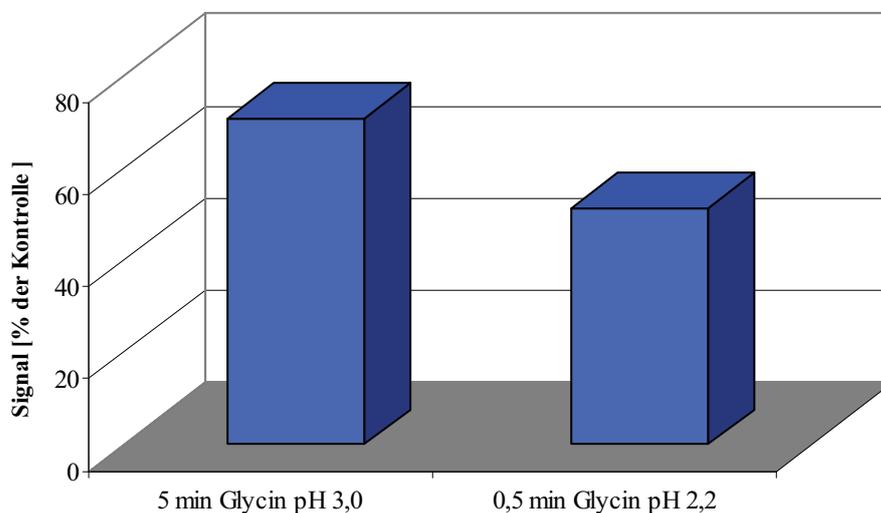


Abb. 60: Regenerierungsversuch von Magnetpartikeln auf einem H2-Biochip

Epoxy-Magnetpartikel wurden nach Durchführung eines Lysozym-Sandwich-ELISA für 5 min 50 mM Glycinpuffer pH 3,0 exponiert und anschließend mit 5 mM pAPP nach Äquilibrierung mit TBS pH 8,0 vermessen. Anschließend wurde die Prozedur wiederholt, nachdem die Partikel für 30 sec mit 50 mM Glycinpuffer pH 2,2 umspült wurden. Die erhaltenen Steigungen der Summensignale wurden in Beziehung zum Signal des Lysozym-Sandwich-ELISA gesetzt.

Regenerierung von Biochips

Um kontinuierliche Messungen ohne aufwendiges Zerlegen der Flußzelle zu ermöglichen, mußten alle Magnetpartikel nach einer Messung von dem eingespannten Biochip entfernt werden. Eine partielle Reinigung der Mikroelektroden wurde zunächst durch Entfernung des Magneten und Erhöhung der Flußgeschwindigkeit erreicht. Ein Teil der Magnetpartikel blieb allerdings weiterhin auf der Oberfläche haften, woraufhin durch Pufferzusätze wie Tween 20 oder SDS in Konzentrationen bis zu 2 % versucht wurde, die Magnetpartikel von den Mikroelektroden zu entfernen. Der Aufbau und das Material der Durchflußzelle (Abb. 12) erlaubten eine visuelle Kontrolle der Reinigungseffizienz. Für eine komplette Reinigung jedoch stellte sich das Durchleiten von mehreren kleinen Luftblasen in Kombination mit 0,5 % SDS als effektivste Methode heraus (Abb. 61). Nach jedem Reinigungsschritt wurde eine pAP-Messung zur Überprüfung der Belegungsdichte von BSA sowie eine pAPP-Messung zur Überprüfung der Abwesenheit von Magnetpartikeln mit aktiven Immunokomplexen durchgeführt. Durch einen 1 %igen BSA-Zusatz in den Puffern wurden eventuell entfernte Blockierungsmoleküle wieder ersetzt.

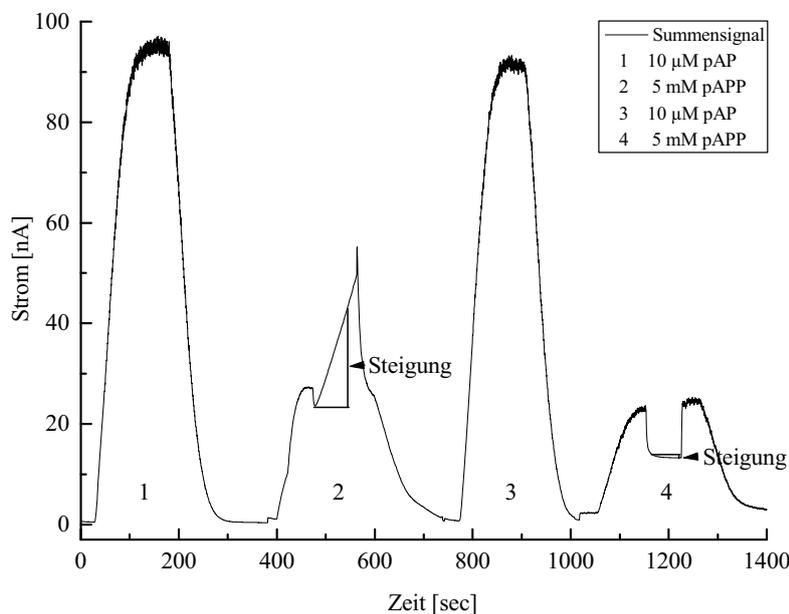


Abb. 61: Regenerierung H2-Biochip

Nach Belegung der Mikroelektroden mit 3 %iger BSA-Lösung wurde die Belegungsdichte durch eine Messung mit 10 µM pAP (1) durchgeführt. Es folgte ein Lysozym-Sandwich-ELISA nach III.2.2 und anschließender Detektion mit 5 mM pAPP. Danach wurde der Magnet entfernt, das System für 1 min mit 0,5 % SDS in PBS und 2-3 Luftblasen gespült und für 5 min mit 0,1 M NaCl-Lösung äquilibriert. Nach einer Messung mit 10 µM pAP (3) fand eine Äquilibrierung mit TBS pH 8,0 mit anschließender Messung mit 5 mM pAPP (4) statt. Alle Messungen wurden bei +350 mV und -50 mV bei einer Flußrate von 87 µl/min durchgeführt.

III. Ergebnisse

Entstehende Luftblasen im Schlauchsystem der Apparatur konnten Messungen unauswertbar machen, da diese aufgrund des geringen Volumens der Durchflußzelle die auf dem Biochip fixierten Magnetpartikel teilweise entfernten. Außerdem wurde bei Unterbrechung des Kontaktes zwischen Referenz- und Mikroelektroden durch den Potentiostaten das an den Elektroden herrschende Potential aufgrund fehlender Referenz in Bereiche gebracht, die zerstörend auf empfindliche Substanzen wie Proteine wirkten.

Die Entwicklung störender Luftblasen innerhalb des Systems konnte durch die Entgasung aller verwendeten Puffer bei Raumtemperatur erheblich reduziert werden. Da die Proteinlösungen zwischen den Messungen aber bei 4 °C gelagert wurden, bestand die Gefahr, daß die erneut gelösten Gase beim Transport durch das System freigesetzt wurden. Dies geschah bevorzugt an rauhen, kantigen Stellen wie Schlauchübergängen oder innerhalb der Durchflußzelle.

Eine weitere Möglichkeit war die Durchführung der Inkubationsschritte außerhalb des Potentiostaten, bei denen der eingespannte Biochip aus der Halterung entfernt wurde.

III.3.2.5 Einsatz monoklonaler Fängerantikörper

Weiterhin wurde eine Verwendung monoklonaler Agenzien als Fängerantikörper untersucht. Monoklonale Agenzien eignen sich als Fängermoleküle, da in diesem Fall das Zielprotein gerichtet immobilisiert wird und das polyklonale Serum die multiplen Epitope erkennen kann, ohne daß es zu Verdrängungen oder Vernetzungen kommt.

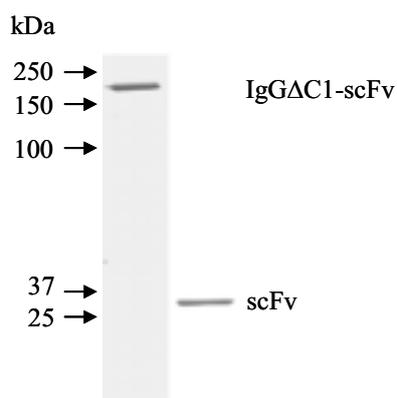


Abb. 62: Monoklonale Agenzien zur Verwendung in einem ELISA
Western-Blot des IgGΔC1-Konstruktes (80 µg/ml) nach Expression in Hefe-Zellen und Reinigung über eine Protein A-Matrix nach saurer Elution und hyHEL10-scFv nach Expression in *E. coli* und Reinigung über Ni-NTA-Matrix nach Elution mit mit Imidazol. Aufgetragen sind jeweils 20 µl Probe, die mittels PAGE getrennt und nach dem Protein Transfer auf eine Membran mit Anri-myc-AP 1:2000 mit 1% BSA in TBS markiert und nach Zugabe von NBT/BCIP detektiert wurden.

Dazu wurden sowohl scFv-Fragmente als auch IgGΔC1-scFv-Konstrukte (Abb. 7) verwendet. Grundlage der monoklonalen Agenzien war der gegen Lysozym gerichtete hyHEL10-scFv (Smith-Gill *et al.* 1984). Dessen variable Regionen der schweren und leichten Kette wurden

III. Ergebnisse

zur Steigerung der Bindungswalenz in eine IgG Δ C1-scFv-Expressionskassette kloniert und in Hefe-Zellen exprimiert (Spillner 2002). Beide Agenzien wurden nach Expression und Reinigung zur Verfügung gestellt (Abb. 62), wobei das apparente Molekulargewicht des IgG Δ C1-scFv von dem berechneten von ca. 130 kDa abweicht. Dieses ist wahrscheinlich auf die Glykosylierung zurückzuführen.

In einem Immunoassay mit elektrochemischer Detektion wurden sowohl polyklonale IgG als auch das IgG Δ C1-scFv-Konstrukt gegen Lysozym unter gleichen Bedingungen an Epoxy-partikel gekoppelt. Der Sandwich-Immunoassay wurde außerhalb der Meßapparatur nach II.2.1.6 durchgeführt und elektrochemisch detektiert (Abb. 63).

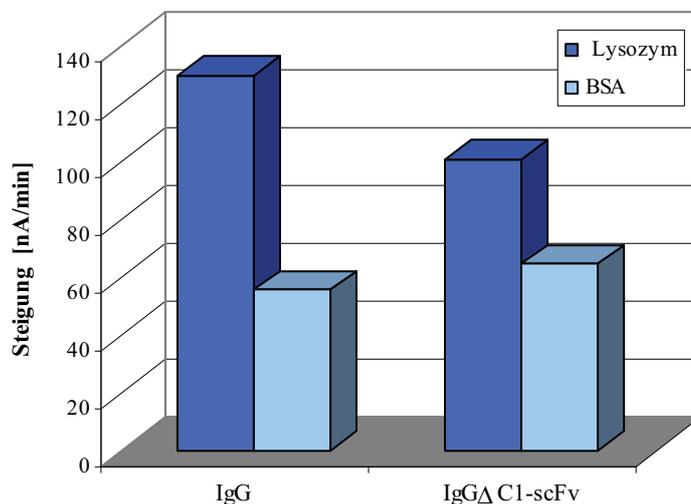


Abb. 63: Lysozym-Sandwich-ELISA mit polyklonalen IgG- und monoklonalen IgG Δ C1-scFv-Fängerantikörpern mit elektrochemischer Detektion auf einem H2-Biochip

Nach Aktivierung von 50 μ g carboxylmodifizierten Magnetpartikeln mit EDC/NHS wurden IgG- bzw IgG Δ C1-scFv-Antikörper an die Oberfläche gekoppelt. Anschließend wurde mit 3 % BSA blockiert und Sandwich-ELISA mit je 10 μ g Partikeln in Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurde nacheinander mit 100 ng/ml Lysozym bzw. 10 mg/ml BSA, biotinylierten Anti-Lysozym-Antikörper 1:2500 und Ex-AP 1:2500 inkubiert. Anschließend wurden zunächst die Partikel der Negativkontrolle auf einen mit 3 % BSA präinkubierten H2-Biochip überführt und in die Meßapparatur eingespannt, nach der Messung wurde die Prozedur mit den Lysozym-Partikeln wiederholt. Die Messung fand nach Zugabe von 5 mM pAPP bei +350 mV und -50 mV bei einer Flußrate von 89 μ l/min statt.

Das Signal der polyklonalen Assay-Variante liegt um den Faktor 1,3 höher als das der heterogenen. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis ist bei der Verwendung polyklonaler Fängerantikörper mit 2,3:1 im Gegensatz zu 1,6:1 bei monoklonalen Fängerantikörpern deutlich besser.

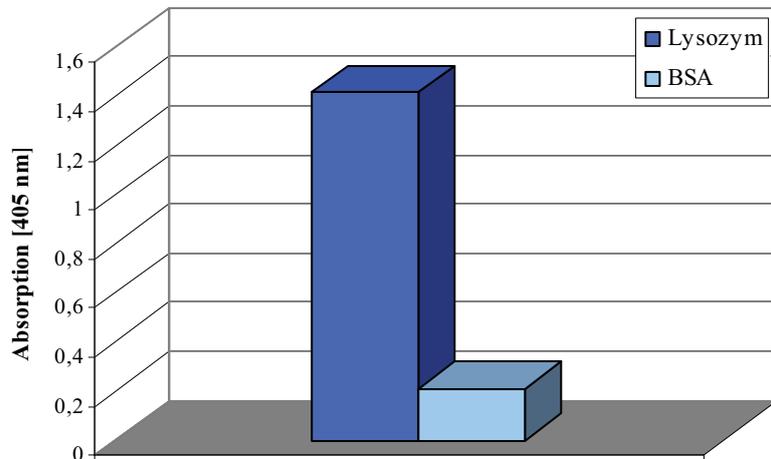
III. Ergebnisse

In einem optischen Immunoassay im Sandwich-Format mit polyklonaler Detektion wurde überprüft, ob sich monovalente scFv als Fängermoleküle eignen. Unter Verwendung des gegen Lysozym gerichteten hyHEL10-scFv konnten 10 ng/ml Lysozym detektiert werden (Abb. 64).

Das eindeutige Ergebnis zeigt ein Signal/Rausch-Verhältnis von 6,6:1. Somit wurde ein Modellsystem zur elektrochemischen Detektion mittels Sandwich-ELISA mit polyklonalen Fänger- und polyklonalen Detektionsmolekülen ebenso etabliert wie ein optisches System mit monoklonalen Fänger- und polyklonalen Detektionsmolekülen.

Abb. 64: Heterogener Lysozym-Sandwich-ELISA

Die Inkubation von 10 ng/ml Lysozym für 2 h bei RT erfolgte nach Immobilisierung von hyHEL10-scFv in Kavitäten einer ELISA-Platte. Anschließend wurde das Protein mit biotinylierten Anti-Lysozym-IgG 1:2500 markiert und der Immunokomplex mit Ex-AP 1:2500 nach 50 min Inkubation in Gegenwart von 13 mM pNPP bei 405 nm detektiert.



III.4 Toxin-Nachweise mittels Sandwich-ELISA

Die Toxine wurden nach Erhalt in den entsprechenden Puffern verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Messungen wurden frische Aliquots aufgetaut und direkt verwendet, da bei BoNT A bereits nach einer Woche Lagerung bei 4 °C eine Degradierung beobachtet wurde (Abb. 65). Die geringe vorhandene Menge SEB verhinderte eine derartige Untersuchung. Die Detektion von Toxinen sollte durch Übertragung des zuvor mit Lysozym in einem Modellsystem etablierten Sandwich-ELISA mit monoklonalen Fänger- und polyklonalen Detektionsantikörpern durchgeführt werden. Neben diesem System wurden weitere Kombinationsmöglichkeiten mit den vorhandenen Komponenten getestet, wobei die rein monoklonalen oder rein polyklonalen ELISA-Verfahren unter Einsatz von scFv oder Seren erst nach Markierung der Detektionsantikörper durchgeführt werden konnten. Die Markierung wurde durch kovalente Verknüpfung mit einer aktivierten Biotingruppe nach II.2.5.13 durchgeführt.

III. Ergebnisse

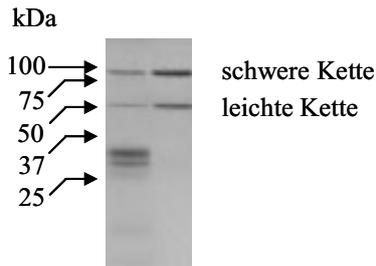


Abb. 65: Stabilität von BoNT A nach 7 Tagen Lagerung bei 4 °C
Deutlich zu erkennen sind in diesem 7 %igen PA-Gel die schwere und leichte Kette des Toxins, deren Konzentration nach längerer Lagerung (linke Bahn) abnimmt während Degradierungsprodukte sichtbar werden.

Aus Abb. 66 wird deutlich, daß sich die monoklonale Sandwich-Variante weder für SEB noch für BoNT A nicht als angemessenes Detektionsformat eignet. Das heterogene Sandwich-Verfahren mit scFv als Fänger- und polyklonalen IgG als Detektionsantikörpern zeigte im Gegensatz zum Modellsystem kein Signal. Erst bei recht hohen Konzentrationen von 10 µg/ml wurde ein Signal sichtbar, allerdings dann auch sehr unspezifisch bei anderen Fängerantikörpern. Für SEB erwies sich nur der polyklonale Ansatz als praktikabel. Es wurde in Konzentrationen bis zu 100 ng/ml mit Signal/Hintergrund-Verhältnissen von 12,3:1 gemessen. BoNT A konnte in dieser Konzentration nur mit einem Signal/Hintergrund-Verhältnis von 1,5:1 nachgewiesen werden.

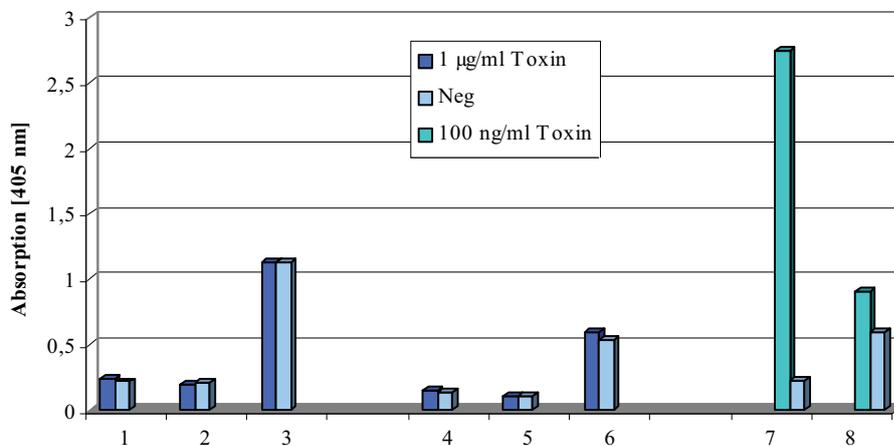


Abb. 66: Monoklonale (1-3), heterogene (4-6) und polyklonale (7-8) Sandwich-ELISA

Nach Belegung von Kavitäten einer ELISA-Platte mit S26 (1 und 5), S2 (2 und 4), B5 (3 und 6), Anti-SEB-Serum (7) und Anti-BoNT-Serum (8) wurden die Toxine in Konzentrationen von 1 µg/ml (1-6) bzw. 100 ng/ml (7-8) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit biotinylierten Detektionsantikörpern S2-bt (1), S26-bt (2), BIII-1-bt (3) in Verdünnungen von 1:2, Anti-SEB-Serum 1:2500 (4-5), Anti-BoNT-Serum 1:100 (6), biotinyliertem Anti-SEB-Serum 1:2500 (7) oder biotinyliertem Anti-BoNT-Serum 1:100 (8) mit jeweils 1 % BSA in PBS für 1h bei RT inkubiert. Die Markierung der biotinylierten Komponenten (1-3 und 7-8) wurde mit Ex-AP 1:2500 mit 1 % BSA in TBS durchgeführt, für die Sera Anti-Kaninchen-AP- (4-5) und Anti-Pferd-AP-Konjugat (6) ebenfalls 1:2500 mit 1 % BSA in TBS eingesetzt und für je 50 min bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 13 mM pNPP in TBS und Messung bei 405 nm. Die Negativkontrollen verliefen analog, nur wurde mit 1 % BSA anstelle der Toxine inkubiert.

IV. Diskussion

Nach der Sequenzierung des humanen Genoms (Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001) und der Etablierung einer Vielzahl von darauf aufbauenden DNA-Nachweissystemen gewinnen Detektionssysteme für Proteine, z.B. Protein-Arrays oder Verfahren zur Identifizierung einzelner Proteine, für Wissenschaft und Diagnostik zunehmend an Bedeutung.

Die Detektion von Proteinen ist im Gegensatz zu anderen biologischen Agenzien ungleich aufwendiger, da sich das vorhandene Analysenmaterial nicht wie z.B. bei DNA durch PCR, bei Bakterien oder Viren durch Kultivierung vervielfältigen läßt. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Replikationsprozesses für Proteine sind bei der Etablierung solcher Verfahren Signalverstärkungssysteme einerseits und Maßnahmen zur Minimierung von unspezifischen Wechselwirkungen, die zu falschpositiven Signalen führen, andererseits von besonderem Interesse.

Bei Biosensoren (Abb. 1) hängt die Spezifität der Detektion von den Eigenschaften der biologischen Komponente sowie der Stringenz der Reaktionsbedingungen ab, während die Sensitivität hauptsächlich durch die Beschaffenheit des Transduktors gegeben ist. In dieser Arbeit verwendete Transduktoren bestanden aus kammartig verzahnten interdigitalen Array-Elektroden, an denen Redoxprozesse abliefen. Durch paralleles Auslesen von acht Mikroelektroden eines Biochips (Hintsche *et al.* 1994) sowie durch das an den Elektroden stattfindende Redox-Recycling der elektroaktiven Substanz (Niwa *et al.* 1993) wurden bereits zwei etablierte Verfahren zur Steigerung der Empfindlichkeit angewandt. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit werden in nichtradioaktiven biologischen Assays außerdem eine Reihe von Verstärkungssystemen verwendet (Lottspeich und Zorbas 1998), von denen in der vorliegenden Arbeit die Vergrößerung der Oberfläche zur lokalen Konzentrierung des Zielproteins, die Verwendung verschiedener Markerenzyme sowie von Antikörpern im Sandwich-Format untersucht worden sind.

IV.1 Modifizierung von Münzmetalloberflächen

Das Oberflächenmaterial von Transduktoren in Biosensoren besteht meistens aus Glas, Halb-, Übergangs- oder Edelmetallen und besitzt somit auch hydrophobe Eigenschaften. Um eine Immobilisierung von Affinitätsmolekülen zu ermöglichen und eine Biokompatibilität der mit

der Analytlösung in Kontakt stehenden Meßfläche zu gewährleisten, wird diese mit unterschiedlichen Reagenzien beschichtet (Löfas und Johnsson 1990, Disley *et al.* 1999). Ein wichtiger Aspekt bei der elektrochemischen Detektion ist der Erhalt der Zugänglichkeit der Transduktoroberfläche, bei dem verwendeten System interdigitale Array-Elektroden auf Biochips, für Redox-Mediatoren nach einer Beschichtung.

Eine Belegungsschicht diene einerseits dem Schutz der Mikroelektroden und war außerdem von Vorteil, da Elektrolyseprodukte die an der Oberfläche stattfindenden Affinitätsreaktionen nicht beeinträchtigten. Als elektrochemisch aktive Molekülsorte diene pAP, das an den Mikroelektroden iterativ oxidiert und reduziert wurde. Mit der Ermittlung des dynamischen Meßbereiches wurden die Grenzkonzentrationen festgelegt, die das Detektionssystem erfassen kann (Abb. 16).

IV.1.1 Oberflächenmoleküle für zweidimensionale Schichten

Um eine ideale monomolekulare Beschichtung von Mikroelektroden zu erreichen, wurde mit schwefelhaltigen Oberflächenmolekülen der Aufbau von zunächst zweidimensionalen SAMs auf der Goldoberfläche durchgeführt (Pierrat *et al.* 1997). Eine weitere Funktionalisierung der Moleküle sollte als Ausgangspunkt für spätere Modifikationen oder die direkte Kopplung von Biomolekülen dienen. Die Thioverbindungen 11-MUS, eine langkettige Carbonsäure, und p-Mercaptoanilin, ein aromatisches Amin, wurden als Oberflächenmoleküle für Beschichtungen verwendet. Die jeweiligen Belegungsdichten wurden durch amperometrische Messung des Redoxverhaltens von pAP vor und nach der Modifikation ermittelt. Bei der Verwendung von 11-MUS konnte festgestellt werden, daß bei Zugänglichkeiten ab 8 % ein verwertbares Signal erhalten werden konnte. Die Belegung von Biochips mit zweidimensionalen Schichten konnte außerdem in Echtzeit (Abb. 18) verfolgt werden, wodurch sich eine deutlich kürzere Präparationszeit ergab. Die Verwendung von p-Mercaptoanilin und einem kurzkettingen Thioalkohol sollte in einem gemischten SAM resultieren, bei dem der Thioalkohol die Zwischenräume der aufgereihten aromatischen Moleküle füllen und so als Abstandhalter fungieren sollte (Herne und Tarlov 1997). Thiole mit mehr als sechs Methylengruppen wurden nicht eingesetzt, da solche in vorangegangenen Studien p-Mercaptoanilin von der Goldoberfläche verdrängt hatten (Sabatani *et al.* 1993). Nach der Beschichtung resultierte das Anlegen der Meßspannung in einer nahezu vollständigen Abschirmung der Mikroelektroden. Da bei p-Mercaptoanilin im Vergleich zu pAP der Phenol-Sauerstoff durch ein Schwefelatom substituiert ist, könnten diese Moleküle wahrscheinlich einen analogen Redox-Prozeß

durchlaufen haben. Die Ergebnisse lassen allerdings darauf schließen, daß ein irreversibler Prozeß stattfand. Die Moleküle waren direkt an der Elektrodenoberfläche immobilisiert und besaßen ein π -Elektronen-System, so daß sie wahrscheinlich entweder bei Anlegen der Meßspannung elektropolymerisiert wurden oder einen sehr dichten SAM bildeten und dadurch weitere Elektronendurchtritte verhinderten.

Die beobachtete elektrochemische Passivierung könnte allerdings für andere Applikationen von Nutzen sein, z.B. für Impedanz-Messungen, bei denen nichtleitende Schichten auf Transduktoren benötigt werden, oder für optische Biosensoren.

IV.1.2 Oberflächenmoleküle für dreidimensionale Schichten

Mit der Verwendung dreidimensionaler Matrices als Belegungsreagenzien wurde die Absicht verfolgt, die effektive Oberfläche für die Immobilisierung von Antikörpern zu vergrößern. Im Hinblick auf einen einfachen Herstellungsprozeß war es von Vorteil, die für die Beschichtung und Kopplung notwendigen Modifikationsschritte auf dem Biochip so unkompliziert wie möglich zu gestalten. Es wurden keine komplexen Festphasensynthesen durchgeführt, da Teile der fertiggestellten Biochips empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln waren. Es lösten sich z.B. die positionsbegrenzenden SU-8-Polymer-Ringe der Array-Biochips in Gegenwart von Aceton ab und der Verkappungskleber für die Verbindungsdrähte, der sich in unmittelbarer Nähe der Goldstrukturen befand, stellte sich als nicht resistent gegenüber DMF heraus.

Für eine Verankerung von makroporösen Strukturen auf Goldoberflächen wurde die Inkorporation von Disulfidgruppen favorisiert, da hier die Schwefelatome im Gegensatz zu Thiolen vor Oxidation geschützt sind. Die Adsorption des Schwefels an Goldoberflächen ist trotz der erhöhten Oxidationszahl dabei nicht beeinträchtigt, da Chemisorptionsstudien von Disulfiden an Goldoberflächen keine Unterschiede in der Homogenität der Beschichtung gezeigt haben (Ulman 1996). Weiterhin sind bei der Chemisorption von gemischten Disulfiden äquivalente Mengen der beiden Thioverbindungen auf der Oberfläche nachgewiesen worden (Ulman 1996).

Polysaccharidstrukturen werden seit längerem in kommerziell erhältlichen Biosensoren für die Beschichtung von Transduktoroberflächen eingesetzt (Bergström 1990, Löfas und Johnsson 1990). Carboxymethyl-Cellulose (CMC) gehört zu der Gruppe der Hydrogele, die als hydrophile Polymere ohne immunogene Eigenschaften für kontrollierte Arzneimittelfreisetzungen im Körper verwendet werden (Kim *et al.* 1992, Mohammed 2001).

Weiterhin zeichnen sie sich, bedingt durch die Porosität ihres Polymernetzwerkes, durch eine annähernd freie Diffusion kleiner wasserlöslicher Moleküle aus. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden mehrere Vertreter dieser Klasse als Oberflächenmoleküle untersucht (Tab. 4).

CMC wurde als zu modifizierendes Hydrogel gewählt, da es die entscheidenden Vorteile der guten Wasserlöslichkeit und bereits vorhandene funktionelle Gruppen zur Anbindung von Antikörpern besaß. Die Einführung einer Disulfidgruppe gelang nach Aktivierung von DTP in getrocknetem Pyridin. Die Reinigung des Rohproduktes mußte zunächst ebenfalls mit getrocknetem Pyridin erfolgen, da die Zugabe von H₂O oder verdünntem Pyridin in sofortiger Gelbildung des Polysaccharids und damit in Ausbeuteverlusten resultierte. Eine komplette Entfernung des Pyridins wurde durch Evaporation im Vakuum und anschließender Dialyse erreicht und durch Elementaranalyse bestätigt. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte (Frazier *et al.* 2000), war der festgestellte DTP-Derivatisierungsgrad des Produktes zur Verankerung des Polysaccharids auf Goldoberflächen ausreichend.

Ein weiterer Ansatz zur multivalenten Anhaftung von Affinitätsmolekülen bestand in der Immobilisierung dendritischer Strukturen auf der Elektrodenoberfläche (Singh *et al.* 1994, Tomalia 1993). Diese symmetrisch verzweigten Moleküle wurden dazu, ebenso wie das Hydrogel, mit Disulfidgruppen modifiziert. In einer zweistufigen Synthese wurde zunächst die Schwefelmarkierung mit einer guten Ausbeute eingeführt. Durch die Verwendung von halbaktivierter DTP wurde das Dendrimer gleichzeitig mit Säurefunktionen versehen. Im darauf folgenden Syntheseschritt sollten die verbliebenen Aminogruppen mit Bernsteinsäureanhydrid amidisch verknüpft werden. Für die Charakterisierung des resultierenden thio- und carboxylmodifizierten Dendrimers **5** konnten trotz Verwendung unterschiedlicher Matrices weder ESI- noch MALDI-TOF-Spektren erhalten werden. Über eine Elementaranalyse und HPLC-Chromatogramme, die aufgrund der neu gebildeten Amidbindung zusätzlich bei 215 nm aufgenommen wurden (Abb. 28), konnte dennoch die Umwandlung von zehn der dreizehn übrigen Amino- in Carboxylgruppen bestätigt werden.

Die synthetisierten Moleküle wurden zusammen mit unterschiedlichen Biopolymeren (Tab. 4) durch Redox-Recycling von pAP an den beschichteten Mikroelektroden auf ihre Permeationseigenschaften hin untersucht. Die Bildung von dreidimensionalen Strukturen auf

der Chipoberfläche konnte anhand der Diffusionshemmung des Redox-Mediators, die über die Steigung des pAP-Signals ermittelt wurde, festgestellt werden.

Von den untersuchten dreidimensionalen Strukturen stellte sich Agarose als am geeignetsten für eine Beschichtung heraus. Weiterhin war es das einzige Biopolymer, das im Gegensatz zu allen anderen ohne zusätzliche Modifikation auf den Mikroelektroden einen optisch erkennbaren Film bildete (Abb. 20), da es nach Abkühlung erstarrte. Bei den übrigen Molekülen blieben nach dem Spülen wahrscheinlich monomolekulare Schichten zurück, die die beobachteten Eigenschaften besaßen. Der einzige Nachteil bei der Verwendung von Agarose ist das Fehlen einer leicht zugänglichen funktionellen Gruppe, über die Affinitätsmoleküle immobilisiert werden können.

Dextran besaß nach Agarose die besten Beschichtungseigenschaften. Allerdings wäre hier eine doppelte Modifikation des Hydrogels nötig, eine für die Fixierung des Polysaccharids auf dem Transduktor und eine weitere für die Immobilisierung von Biomolekülen.

Zusammen mit Agarose ist CMS ein recht großporiges Polymer mit guten Permeationseigenschaften, konnte allerdings nur mit 0,1 M NaOH in Lösung gebracht werden.

Chitosan ist schwer löslich und wurde bei RT nach Versetzen mit 1 M HCl (Horowitz *et al.* 1957) von nichtlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Dadurch wurde ein Teil der Glukosamine deacetyliert und das Polymer in Lösung gebracht. Aufgrund der Löslichkeitsbedingungen wurde es, ebenso wie CMS, nicht weiter verwendet.

CMC zeigte im Vergleich zu zweidimensionalen SAMs aus 11-MUS eine verbesserte Elektrodenzugänglichkeit. Die hohe Diffusionshemmung der pAP-Moleküle läßt sich nur auf die Bildung mehrerer Schichten zurückführen, da bei der kontrollierten Schichtenbildung von t-CMC nur eine geringe Hemmung beobachtet wurde (Abb. 24). Die Zugänglichkeit konnte durch die Verwendung von t-CMC im Vergleich zum unmodifizierten Hydrogel deutlich gesteigert werden. Nach der Belegung von Mikroelektroden eines 200 μm -Array-Biochips überstieg die Bindungskapazität von t-CMC diejenige einer 11-MUS-Schicht um den Faktor drei. Allerdings wies das dreidimensionale Hydrogel ein etwas schlechteres Signal/Hintergrund-Verhältnis gegenüber dem zweidimensionalen SAM auf, an dem offenbar weniger unspezifische Adsorptionen stattfanden als am Polysaccharid. Die Ergebnisse lassen eine Verwendung des Hydrogels aufgrund der verbesserten Elektrodenzugänglichkeit und der Signalsteigerung von Vorteil erscheinen, allerdings muß die vorherige synthetische

Modifizierung sowie ein vermindertes Signal/Hintergrund-Verhältnis in Kauf genommen werden.

Die Zugänglichkeit von Dendrimer **5** war mit der einer zweidimensionalen 11-MUS-Schicht vergleichbar. Die signifikante Diffusionshemmung deutete allerdings auf eine die Mikroelektroden abschirmende dreidimensionale Struktur hin.

Zum direkten Vergleich der Belegungsreagenzien 11-MUS, t-CMC und Dendrimer **5** wurde ein Sandwich-ELISA an einem 400 μm -Array-Biochip mit Lysozym als Zielprotein durchgeführt. Dendrimer **5** stellte sich als Oberflächenmolekül mit den besten Eigenschaften in bezug auf die Signalhöhe und das Signal/Hintergrundverhältnis heraus (Abb. 55). Ein Dendrimer besitzt eine globuläre Form, bei der die Säurefunktionalitäten auf der Oberfläche für zu koppelnde Moleküle gleichmäßig zugänglich sind. Das Hydrogel t-CMC stellt dagegen eine poröse Polymerstruktur dar, die die Diffusion kleiner Moleküle zwar problemlos ermöglicht, große Proteine wie Antikörper jedoch stärker hemmt und diese nicht weit in die Struktur eindringen können. Jede Glukose-Untereinheit ist bei dem verwendeten t-CMC statistisch mit 1,2 Carboxymethylgruppen versehen, die auch im Inneren des Polymers aktiviert werden, jedoch aufgrund der Molekülgröße und Abschirmung von bereits an der Oberfläche gebundenen Proteinen eher durch Lösungsmittelmoleküle deaktiviert werden.

Generell konnte gezeigt werden, daß sich ein offenes, dreidimensionales Gerüst als Beschichtungsreagenz besser eignete als ein poröses Hydrogel oder ein zweidimensionaler SAM. Aufgrund der geringen Größe von Dendrimermolekülen kann wahrscheinlich eine höhere Dichte von gut zugänglichen Carboxylgruppen auf der Elektrodenoberfläche erreicht werden, an die mehr Antikörper gebunden werden können.

IV.2 Assay-Komponenten

Für die enzymatische Signalverstärkung wurden Alkalische Phosphatase, α - und β -D-Galaktosidase untersucht. Als spezifische Erkennungskomponente wurden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper verwendet.

Der Austausch des etablierten Reporterenzym Alkalische Phosphatase zur Empfindlichkeitssteigerung elektrochemischer Assays wurde in Erwägung gezogen, da das Enzym aufgrund des annähernd neutralen pH-Wertes des Meßpuffers einen signifikanten Aktivitätsverlust aufwies (Abb. 31). Als Ersatz konnten prinzipiell nur Enzyme mit hohem

k_{cat} -Wert und Hydrolase-Aktivität verwendet werden, die aus einem elektrochemisch inaktiven Substrat einen Redox-Mediator, z.B. pAP, freisetzen. Außerdem wurde die Suche im Hinblick auf eine potentielle Verwendung von bifunktionalen Fusionsproteinen (Kerschbaumer *et al.* 1997), die Bindungs- und katalytische Eigenschaften vereinen, auf Enzyme mit einfacher Struktur und guten Expressionseigenschaften fokussiert. Durch Verwendung bifunktionaler Fusionsproteine können direkte Immunoassays durchgeführt werden, bei denen im Gegensatz zu indirekten ein Markierungsschritt entfällt und die somit weniger Zeit in Anspruch nehmen.

Viele der potentiell geeigneten Enzyme konnten aufgrund unvollständiger bzw. nicht verfügbarer Sequenz- oder kinetischer Daten nicht in die engere Wahl genommen werden.

IV.2.1 α -D-Galaktosidase

Ausgewählt wurde aus der Gruppe der Glykosidasen die α -D-Galaktosidase aus der Sojapflanze (*Glycine max*). In bereits durchgeführten Studien konnte das rekombinant exprimierte Enzym als Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kDa identifiziert werden (Davis *et al.* 1996), wohingegen native α -D-Galaktosidasen sich als Homotetramere mit Molekulargewichten von etwa 140 kDa zusammenlagern können (Harpaz *et al.* 1977, Secova *et al.* 1988).

Während der Kultivierung wurden die Sojapflanzen zur Verhinderung der Nutzung von photosynthetischen Kohlenstoffquellen unter Lichtausschluß inkubiert. Da sich die direkt isolierte mRNA als sehr instabil erwies, wurde sie in der dargestellten Weise aus der totalRNA gewonnen. Die Tatsache, daß sich die Wurzeln als sehr gute Quelle für die mRNA der α -D-Galaktosidase eignete, korrelierte mit der Annahme, daß die wachsende Pflanze das im Überschuß vorhandene Disaccharid α -D-Melibiose nach der Aufnahme relativ schnell spalten würde.

Die zur genspezifischen Amplifikation der cDNA des Enzyms verwendeten Oligonukleotide wurden aufgrund der Tatsache, daß in Hefen exprimierte rekombinante α -D-Galaktosidase eine um 60 AS (180 bp) verkürzte Sequenz nach dem nativen Startkodon aufwies (Davis *et al.* 1996), entsprechend gestaltet. Nach der Klonierung der cDNA in diverse Vektoren wurde die Expression in Hefen durchgeführt, da diese als einfache Eukaryonten im Gegensatz zu Bakterien dem Ursprungsorganismus ähnlicher sind und sich bei analogen pflanzlichen Enzymen durch hohe Ausbeuten des aktiven Enzyms bewährt haben (Zhu *et al.* 1996). Die im verwendeten pPICZ α -B-Vektor vorhandene α -Faktor-Signalsequenz (89 AS, 9,3 kDa) wurde

N-terminal an das Konstrukt mit dem Ziel der Sekretion in den Expressionsüberstand hinzugefügt, C-terminal wurde das Protein mit vektorieell vorhandenen His- und myc-Epitopen versehen, wodurch eine einfache Reinigung und Detektion ermöglicht wurde.

Die rekombinante α -D-Galaktosidase wies ein apparentes Molekulargewicht von etwa 45 kDa auf. Die Abweichung von der berechneten Größe von 39 kDa ist wahrscheinlich auf zusätzliche 36 Aminosäuren zurückzuführen, die an N- und C-Termini aufgrund von Schnittstellen oder den genannten Epitopen eingeführt worden sind sowie auf eine Glykosylierung des Moleküls, da in einem eukaryontischen System exprimiert wurde.

Für elektrochemische Analysen wurde eine einstufige Synthese zur Herstellung von pAP-Gal, eines Substrates, das durch enzymatische Hydrolyse pAP freisetzt, durchgeführt. Das Substrat konnte mit fast quantitativer Ausbeute durch Reduktion der Nitrogruppe des optischen Substrates pNP-Gal in eine Aminogruppe dargestellt werden.

Die Funktionalität des rekombinant exprimierten Enzyms konnte in optischen und elektrochemischen Aktivitätstests gezeigt werden. Die amperometrischen Messungen des Umsatzes des synthetisierten pAP-Gal durch immobilisierte α -D-Galaktosidase resultierten in relativ kleinen Signalströmen bei gesättigter Substratlösung. Da ähnliche Signalströme bei direkt immobilisierter β -D-Galaktosidase festgestellt wurden, die allerdings auf einer kleineren Fläche an die feste Phase gebunden wurde, ist diese Beobachtung nicht auf den Immobilisierungsvorgang, sondern auf die unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten zurückzuführen. Die berechneten k_{cat} -Werte der beiden Enzyme (Tab. 5) unterscheiden sich etwa um den Faktor 4. Verglichen mit der Alkalischen Phosphatase liegt der k_{cat} -Wert der α -D-Galaktosidase etwa um den Faktor 12 niedriger.

Das Substrat pAP-Gal war in Lösung stabiler als pAPP, da der pAP-Grundstrom deutlich geringer war als bei amperometrischen Messungen mit Alkalischer Phosphatase.

Mit der Isolierung der mRNA, Klonierung und Expression von α -D-Galaktosidase ist die rekombinante Gewinnung eines pflanzlichen Enzyms in aktiver Form gelungen. Allerdings wog letztendlich die pH-Neutralität der α -D-Galaktosidase nicht den Aktivitätsverlust der Alkalischen Phosphatase auf. Alkalische Phosphatase ist trotz der durch die pH-Absenkung begründeten Verringerung der Aktivität als Reporterenzym für elektrochemische Detektionen besser geeignet als α -D-Galaktosidase aus der Sojapflanze.

Für Fusionen mit Affinitätsmolekülen, z.B. scFv, ist die α -D-Galaktosidase dennoch ein attraktives Enzym, da es aufgrund der einfachen Struktur in niederen eukaryontischen Systemen auch als Fusionsprotein exprimiert werden kann. Bei dem Homodimer Alkalische Phosphatase wäre diese Option mit dem Nachteil verbunden, daß damit aus sterischen Gründen eventuell Aktivitätseinbußen entstehen.

IV.2.2 Herstellung von Anti-Toxin-Antikörpern

Als Applikation für das Nachweissystem wurden zwei bakterielle Lebensmitteltoxine, BoNT A und SEB, als Zielproteine gewählt, die von den amerikanischen Zentren für Seuchenkontrolle und -prävention (CDC) als potentiell gefährliche biologische Agenzien in der höchsten und zweithöchsten Kategorie eingestuft wurden.

Für die Detektion von Toxinen standen zunächst polyklonale Seren zur Verfügung. Es wurde die Verwendung von monoklonalen Agenzien als Fängermoleküle favorisiert, da sie aufgrund der Erkennung identischer spezifischer Epitope die bei Verwendung polyklonaler Antikörper potentiell auftretenden Kreuzreaktivitäten nahezu ausschließen.

Die klassische Antikörperherstellung kann bei toxischen Antigenen, die sich durch eine niedrige letale Dosis (BoNT A) oder eine besondere Art der Stimulierung des Immunsystems (SEB) auszeichnen, mit Problemen verbunden sein. Bei der Applikation von subletalen Dosen besteht die Gefahr, daß die Immunantwort im Tier nur ungenügend stimuliert wird und eher niedrig-affine Antikörper gebildet werden. Bei Verwendung von inaktivierten Toxinen (Toxoiden) können durch die chemische Modifikation die Oberflächenepitope so verändert werden, daß die erzeugten Antikörper das native Protein nicht erkennen.

Aus diesen Gründen wurde zur Antikörpergenerierung das Phagen-Display-System gewählt, das als schnelles und kostengünstiges *in vitro*-Verfahren etabliert ist. Hierbei wurde eine humane scFv-Bibliothek mit einer Diversität von etwa $2 \cdot 10^9$ Klonen verwendet. Bei der Herstellung dieser Bibliothek (Griffiths *et al.* 1996) konnte die natürliche Vielfalt durch Modifizierung der dritten hypervariablen Regionen (CDR 3) der schweren (V_H) und leichten (V_L) variablen Ketten, in die synthetisierte zufällige Basenabfolgen eingesetzt wurden, erweitert werden.

Die Selektionen gegen natives Protein wurden über mehrere Runden durchgeführt. Dabei wurden scFv, die auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen präsentiert wurden, an fester Phase angereichert und nach Elution wiedergewonnen. Nach der Selektion konnten die

bindenden scFv durch Expression in *E. coli*-Zellen in löslicher Form erhalten werden. Durch vektoriell vorhandene Sequenzen waren am C-Terminus der exprimierten Proteine ein His- und ein myc-Anhang für die Detektion und Reinigung verfügbar.

Die Immobilisierung von BoNT A wurde adsorptiv an hydrophober Oberfläche durchgeführt, wäre aber auch durch gerichtete Immobilisierung an Gangliosiden möglich gewesen, über die *in vivo* nach Bindung des Toxins der Eintritt in Nervenzellen ermöglicht wird (Simpson 1989, Kozaki *et al.* 1998). Aufgrund widersprüchlicher Angaben in der Literatur (Kitamura *et al.* 1980, Takamizawa *et al.* 1986) in Bezug auf die Bindungspräferenz, -stärke und der Schwierigkeit der erfolgreichen Kopplung von Gangliosiden an feste Phasen ohne Verlust des intakten Bindungsmotivs wurde dieser Weg nicht beschritten.

Bereits nach zwei Selektionsrunden gegen die Toxine zeigte sich eine deutliche Anreicherung von bindenden Phagen. Eine dritte Runde im Falle von BoNT A führte zu einem unerwarteten Abfall in der Reaktivität, was wahrscheinlich auf den Diversitätsverlust zurückzuführen ist.

In der ersten Runde wurden rekombinante M13K07-Phagen eingesetzt, die durch saure Elution wiedergewonnen werden konnten, um so auch schwach bindene scFv-Populationen und solche mit Wachstumsnachteil, die nur in geringer Anzahl vorhanden waren, anzureichern. In den weiteren Selektionsrunden wurden ausschließlich proteolytisch eluierbare rekombinante KM13-Phagen verwendet, um den Selektionshintergrund effektiv zu minimieren.

Die bindenden Klone wurden monoklonalisiert und in zunächst analytischen Ansätzen auf ihre Exprimierbarkeit in HB2151-Zellen hin überprüft. Nach Sequenzierungen konnten ein scFv gegen SEB und zwei gegen BoNT A identifiziert werden. Auch in größeren Expressionsvolumina konnten gute Ausbeuten erhalten werden. Die erfolgreiche Expression von scFv-B20 mit einem Amber-Stop-Kodon in der CDR 3 zeigte, daß die Expressionsausbeute dieses Klones ohne das Kodon enorm gesteigert werden könnte. Für die Verwendung in ELISA-Analysen war die erhaltene Menge allerdings ausreichend, sodaß auf eine Deletion des Kodons verzichtet wurde.

Eine weitere Selektionsrunde wurde im Sandwich-Format mit dem Ziel der Identifizierung von Detektionsantikörperfragmenten durchgeführt. Dabei wurde der Selektionsprozeß gegen gerichtet immobilisierte Toxine, die über spezifische scFv an eine feste Phase gebunden waren, durchgeführt. Es resultierten letztendlich erneut ein Anti-SEB-scFv und zwei Anti-

BoNT A-scFv, die sich durch ihre Reaktivität und gute Exprimierbarkeit auszeichneten. Die nach der Isolierung teilweise beobachteten Doppelbanden sind auf Vorhandensein von Proteinen mit und ohne Signalsequenz zurückzuführen.

Mit der Phagen-Display-Technik konnten Antikörperfragmente, die über alternative Wege nur schwer zugänglich gewesen wären, gegen die Toxine SEB und BoNT A erfolgreich selektiert und exprimiert werden. Durch Anwendung einer Sandwich-Selektion konnten scFv erhalten werden, die paarweise als potentielle Fänger- und Detektorantikörper eingesetzt werden können.

IV.3 Modell-Assay

Als Assay-Format für Proteinnachweise wurde der Sandwich-ELISA gewählt, da dieses Verfahren mit der lokalen Anreicherung durch immobilisierte Fängerantikörper und der enzymatischen Markierung gleich mehrere Signalverstärkungsmechanismen bietet. Es ist weiterhin spezifischer, da zur Detektion mindestens zwei Antikörper an einem Zielprotein binden müssen. Zur Etablierung eines Modell-Systems wurde zunächst Lysozym als Zielprotein verwendet.

Der Einsatz von paramagnetischen Partikeln, die ihre magnetischen Eigenschaften temporär in unmittelbarer Gegenwart von Magnetfeldern besitzen, als feste Phase ist in ELISA- (Smith und Gehle 1977) oder Zellseparationsverfahren (Molday *et al.* 1977) etabliert. Die Eisenoxidkerne der Partikel sind mit einer Polymerschicht ummantelt, wodurch unterschiedliche Funktionalitäten eingeführt werden können. Aufgrund der geringen Dichte sind sie leicht in Suspension zu halten, können aber auch einfach aus der wässrigen Phase abgetrennt werden. Das günstige Oberfläche/Volumen-Verhältnis ermöglicht die Immobilisierung einer Vielzahl von Antikörpern an den Magnetpartikeln. In mikrofluidischen Systemen können sie durch magnetische Felder transportiert und gezielt an bestimmten Positionen fixiert werden.

Es wurden zwei Arten von funktionalisierten Magnetpartikeln untersucht: Carboxypartikel mit einer Ummantelung aus Polystyrol und Epoxyartikel mit einer Polyvinylalkohol-Sphäre. An die jeweiligen Oberflächengruppen wurden Anti-Lysozym-Antikörper gekoppelt und

anschließend ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Bei der Ermittlung der Puffer- und pH-Bedingungen für die Immobilisierung von Antikörpern an Epoxypartikeln konnte die Verwendung von 100 mM Boratpuffer pH 8,5 als Optimum ermittelt werden. Generell ist ein höherer pH-Wert bei Kopplungen von Proteinen an Epoxygruppen vorzuziehen, allerdings wird mit zunehmender Basizität der Lösung auch ein Teil der Epoxide inaktiviert. Unter Kopplungsbedingungen niedriger Basizität dagegen werden zu wenig Fängerantikörper immobilisiert (Abb. 57).

Aufgrund der hohen unspezifischen Adsorptionen an Carboxypartikeln (Abb. 59) stellten sich Epoxyartikel als bessere Festphase heraus. Darüber hinaus boten letztere zusätzlich den Vorteil der reagenzienfreien Kopplung und bildeten aus diesen Gründen die Grundlage für die weiteren Assays.

Für die Immobilisierung der Fängerantikörper standen grundsätzlich direkte und gerichtete Immobilisierungsmöglichkeiten zur Verfügung. Direkt gebundene Proteine werden mit zufälliger Verteilung in mehreren Ausrichtungen gebunden, so daß ein Teil anschließend inaktiv oder schlechter zugänglich ist. Die gerichtete Immobilisierung hat den Vorteil, daß sämtliche Proteine in identischer Weise gebunden werden und den Nachteil, daß zusätzliche Modifizierungsschritte zur Einführung einer Markierung durchgeführt werden müssen.

Für eine gerichtete Immobilisierung der Fängerantikörper wurde Protein A, das an den Fc-Teil von Antikörpern bindet, nicht verwendet, da diese durch Detektionsantikörper verdrängt werden konnten. Der Einsatz wäre nur vertretbar, wenn entweder die Detektionsantikörper ohne Fc-Teil vorliegen würden oder nach Inkubation mit Fängerantikörpern die unbesetzten Protein A-Bindungsstellen mit schwächer bindenden Antikörpern belegt und anschließend eine kovalente Quervernetzung stattfinden würde. Da in diesem Fall mehrere Syntheseschritte direkt auf dem Biochip stattfinden müßten, wurde dieser Ansatz aus praktischen Erwägungen nicht weiter verfolgt.

Die Immobilisierung von Proteinen mit His-Tag an eine Nickel-Matrix ist für ein Durchflußsystem beschrieben (Sigal *et al.* 1996), jedoch müßte während des Assays die Flußgeschwindigkeit weit herabgesetzt werden, um einen Verlust der nur schwach gebundenen Proteine zu minimieren.

Die Fängerantikörper wurden aus diesen Gründen in ungerichteter Weise an die festen Phasen gekoppelt. In dem verwendeten Durchflußsystem (Abb. 56) wurden antikörperbeschichtete

Magnetpartikel durch einen Dauermagneten direkt auf mit BSA vorbehandelten Mikroelektroden eines Biochips fixiert und anschließend sukzessiv Lösungen mit Zielprotein, Detektionsantikörper, enzymatischer Markierung und Substrat zur Bildung eines Immunokomplexes im Sandwichformat sowie zur Detektion daran vorbeigeleitet. Durch Entfernung des Dauermagneten nach der Messung und Einleitung von mehreren Luftblasen in die Fluidik wurde der Biochip von den magnetischen Partikeln gereinigt. So konnte ein zyklisches Meßverfahren etabliert werden, bei dem die Biochips bis zu achtmal wiederverwendet werden konnten.

Die on-chip durchgeführten Sandwich-ELISA-Analysen wurden im Hinblick auf diverse Parameter optimiert. Primär von Interesse war dabei die Reduktion des Hintergrundsignals, das hauptsächlich durch unspezifische Adsorptionen an der trotz vorhandener Alkoholgruppen hydrophoben Polymerummantelung der Magnetpartikel hervorgerufen wurde und durch längere Waschzeiten sowie Pufferzusätze wie BSA und Tween 20 minimiert werden konnte.

Ein großes Problem war die Aufrechterhaltung einer luftblasenfreien Fluidik während der gesamten Messung. Um Luftblasen und Magnetpartikel im System erkennen zu können, wurden durchsichtige Teflonschläuche verwendet. Außerdem war die Durchflußzelle (Abb. 12) derart konzipiert, daß die Mikroelektroden auf dem eingespannten Biochip von oben gut sichtbar waren und sie sich somit auch für mikroskopische Beobachtungen eignete. Durch entstehende kleine Luftblasen im System, die sich trotz vorherigen Aufwärmens und Entgasung der verwendeten Pufferlösungen bilden konnten, ist es vorgekommen, daß Biochips während der Messung unbrauchbar wurden, wenn die Luftblasen den Kontakt zwischen externer Referenz- und Arbeitselektroden unterbrochen hatten. In diesem Fall fehlte dem Potentiostaten, der nach seiner Initialisierung die konstanten Potentiale an den Mikroelektroden permanent neu einstellte, die Bezugsgröße. Die Potentiale wurden daraufhin an den Arbeitselektroden in Bereiche nachreguliert, die auf die sich in unmittelbarer Nähe befindlichen organischen Substanzen zerstörend wirkten. Es wurde durch anschließend durchgeführte pAP-Messungen beobachtet, daß stabile Thiolschichten durch den unkontrollierten Potentialanstieg von der Goldoberfläche entfernt wurden.

Außerdem konnten schon kleine Luftblasen die Durchflußzelle aufgrund des geringen Volumens von ca. 1 µl ausfüllen und so trotz des lokalen Magnetfeldes die Partikel von den Mikroelektroden teilweise entfernen.

Zur Minimierung der Luftblasenbildung innerhalb des Meßsystems wurde zusätzlich zu den eingesetzten entgasten und mit Tween 20 versetzten Puffern entweder der Potentiostat kurz vor der Messung erneut initialisiert oder die Wasch- und Inkubationsschritte außerhalb des Potentiostaten durchgeführt.

Das Assay-System ließe sich durch Änderungen in der Fluidik, z.B. die Einführung von Kompartimenten für die Bildung des Immunkomplexes und Durchführung der enzymatischen Reaktion sowie getrennt davon die Detektion an den Mikroelektroden oder durch Reduzierung der Analysenzeit weiter verbessern.

Unter Berücksichtigung der Optimierungen wurden on-chip Sandwich-ELISA-Analysen mit polyklonaler Detektion durchgeführt. Aufgrund der Erkennung heterogener Epitope sind polyklonale Antikörper als Detektionsagenzien monoklonalen vorzuziehen. Monoklonale Fängerantikörper dagegen ermöglichen eine gerichtete Immobilisierung der Zielproteine ohne die Gefahr der gleichzeitigen Bindung des selben Proteins durch räumlich benachbarte Moleküle. Außerdem ist die Möglichkeit der Verdrängung des gebundenen Proteins durch die Bindung von Detektionsantikörpern geringer als bei Verwendung der identischen Antikörperpopulation für Fänger- und Detektionsantikörper.

In Assays mit polyklonalen Fänger- und Detektionsantikörpern konnten Arbeitskonzentrationen von 10 ng/ml Lysozym nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich konnte mit monoklonalen bivalenten Fängermolekülen zwar die gleiche Konzentration detektiert werden, allerdings mit einem höheren Hintergrund und geringerer Signalhöhe (Abb. 63). Die Verwendung von monovalenten scFv-Fängermolekülen anstelle der bivalenten Immunglobuline resultierte in der Detektion von ebenfalls 10 ng/ml des Zielproteins (Abb. 64).

Die verwendeten Konzentrationen dienten hauptsächlich der Überprüfung unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen und der Etablierung des Sandwich-ELISA mit monoklonalen Fänger- und polyklonalen Detektionsantikörpern zum Nachweis von Proteinen.

Mit anderen Detektionsverfahren (Tab. 1) können zwar niedrigere Detektionsgrenzen erreicht werden, jedoch ist damit meistens ein größerer apparativer oder zeitlicher Aufwand

verbunden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist das kompakte Format und dadurch mögliche Vor-Ort-Analysen.

IV.4 Toxin-Assay

Nach der Etablierung des Modellsystems zum Nachweis von Lysozym im Sandwich-ELISA sollte es auf Toxine übertragen werden.

Eine Detektion von BoNT gestaltet sich aufgrund der geringen letalen Dosis im allgemeinen recht schwierig. Standardmäßig etabliert und akzeptiert wird für BoNT der zeitaufwendige Maus-Bioassay (Reed und Muench 1938) angewandt. Für eine schnellere Diagnostik sollte der Immunoassay im ELISA-Format angewandt werden.

Zunächst wurden durch direkte ELISA-Analysen an immobilisierten Toxinen die Reaktivitäten und Eignung der jeweiligen Markierung der scFv überprüft (Abb. 52). Im Vergleich der unterschiedlichen Assay-Formate (monoklonale, polyklonale und heterogene ELISA) konnte nur der polyklonale Sandwich-ELISA zur Detektion von 100 ng/ml SEB erfolgreich durchgeführt werden. Die favorisierten heterogenen ELISA mit scFv als Fänger- und polyklonalem Serum als Detektionsmolekülen zeigten trotz der zuvor demonstrierten Reaktivität der scFv kein Signal. Die Ursache scheint in der adhäsiven Immobilisierung bzw. an den humanen scFv selbst zu liegen. Beim erfolgreich durchgeführten Modell-Assay mit Lysozym waren die Fängermoleküle murinen Ursprungs. Es scheinen demnach einerseits strukturelle Unterschiede, hauptsächlich bedingt durch die speziesspezifischen Framework-Regionen, für die differierenden Ergebnisse verantwortlich zu sein. Weiterhin ist die Zugänglichkeit und Flexibilität der direkt an der Oberfläche immobilisierten scFv wahrscheinlich eingeschränkt. In vergleichenden Bindungsstudien wiesen monovalente scFv im Gegensatz zu den dazugehörigen bivalenten IgG Unterschiede von bis zu drei Größenordnungen in den Bindungskonstanten auf (Nowakowski *et al.* 2002). Außerdem ist eine zu geringe Dichte aktiv immobilisierter scFv denkbar, die eine erfolgreiche Detektion verhinderte. Durch den Einsatz von größeren Fängerkonstrukten höherer Valenz oder die gerichtete Immobilisierung der scFv könnte dieses Problem gegebenenfalls behoben werden.

V. Zusammenfassung

Sensible Detektionssysteme für Proteine gewinnen in der Post-Genom-Ära immer mehr an Bedeutung. In dieser Arbeit wurden sowohl Detektionskomponenten als auch Signalverstärkungselemente für elektrochemische Biosensoren entwickelt.

Zur Immobilisierung von Antikörpern und zum Schutz der empfindlichen Ultramikroelektroden aus Gold vor unspezifischen Adsorptionen und Analytbestandteilen aus der vorbeigeleiteten Lösung wurden zwei- und dreidimensionale Schichten aus verschiedenen Belegungsreagenzien untersucht. Dazu wurden Moleküle verwendet, die mit Carboxygruppen für die kovalente Anknüpfung von Antikörpern sowie mit Thiogruppen, die als Verankerungsmöglichkeit für die Bindung auf der Goldoberfläche dienen sollten, versehen waren. Monomolekulare Schichten langkettiger Mercaptoalkylsäuren gewährleisteten ausreichende Zugänglichkeiten der Mikroelektroden, wohingegen sich p-Mercaptoanilin als ungeeignet erwies. Weiterhin wurden thiomodifizierte Carboxymethyl-Cellulose und Dendrimere als dreidimensionale Oberflächenmoleküle dargestellt. Hier konnte gezeigt werden, daß Dendrimere als Belegungsreagenzien Signal/Hintergrund-Verhältnisse von 30:1 sowie ein um den Faktor 2,3 verbessertes Signal im Vergleich zu Hydrogelen ermöglichten.

Zur Evaluierung potentieller Reporterenzyme wurden die Alkalische Phosphatase sowie α - und β -D-Galaktosidasen untersucht. Das Enzym α -D-Galaktosidase aus Soja wurde nach Isolierung der mRNA und Generierung der cDNA rekombinant in *Pichia pastoris* exprimiert und gereinigt. Nach der Synthese eines elektrochemischen Substrates konnte die Eignung der α -D-Galaktosidase in amperometrischen Messungen auf Biochips demonstriert werden. Von den untersuchten Enzymen zeigte die Alkalische Phosphatase die besten Voraussetzungen für den Einsatz in diesem Detektionssystem.

Für eine spezifische Erkennung der Zielproteine wurden polyklonale Antikörper sowie monoklonale Antikörperfragmente im scFv- und IgG Δ C1-scFv-Format verwendet. Mittels Phagen-Display-Technologie konnten aus einer scFv-Bibliothek spezifisch bindende Antikörperfragmente gegen die bakteriellen Lebensmitteltoxine BoNT A und SEB selektiert und nach Expression in *E. coli* und Reinigung in löslicher Form dargestellt werden. Für BoNT A konnten insgesamt vier und für SEB zwei unterschiedliche scFv erhalten werden. Als Detektionsformat für die toxischen Proteine wurde der Sandwich-ELISA gewählt.

Zur Etablierung und Optimierung des Meßverfahrens wurde der Nachweis direkt auf den Mikroelektroden unter Verwendung von funktionalisierten Magnetpartikeln durchgeführt. Bei dem Sandwich-ELISA wurden poly- oder monoklonale Fängerantikörper kovalent an Magnetpartikel gebunden und diese durch ein lokales Magnetfeld direkt auf den Mikroelektroden eines Biochips fixiert. Nach Bindung des Zielproteins wurden die polyklonalen Detektionsantikörper mit Extravidin-AP-Konjugat markiert und anschließend aus dem elektrochemisch inaktiven Substrat pAPP durch enzymatische Hydrolyse aktives pAP freigesetzt, das an den Mikroelektroden durch Redox-Recycling detektiert werden konnte. Der resultierende Stromanstieg war hierbei direkt proportional der lokal generierten Menge pAP.

Durch Optimierung des Nachweisverfahrens, in dem Lysozym als Zielprotein verwendet wurde, konnte die Analysenzeit auf etwa 50 min reduziert werden. Mit dieser Methode konnte eine Sensitivität von 10 ng/ml Lysozym erreicht werden. Nach Übertragung des Verfahrens auf toxische Proteine konnte mit diesem elektrochemischen Biosensor SEB in Konzentrationen von 100 ng/ml mit einem Signal/Hintergrund-Verhältnis von 12:1 nachgewiesen werden.

VI. Summary

In the post-genome era sensitive protein detection systems are becoming increasingly important. In this thesis several detection compounds and signal amplification elements for electrochemical biosensors were developed and evaluated.

Two- and three-dimensional layers of different coating agents were investigated regarding immobilisation of antibodies and protection of the sensitive ultramicroelectrodes made of gold against unspecific adsorptions of analyte components from contacting solutions. Molecules with carboxyl groups for covalent attachment of antibodies and a thiol group for anchoring on the gold surface were used as coating agents. Monomolecular layers of thiolated long-chain alkanolic acids ensured adequate accessibility of the microelectrodes whereas p-mercaptoaniline was unsuitable. Thiolated carboxymethyl cellulose and dendrimers were prepared for utilisation as three-dimensional surface molecules. It was demonstrated that dendrimers allow signal/background ratios of 30:1 and a signal amplification by a factor of 2,3 compared to hydrogels.

The evaluation of potential reporter enzymes included alkaline phosphatase, α - and β -D-galactosidases. After isolation of mRNA and generating of cDNA the enzyme α -D-galactosidase from soy bean was recombinantly expressed in *P. pastoris* and purified. The synthesis of an electrochemical substrate for that enzyme enabled amperometric measurements on biochips. Alkaline phosphatase exhibited the best properties of the tested enzymes and was applied to the detection system.

Polyclonal antibodies and monoclonal antibody fragments in scFv- and IgG Δ C1-scFv formats were used for specific recognition of target proteins. Specifically binding antibody fragments against bacterial food toxins BoNT A and SEB were selected from a scFv library by phage display technology. After recombinant expression in *E. coli* and purification four scFv against BoNT A and two against SEB could be obtained in a soluble form. The sandwich ELISA was chosen as detection format for toxic proteins.

To establish and optimise the measuring system the protein detection was performed directly on the microelectrodes by using functionalised magnetic particles. In the beginning of the sandwich ELISA procedure poly- or monoclonal capture antibodies were covalently attached to the magnetic particles. These were fixed onto a biochip by a local magnetic field. After binding of the target protein the detection antibodies were labelled with Extravidin-AP

VI. Summary

conjugate. The electrochemical inactive substrate pAPP was enzymatically converted to active pAP which was detected at the microelectrodes by redox recycling. The resulting increase of the current was proportional to the locally generated amount of pAP.

After optimisation of the detection procedure where lysozyme was used as a model compound the time of analysis could be reduced to approximately 50 minutes. A sensitivity of 10 ng/ml lysozyme could be obtained with this method. After transferring the procedure to the toxic proteins SEB could be detected at concentrations of 100 ng/ml with a signal/background ratio of 12:1.

VII. Literatur

Ada G, Vaccines and vaccination, *N Engl J Med* **2001**, *345*, 1042-1053

Ammon A und Bräunig J, Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland **2002**, RKI (Hrsg), *6*, 4-17

Aoki K, Morita M, Niwa O und Tabei H, Quantitative analysis of reversible diffusion-controlled currents of redox soluble species at interdigitated array electrodes under steady-state conditions, *J Electroanal Chem* **1988**, *256*, 269-282

Arakawa H, Maeda M und Tsuji A, Chemiluminescence enzyme immunoassay of cortisol using peroxidase as label, *Anal Biochem* **1979**, *97*, 248-254

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL und Tonat K, Botulinum toxin as a biological weapon, *JAMA* **2001**, *285*, 1059-1070

Arraj JA und Campbell JH, Isolation and characterization of the newly evolved ebg beta-galactosidase of *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol* **1975**, *124*, 849-856

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA und Struhl K (Hrsg), Current protocols in molecular biology, Wiley **1991**, New York

Balaban N und Rasooly A, Staphylococcal enterotoxins, *Int J Food Microbiol* **2000**, *61*, 1-10

Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA und Benkovic SJ, Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site, *Proc Natl Acad Sci* **1991**, *88*, 7978-7982

Bard AJ und Faulkner LR, Electrochemical Methods, Wiley **1980**, New York, 22-26

Berger R, Delamarche E, Lang HP, Gerber C, Gimzewski JK, Meyer E und Güntherodt HJ, Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold, *Science* **1997**, 276, 2021-2024

Bergström J, Sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensor systems, Patent WO90/0530, **1990**

Bigalke H und Wellhöner HH, Toxikologie, Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg), BI Wissenschaftsverlag **1994**, Mannheim, 692-704

Birnboim HC und Doly J, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* **1979**, 7, 1513-1523

Black JD und Dolly JO, Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis, *J Cell Biol* **1986**, 103, 535-544

Boon EM, Salas JE und Barton JK, An electrical probe of protein-DNA interactions on DNA-modified surfaces, *Nature Biotech* **2002**, 20, 282-286

Boyle NA und Janda KD, Formats for combinatorial synthesis: solid-phase, liquid-phase and surface, *Curr Opin Chem Biol* **2002**, 6, 339-346

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254

Brecht A, Gauglitz G, Heilig U, Reichert M und Striebel C, Biosensors based on receptors: Optical transducer principles, Biosensors - fundamentals, technologies and applications, Scheller F und Schmid RD (Hrsg), VCH **1991**, New York

Brivio M, Fokkens RH, Verboom W, Reinhoudt DN, Tas NR, Goedbloed M und van den Berg A, Integrated microfluidic system enabling (bio)chemical reactions with on-line MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal Chem* **2002**, 74, 3972-3976

Casman EP, Staphylococcal enterotoxin, *Ann NY Acad Sci* **1965**, *128*, 124-131

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Botulism in the United States 1899-1996, Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers, CDC **1998**, Atlanta, GA

Chien RL und Parce JW, Multiport flow-control system for lab-on-a-chip microfluidic devices, *Fresenius J Anal Chem* **2001**, *371*, 106-111

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T und Karin M, The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes, *Cell* **1988**, *54*, 541-552

Chothia C und Lesk AM, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J Mol Biol* **1987**, *196*, 901-917

Chou SF, Hsu WL, Hwang JM und Chen CY, Determination of alpha-fetoprotein in human serum by a quartz crystal microbalance-based immunosensor, *Clin Chem* **2002**, *48*, 913-918

Clark LC Jr und Lyons CL, Electrode systems for continuous monitoring in vascular surgery, *Ann NY Acad Sci* **1962**, *102*, 29-45

Clarke DJ, Calder MR, Carr RJ, Blake-Coleman BC, Moody SC und Collinge TA, The development and application of biosensing devices for bioreactor monitoring and control, *Biosensors* **1985**, *1*, 213-320

Coste J, Le-Nguyen D und Castro B, PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product, *Tetrahdr Lett* **1990**, *31*, 205-208

Craven GR, Steers E Jr und Anfinsen CB, Purification, composition and molecular weight of the beta-galactosidase of *Escherichia coli* K12, *J Biol Chem* **1965**, *240*, 2469-2477

Cush R, Cronin JM, Stewart WJ, Maule CH, Molloy J und Goddard NJ, The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: principle of operation and associated instrumentation, *Biosens Bioelectron* **1993**, *8*, 347-353

Danielsson B und Xie B, Thermistor-based biosensing, *EXS* **1997**, *81*, 71-85

Davis MO, Hata DJ, Johnson SA, Walker JC und Smith DS, Cloning, expression and characterization of a blood group B active recombinant alpha-D-galactosidase from soy bean (*Glycine max*), *Biochem Mol Biol Int* **1996**, *39*, 471-485

Dijksma M, Kamp B, Hoogvliet JC und van Bennekom WP, Development of an electrochemical immunosensor for direct detection of interferon- γ at the attomolar level, *Anal Chem* **2001**, *73*, 901-907

Disley DM, Morrill PR, Sproule K und Lowe CR, An optical biosensor for monitoring recombinant proteins in process media, *Biosens Bioelectron* **1999**, *14*, 481-493

Doleman BJ, Severin EJ und Lewis NS, Trends in odor intensity for human and electronic noses: relative roles of odorant vapor pressure vs molecularly specific odorant binding, *Proc Natl Acad Sci* **1998**, *95*, 5442-5447

Ege D, Becker WG und Bard AJ, Electrogenerated chemiluminescent determination of $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ at low levels, *Anal Chem* **1984**, *56*, 2413-2417

Ekins RP, Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays, *Clin Chem* **1998**, *44*, 2015-2030

Engvall E und Perlman P, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochem* **1971**, *8*, 871-874

Frame MD, Chapman GB, Makino Y und Sarelius IH, Shear stress gradient over endothelial cells in a curved microchannel system, *Biorheology* **1998**, *35*, 245-261

Franchina JG, Lackowski WM, Dermody DL, Crooks RM und Bergbreiter DE, Electrostatic immobilization of glucose oxidase in a weak acid, polyelectrolyte hyperbranched ultrathin film on gold: fabrication, characterization, and enzymatic activity, *Anal Chem* **1999**, *71*, 3133-3139

Frazier RA, Matthijs G, Davies MC, Roberts CJ, Schacht E und Tendler SJB, Characterization of protein-resistant dextran monolayers, *Biomaterials* **2000**, *21*, 957-966

Freund MS und Lewis NS, A chemically diverse conducting polymer-based "electronic nose", *Proc Natl Acad Sci* **1995**, *92*, 2652-2656

Friedman AE, Kumar CV, Turro NJ und Barton JK, Luminescence of ruthenium(II) polypyridyls: evidence for intercalative binding to Z-DNA, *Nucleic Acids Res* **1991**, *19*, 2595-2602

Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Güntherodt HJ, Gerber C und Gimzewski JK, Translating biomolecular recognition into nanomechanics, *Science* **2000**, *288*, 316-318

Gill SC und von Hippel PH, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* **1989**, *182*, 319-326

Giordano BC, Ferrance J, Swedberg S, Huhmer AF und Landers JP, Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds, *Anal Biochem* **2001**, *291*, 124-132

Gopel W, Ziegler C, Breer H, Schild D, Apfelbach R, Joerges J und Malaka R, Bioelectronic noses: a status report. Part I, *Biosens Bioelectron* **1998**, *13*, 479-493

Green NM, Avidin I. The use of ¹⁴C biotin for kinetic studies and for assays, *Biochem J* **1963**, *89*, 585-591

Green NM, Avidin V. Quenching of fluorescence by dinitrophenyl groups, *Biochem J* **1964**, *90*, 564-568

Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A,

Cox JPL, Harrison JL, Zaccolo M, Gherardi E und Winter G, Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires, *EMBO J* **1994**, *13*, 3245-3260

Griffiths SK und Nilson RH, Design and analysis of folded channels for chip-based separations, *Anal Chem* **2002**, *74*, 2960-2967

Grizzle CO, Botulism from a puncture wound, *Rocky Mt Med J* **1972**, *69*, 47-49

Hamad AR, Marrack P und Kappler JW, Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins, *J Exp Med* **1997**, *185*, 1447-1454

Harpaz N, Flowers HM und Sharon N, alpha-D-galactosidase from soy beans destroying blood-group B antigens. Purification by affinity chromatography and properties, *Eur J Biochem* **1977**, *77*, 419-426

Harsanyi Z und Dorn GL, Purification and characterization of acid phosphatase V from *Aspergillus nidulans*, *J Bacteriol* **1972**, *110*, 246-255

Hatheway CL und Johnson EA, *Clostridium*: the spore-bearing anaerobes, Microbiology and microbial infections, systematic bacteriology, Balows A und Duerden BI (Hrsg), Band 2, 32, 731-782, Arnold **1998**, London

Heller MJ, Forster AH und Tu E, Active microeletronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 157-164

Hermanson GT (Hrsg), Bioconjugate techniques, Academic Press **1996**, New York, 188-285

Herne, TM und Tarlov MJ, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 8916-8920

Hibbs RG, Weber JT, Corwin A, Allos BM, Abd el Rehim MS, Sharkawy SE, Sarn JE und McKee KT Jr, Experience with the use of an investigational F(ab')₂ heptavalent botulism

immune globulin of equine origin during an outbreak of type E botulism in Egypt, *Clin Infect Dis* **1996**, *23*, 337-340

Hintsche R, Paeschke M, Wollenberger U, Schnackenberg U, Wagner B und Lisec T, Microelectrode arrays and application to biosensing devices, *Biosens Bioelectron* **1994**, *9*, 697-705

Hochuli E, Dobeli H und Schacher A, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *J Chromatogr* **1987**, *411*, 177-184

Hoffman CS und Winston F, A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*, *Gene* **1987**, *57*, 267-269

Hoogenboom HR und Winter G, By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*, *J Mol Biol* **1992**, *227*, 381-388

Homola J, Sinclair SY und Gauglitz G, Surface plasmon resonance: a review, *Sens Actuators B* **1999**, *54*, 3-15

Horowitz ST, Roseman S und Blumenthal HJ, The preparation of glucosamine oligosaccharides, *J Am Chem Soc* **1957**, *79*, 5046-5049

Hubbard AL und Gohn ZA, Biochemical analysis of membrane, Madde AH (Hrsg), Wiley **1976**, New York, 427-501

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R und Oppermann H, Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci* **1988**, *85*, 5879-5883

Jamlang EM, Bartlett ML und Snyder HE, The effect of pH, protein concentration and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B, *J Appl Microbiol* **1971**, *22*, 1034-1040

Jankovic J und Hallett M (Hrsg), Therapy with botulinum toxin, Marcel Dekker **1994**, New York

Jenkins W und D'Ari L, The kinetics of alkaline phosphatase, *J Biol Chem* **1966**, *241*, 295-296

Johnson E, Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of Nature's most toxic proteins, *Annu Rev Microbiol* **1999**, *53*, 551-575

Johnson JL und Francis G, Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species, *J Gen Microbiol* **1975**, *88*, 229-244

Keen NT, Dahlbeck D, Staskawicz B und Belser W, Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* **1984**, *159*, 825-31

Kerschbaumer RJ, Hirschl S, Kaufmann A, Ibl M, Koenig R und Himmler G, Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Anal Biochem* **1997**, *249*, 219-227

Kim SW, Bae YH und Okano T, Hydrogels: swelling, drug loading and release, *Pharm Res* **1992**, *9*, 283-290

King JF und Gill MS, Alkyl 2,2,2-trifluoroethanesulfonates (tresylates): elimination-addition vs bimolecular nucleophile substitution in reactions with nucleophiles in aqueous media, *J Org Chem* **1996**, *61*, 7250-7255

Kitamura M, Iwamori M und Nagai Y, Interaction between *Clostridium botulinum* neurotoxin and gangliosides, *Biochim Biophys Act* **1980**, *628*, 328-335

Kittlesen GP, White HS und Wrighton MS, Chemical derivatization of microelectrode arrays by oxidation of pyrrole and N-methylpyrrole: fabrication of molecule-based electronic devices, *J Am Chem Soc* **1984**, *106*, 7389-7396

Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wolle J, Plueckthun, A und Virnekas B, Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides, *J Mol Biol* **2000**, 296, 57-86

Köhler G und Milsten C, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **1975**, 256, 495-497

Koenig B und Gratzel M, Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors, *Anal Lett* **1993**, 26, 1567-1585

Kortepeter M, Christopher G, Cieslak T, Culpepper R, Darling R, Pavlin J, Rowe J, McKee K und Eitzen E (Hrsg), Medical management of biological casualties handbook, 4. Auflage, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases **2001**, Frederick, MD

Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, Nishiki T und Mochida S, Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins, *Microb Pathog* **1998**, 25, 91-99

Kricka LJ, Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century, *Clin Chim Acta* **2001**, 307, 219-223

Laemmli, UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **1970**, 227, 680-685

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR und Stevens RC, Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity, *Nat Struct Biol* **1998**, 5, 898-902

Lancet D, Isenman D, Sjö Dahl J, Sjöquist J und Pecht I, Interaction between staphylococcal protein A and immunoglobulin domains, *Biochem Biophys Res Commun* **1978**, 85, 608-614

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L,

Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* **2001**, *409*, 860-921

Lang HP, Baller MK, Berger R, Gerber C, Gimzewski JK, Battiston FM, Fornaro P, Ramseyer JP, Meyer E und Güntherodt HJ, An artificial nose based on a micromechanical cantilever array, *Anal Chim Acta* **1999**, *393*, 59-65

Lewis BA, Smith F und Stephen AM, Galactaric acid and its derivatives, *Meth Carbohydr Chem II* **1963**, 38-46

Liu B, Liu Z, Chen D, Kong J und Deng J, An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a beta-type zeolite modified electrode, *Fresenius J Anal Chem* **2000**, *367*, 539-544

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W und Deetz K, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Appl* **1995**, *4*, 357-362

Löfas S und Johnsson B, A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J Chem Soc Chem Commun* **1990**, 1526-1528

Lottspeich F und Zorbas H (Hrsg), Bioanalytik, Spektrum akademischer Verlag **1998**, Heidelberg, 653-672

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* **1951**, *193*, 265-275

Mattiasson B, Biotechnology - measuring, modelling and control, Rehm HJ und Reed G (Hrsg), 2. Auflage, Band 4, VCH **1991**, Weinheim, 77-103

Miller JN, Nawawi MB und Burgess C, Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection, *Anal Chim Acta* **1992**, *266*, 339-343

Mohammed FA, Topical permeation characteristics of diclofenac sodium from NaCMC gels in comparison with conventional gel formulations, *Drug Dev Ind Pharm* **2001**, *27*, 1083-1097

Molday RS, Yen SP und Rembaum A, Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells, *Nature* **1977**, *268*, 437-438

Monday SR und Bohach GA, Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates, *J Clin Microbiol* **1999**, *37*, 3411-3414

Montecucco C und Schiavo G, Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins, *Quart Rev Biophys* **1995**, *28*, 423-472

Moser I, Jobst G, Aschauer E, Svasek P, Varahram M, Urban G, Zanin VA, Tjoutrina GY, Zharikova AV und Berezov TT, Miniaturized thin film glutamate and glutamine biosensors, *Biosens Bioelectron* **1995**, *10*, 527-532

Naimushin AN, Soelberg SD, Nguyen DK, Dunlap L, Bartholomew D, Elkind J, Melendez J und Furlong CE, Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor, *Biosens Bioelectron* **2002**, *17*, 573-584

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH und Burchardt O, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500

Nilsson K und Mosbach K, Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides, *Biochem Biophys Res Comm* **1981**, *102*, 449-457

Niwa O, Xu Y, Halsall HB und Heineman WR, Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay, *Anal Chem* **1993**, *65*, 1559-1563

Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA und Marks JD, Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody, *Proc Natl Acad Sci* **2002**, *99*, 11346-11350

Nylander C, Liedberg B und Lind T, Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sens Actuators* **1982**, *3*, 79–88

Ohishi I, Sugii S und Sakaguchi G, Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size, *Infect Immun* **1977**, *16*, 107-109

Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP und Schlievert PM, Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K, *Infect Immun* **2001**, *69*, 360-366

O'Shannessy DJ, Brigham-Burke M und Peck K, Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *Anal Biochem* **1992**, *205*, 132-136

Papageorgiou AC, Tranter HS und Acharya KR, Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors, *J Mol Biol* **1998**, *277*, 61-79

Park SJ, Taton TA und Mirkin CA, Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes, *Science* **2002**, *295*, 1503-1506

Pecher G, DNA-based tumor vaccines, *Onkologie* **2002**, *25*, 528-532

Pergel E, Gyurcsanyi RE, Toth K und Lindner E, Picomolar detection limits with current-polarized Pb²⁺ ion-selective membranes, *Anal Chem* **2001**, *73*, 4249-4253

Pickett J, Berg B, Chaplin E und Brunstetter-Shafer MA, Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study, *N Engl J Med* **1976**, *295*, 770-772

Piehler J, Brecht A und Gauglitz G, Affinity detection of low molecular weight analytes, *Anal Chem* **1996**, *68*, 139-143

Pierrat O, Lechat N, Bourdillon C und Laval JM, Electrochemical and surface plasmon resonance characterization of the step-by-Step self-assembly of a biomimetic structure onto an electrode surface, *Langmuir* **1997**, *13*, 4112-4118

Rafii S, Vaccination against tumor neovascularization: promise and reality, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 429-31

Razumas VJ, Kuyls JJ und Malinauskas AA, Kinetic amperometric determination of hydrolase activity, *Anal Chim Acta* **1980**, *117*, 387-390

Reed LJ und Muench H, A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am J Hyg* **1938**, *27*, 493-497

Reyes RR, Iossifidis D, Auroux PA und Manz A, Micro total analysis systems, 1. Introduction, theory and technology, *Anal Chem* **2002**, *74*, 2623-2636

Riechmann L und Winter G, Novel folded protein domains generated by combinatorial shuffling of polypeptide segments, *Proc Natl Acad Sci* **2000**, *97*, 10068-10073

Rodriguez M und Bard AJ, Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. Voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II) with DNA, *Anal Chem* **1990**, *62*, 2658-2662

Roederer JE und Bastiaans GJ, Microgravity immunoassay with piezoelectric crystals, *Anal Chem* **1983**, *55*, 2333-2336

Rowe-Taitt CA, Golden JP, Feldstein MJ, Cras JJ, Hoffman KE und Ligler FS, Array biosensor for detection of biohazards, *Biosens Bioelectron* **2000**, *14*, 785-794

Sabatani E, Cohen-Boulakia, Bruening M und Rubinstein I, Thioaromatic monolayers on gold: a new family of self-assembling monolayers, *Langmuir* **1993**, *9*, 2974-2981

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* **1985**, *230*, 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (Hrsg), Molecular cloning - a laboratory manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbour **1989**, New York

Sanger F, Nicklen S und Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci* **1977**, *74*, 5463-5467

Scheller FW und Schubert F, Biosensoren, Akademie **1989**, Berlin

Scheuber PH, Denzlinger C, Wilker D, Beck G, Keppler D und Hammer DK, Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal enterotoxin B in the monkey, *Eur J Clin Invest* **1987**, *117*, 455-459

Schneider BH, Edwards JG und Hartman NF, Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens, *Clin Chem* **1997**, *43*, 1757-1763

Scott AB, Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery, *Ophthalmology* **1980**, *87*, 1044-1049

Scouten WH, A survey of enzyme coupling techniques, *Meth Enzym* **1987**, *135*, 30-65

Secova E, Ticha M und Kocourek J, Electrophoretic study of α -D-galactosidases from seeds of glycine soja and vigna radiata possessing erythroagglutinating activity, *J Chrom* **1988**, *436*, 59-66

Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ und Southern EM, Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes, *Nucl Acid Res* **1997**, *25*, 4447-4454

Sheoran AS und Holmes MA, Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb and IgG(T)) using their differential binding characteristics for staphylococcal protein A and streptococcal protein G, *Vet Immunol Immunopathol* **1996**, 55, 33-43

Shuman S, Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase, *J Biol Chem* **1994**, 269, 32678-32684

Sigal GB, Bamdad C, Barberis A, Strominger J und Whitesides GM, A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance, *Anal Chem* **1996**, 68, 490-497

Simpson LL, Botulinum neurotoxin and tetanus neurotoxin, Academic **1989**, San Diego, CA

Singh P, Terminal groups in starburst dendrimers: activation and reactions with proteins, *Bioconj Chem* **1998**, 9, 54-63

Singh P, Moll F, Lin SH, Ferzli C, Yu KS, Koski RK, Saul RG und Cronin P, Starburst dendrimers: enhanced performance and flexibility for immunoassays, *Clin Chem* **1994**, 40, 1845-1849

Smith GP, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science* **1985**, 228, 1315-1317

Smith KO und Gehle WD, Magnetic transfer devices for use in solid-phase radioimmunoassays and enzyme-linked immunosorbent assays, *J Infect Dis* **1977**, 136, S329-S336

Smith LDS und Sugiyama H, Botulism. The organism, its toxins, the disease, 2. Auflage, CC Thomas **1988**, Springfield, IL

Smith-Gill SJ, Mainhart CR, Lavoie TB, Rudikoff S und Potter M, VL-VH expression by monoclonal antibodies recognizing avian lysozyme, *J Immunol* **1984**, 132, 963-967

Spillner E, Selektion und Expression von rekombinanten Antikörpern für analytische und therapeutische Applikationen, Dissertation **2002**, Cuvillier Verlag Göttingen

Staros JV, Wright RW und Swingle DM, Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reagents, *Anal Biochem* **1986**, *156*, 220-222

Stiles BG, Bavari S, Krakauer T und Ulrich RG, Toxicity of staphylococcal enterotoxins potentiated by lipopolysaccharide: major histocompatibility complex class II molecule dependency and cytokine release, *Infect Immun* **1993**, *61*, 5333-5338

Südhof TC, The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions, *Nature* **1995**, *375*, 645-653

Takamizawa K, Iwamori M, Kozaki S, Sakaguchi G, Tanaka R, Takayama H und Nagai Y, TLC immunostaining characterization of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids, *FEBS Lett* **1986**, *201*, 229-232

Takenaka S, Nishira S, Kondo H und Takagi M, Interaction of novel tris-intercalators with DNA: spectrofluorometric studies, *Nucleic Acids Symp Ser* **1992**, *27*, 71-72

Tang HT, Lunte CF, Hasall HB und Heineman WR, p-Aminophenyl phosphate: an improved substrate for electrochemical enzyme immunoassay, *Anal Chim Acta* **1988**, *214*, 187-195

Tibbitts TT, Xu X und Kantrowitz ER, Kinetics and crystal structure of a mutant *Escherichia coli* alkaline phosphatase (Asp-369->Asn): a mechanism involving one zinc per active site, *Protein Sci* **1994**, *3*, 2005-2014

Tiefenthaler K, Grating couplers as label-free biochemical waveguide sensors, *Biosens Bioelectron* **1993**, *8*, 35-37

Tomalia DA, Starburst/cascade dendrimers: fundamental building blocks for a new nanoscopic chemistry set, *Aldr Chim Acta* **1993**, *26*, 91-101

Tomalia DA, Naylor AM und Goddard WA, Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angew Chem Int Ed Engl* **1990**, *29*, 138-175

Ulitzur S und Kuhn J, Introduction of lux genes into bacteria: a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility, bioluminescence and chemoluminescence - new perspectives, Wiley **1987**, Bristol, 463-472

Ulman A, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chem Rev* **1996**, *96*, 1533-1554

Ulmer H, Mitrovics J, Weimar U und Gopel W, Sensor arrays with only one or several transducer principles? the advantage of hybrid modular systems, *Sens Actuators B* **2000**, *B65*, 79-81

van Ermengem EP, Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus, *Z Hyg Infekt krankh* **1897**, *26*, 1-56

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C *et al.*, The sequence of the human genome, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351

Walt DR, Bead based fiber optic arrays, *Science* **2000**, *287*, 451-454

Watts HJ, Lowe CR und Pollard-Knight DV, Optical biosensor for monitoring microbial cells, *Anal Chem* **1994**, *66*, 2465-2470

Weisch W, Klein C, von Schickfus M und Hunklinger S, Development of a surface acoustic wave immunosensor, *Anal Chem* **1996**, *68*, 2000-2004

Welin S, Elwing H, Arwin H und Lundström I, Reflectometry in kinetic studies of immunological and enzymatic reactions on solid surfaces, *Anal Chim Acta* **1984**, *163*, 263-267

Wilkins E, Atanasov P und Muggenburg BA, Integrated implantable device for long-term glucose monitoring., *Biosens Bioelectron* **1995**, *10*, 485-494

Wu TZ, A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: electronic nose, *Biosens Bioelectron* **1999**, *14*, 9-18

Xu G und Dong S, Electrochemiluminescent detection of chlorpromazine by selective preconcentration at a lauric acid-modified carbon paste electrode using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), *Anal Chem* **2000**, *72*, 5308-5312

Yu H und Bruno JG, Immunomagnetic electroluminescent detection of *E. coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples, *Appl Environ Microbiol* **1996**, *62*, 587-592

Zhou H, Roy S, Schulman H und Natan MJ, Solution and chip arrays in protein profiling, *Tr Biotechnol* **2001**, *19*, S34-S39

Zhu A, Monahan C, Zhang Z, Hurst R, Leng L und Goldstein J, High-level expression and purification of coffee bean α -Galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*, *Arch Biochem Biophys* **1996**, *324*, 65-70

VIII. Anhang

VIII.1 cDNA-Sequenzen

scFv B5

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcgccagccggcc
 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
 atggccgagggcagctgggtggagtctgggggaggcttggttaaagcctgggggtccctt
 M A E A Q L V E S G G G L V K P G G S L
 agactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaacgcctggatgagctgggtccgc
 R L S C A A S G F T F S N A W M S W V R
 caggctccaggaaggggctggagtgggttgccgtattaaaagcaaaactgatgggtggg
 Q A P G K G L E W V G R I K S K T D G G
 acaacagactacgctgcacccgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaaa
 T T D Y A A P V K G R F T I S R D D S K
 aacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgt
 N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C
 gcaagaggtaatccttttaggggtcggtcttggggccaaggtaccctggtcaccgtctcg
 A R G N P F R G R S W G Q G T L V T V S
 agtgggtggaggcggttcaggcggagggtggctctggcggtagtgcacttcagtctgtaatg
 S G G G S G G G G S G G S A L Q S V M
 nttcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcttgttctgga
 X Q P P S A S G T P G Q R V T I S C S G
 agcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtagcagcagctcccaggaacggcc
 S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A
 cccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctct
 P K L L I Y R N N Q R P S G V P D R F S
 ggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccgaggatgag
 G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E
 gctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgggtgctgggtgattcggcggaggg
 A D Y Y C A A W D D S L V A G V F G G G
 accaagctgaccgtcctaggtgcgccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaa
 T K L T V L G A A A H H H H H H G A A E
 caaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggcggcattttctatag
 Q K L I S E E D L N G A A F L -

scFv B20

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcgccagccggcc
 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
 atggcccaggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtg
 M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
 aaggtctcctgcaaggcttctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcca
 K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R
 caggcccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatctttggtacagca
 Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A
 aactagcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgaggacgaatccacgagcaca
 N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T
 gcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
 aatgagtaggtgttttctccggctacgcttgctagttggggccaaggtaccctggtcacc
 N E - V F S P A T L A S W G Q G T L V T
 gtctcgagtggtggaggcggttcaggcggagggtggctctggcggtagtgcacttcagtct
 V S S G G G G S G G G G S G G S A L Q S

VIII. Anhang

gtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaggggtcaccatctcttgt
V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C
tctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtagcagcagctcccagga
S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G
acggcccccaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccga
T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D R
ttctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgaggctccgggtccgag
F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E
gatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgggtattcggcggagggacc
D E A D Y Y C A A W D D S L V F G G G T
aagctgaccgtcctaggtgcgccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaa
K L T V L G A A A H H H H H H G A A E Q
aaactcatctcagaagaggatctgaatggggcggcatag
K L I S E E D L N G A A -

scFv S2

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcggcccagccggcc
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
atggccgaggtgcagctgggtggagtctgggggagggcttggtacagcctgggggggtccctg
M A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L
agactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccgt
R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R
caggctccagggagggggctggagtgggtctcagctattagtggttagtggtgtagcaca
Q A P G R G L E W V S A I S G S G G S T
tactacgcagactccgtgaagggccggtttcaccatctccagagacaattccaagaacacg
Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
ctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagggacacggcctgtattactgtgcaaga
L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
tctcatgcaatattagtagttggggccaaggtaccctgggcaccgtctcagagtggtgga
S H A N I S S W G Q G T L V T V S S G G
ggcggttcagggcggaggtggctctggcggtagtgcactttctctgagctgattcaggac
G G S G G G S G G S A L S S E L I Q D
cctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaaaggagacagcctc
P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D S L
agaagctattatgcaagctggtagcagcagaagccaggacagggccctgtacttgtcatc
R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I
tatggtaaaaaaacccggccctcagggatcccagaccgattctctggctccagctcagga
Y G K N N R P S G I P D R F S G S S S G
aacacagcttccttgaccatcactggggctcagggcgaagatgaggctgactattactgt
N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C
aactcccgggacagcagtggtactgtattcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggt
N S R D S S G T V F G G G T K L T V L G
gcgccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaactcatctcagaagag
A A A H H H H H H G A A E Q K L I S E E
gatctgaatggggcggcatag
D L N G A A -

scFv S26

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcggcccagccggcc
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
atggccgaggtgcagctgggtggagtctgggggagggcttggtaaagcctgggggggtccctt
M A E V Q L V E S G G G L V K P G G S L
agactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaacgcctggatgagctgggtccgc
R L S C A A S G F T F S N A W M S W V R
caggctccagggaaagggctggagtgggttggccgtattaaaagcaaaactgatggtggg
Q A P G K G L E W V G R I K S K T D G G
acaacagactacgctgcacccgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaaa

VIII. Anhang

T T D Y A A P V K G R F T I S R D D S K
aacacgctgtatctgcaaataaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgt
N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C
gcaagaagttctaagcgtgatttgaatcattctatgaagtggggccaaggtaccctggtc
A R S S K R D L N H S M K W G Q G T L V
accgtctcgagtggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtagtgcactttct
T V S S G G G G S G G G G S G G S A L S
tctgagctgactcaggaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcaca
S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T
tgccaaggagacagcctcagaagctattatgcaagctggtagcagcagaagccaggacag
C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q
gcccctgtacttgtcatctatggtaaaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgattc
A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F
tctggctccagctcaggaaacacagcttcccttgaccatcactggggctcaggcgggaagat
S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D
gaggctgacttactgtaactcccgggacagcagtggttaaccatgtattcggcggaggg
E A D Y Y C N S R D S S G N H V F G G G
accaagctgaccgtcctaggtgcgccgcacatcatcatcaccatcacggggccgcagaa
T K L T V L G A A A H H H H H H G A A E
caaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggccgcatag
Q K L I S E E D L N G A A -

scFv B_{III}-1

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcgcccagccggcc
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
atggccgaggtgcagctggaggctggggaggcttagttcagcctggggggtccctg
M A E V Q L V E S G G G L V Q P G S L
agactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctactggatgcactgggtccgc
R L S C A A S G F T F S S Y W M H W V R
caagctccaggggaaggggctgggtgtgggtctcacgtattaatagtgatgggagtagcaca
Q A P G K G L V W V S R I N S D G S S T
agctacgaggactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacg
S Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T
ctgtatctgcaaataaacagctctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga
L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
gatgatgctaagcgttggggccaaggtaccctggtcaccgtctcgagtggtggaggcgg
D D A K R W G Q G T L V T V S S G G G G
tcaggcggaggtggctctggcggtagtgcactttctctgagctgattcaggaccctgct
S G G G G S G G S A L S S E L I Q D P A
gtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaaggagacagcctcagaagc
V S V A L G Q T V R I T C Q G D S L R S
tattatgcaagctggtagcagcagaagccaggacagggcccctgtacttgtcatctatggt
Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y G
aaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgattctctggctccagctcaggaaacaca
K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T
gcttcccttgaccatcactggggctcaggcgggaagatgaggctgactattactgtaactcc
A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S
cgggacagcagtggtactgtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggtgcgggc
R D S S G T V F G G G T K L T V L G A A
gcacatcatcatcaccatcacggggccgcagaaacaaaactcatctcagaagaggatctg
A H H H H H H G A A E Q K L I S E E D L
aatggggccgcatag
N G A A -

scFv B_{III}-5

atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggttattactcgcgcccagccggcc
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A

VIII. Anhang

atggcccaggtgcagctggtggagtctggaggaggcttgatccagcctgggggggcctctg
M A E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L
agactctcctgtgcagcctctgggttcaccgtcagtagcaactacatgagctgggtccgc
R L S C A A S G F T V S S N Y M S W V R
caggctccaggaaggggctggagtgggtctcagttatattatagcgggtggtagcacatac
Q A P G K G L E W V S V I Y S G G S T Y
tacgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctg
Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L
tatcttcaaatgaacagcctgagagccgagacacggccgtgtattactgtgcaagagcg
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R A
gcgctctaattggggccaaggtaccaggtcaccgtctcgagtgggtggaggcggttcaggc
A S N W G Q G T Q V T V S S G G G S G
ggaggtggctctggcggtagtgcacttgatggttgatgactcagctctccactctccctg
G G G S G G S A L D V V M T Q S P L S L
cccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagcctcctgcat
P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H
agtaatggatacaactatattgaattggtacctgcagaagccagggcagctctccacagctc
S N G Y N Y L N W Y L Q K P G Q S P Q L
ctgatctatattgggttctaatecgggcctccggggctcctgacaggttcagtggcagtgga
L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G
tcaggcacagattttactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatggtgggggttat
S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y
tactgcatgcaagctctacaaactgcgcgtcctacgttcggccaagggaccaagctggaa
Y C M Q A L Q T R R P T F G Q G T K L E
atcaaacgtgcgccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaactcatc
I K R A A A H H H H H G A A E Q K L I
tcagaagaggatctgaatggggccgcatag
S E E D L N G A A -

α -D-Galaktosidase (*Glycine max*)

gcccagccggccaatggacttggccatacacccccatgggatggaatagctggaaccat
A Q P A N G L G H T P P M G W N S W N H
tttgctgcaatattaaagaagacttaattcgagaaacagccgatgctatggtgtcaact
F A C N I K E D L I R E T A D A M V S T
ggccttgctgctctaggttaccatataatatacatagatgattggtggggagagcttaac
G L A A L G Y Q Y I N I D D C W G E L N
cgagactcaaagggcaatttgggttcccaagcctcaacatttccttccggaatgaaggct
R D S K G N L V P K A S T F P S G M K A
ctagctgattatggtcataaaaatggtttgaagttggggatataattctgatgcaggaaat
L A D Y V H K N G L K L G I Y S D A G N
caaacgtgcagtaaaactatgcctggatcacttggacatgaagaacaagatgcaaaaaa
Q T C S K T M P G S L G H E E Q D A K T
tttgcttctgggggattgactacttgaagtatgataactgtgagaataacaatataagc
F A S W G I D Y L K Y D N C E N N N I S
cccaaagaaaggtaccctccaatgagtgaagctttggcaaacactggaaggccaattttc
P K E R Y P P M S E A L A N T G R P I F
ttctctttgtgtgaatggggatcagaagatccagcaacttgggcaaaaagtgtgggaaat
F S L C E W G S E D P A T W A K S V G N
agttggagaacaacaggagacattcaagataagttggatagtatgatatctcgtgcagat
S W R T T G D I Q D K W D S M I S R A D
ctaaatgacaaatgggcttcttatgctggacctggaggatggaatgatcctgacatgcta
L N D K W A S Y A G P G G W N D P D M L
gaagttggaaatggaggctgacaacagaagaatcgtgctcatttcagcatatggtca
E V G N G G M T T E E Y R A H F S I W S
ttagctaaggctcctttggttgattggttgatgacattagagcactggatgccaccacaaa
L A K A P L L I G C D I R A L D A T T K
gaattgctaagcaacaaagaagttattgagttaatcaagacaagcttggagttcaagga
E L L S N K E V I A V N Q D K L G V Q G
aagaaggtgaaaagtactaatgatttagaggtttgggcaggtcctctcagtaataacaag
K K V K S T N D L E V W A G P L S N N K

VIII. Anhang

```

gtagcagtgatccttatggaatagaagttcatccaaagcaaaagttactgcatcctgggtct
V A V I L W N R S S S K A K V T A S W S
gacataggcctgaaacctggaacttcagttgaagcaagagatttatgggcgcatccaaca
D I G L K P G T S V E A R D L W A H S T
caatcatctgtttcgggagaaatatctgctgaattagattcacatgcttgtaagatgtat
Q S S V S G E I S A E L D S H A C K M Y
gtcgtcactcctaacgcggccgc
V V T P N A A A

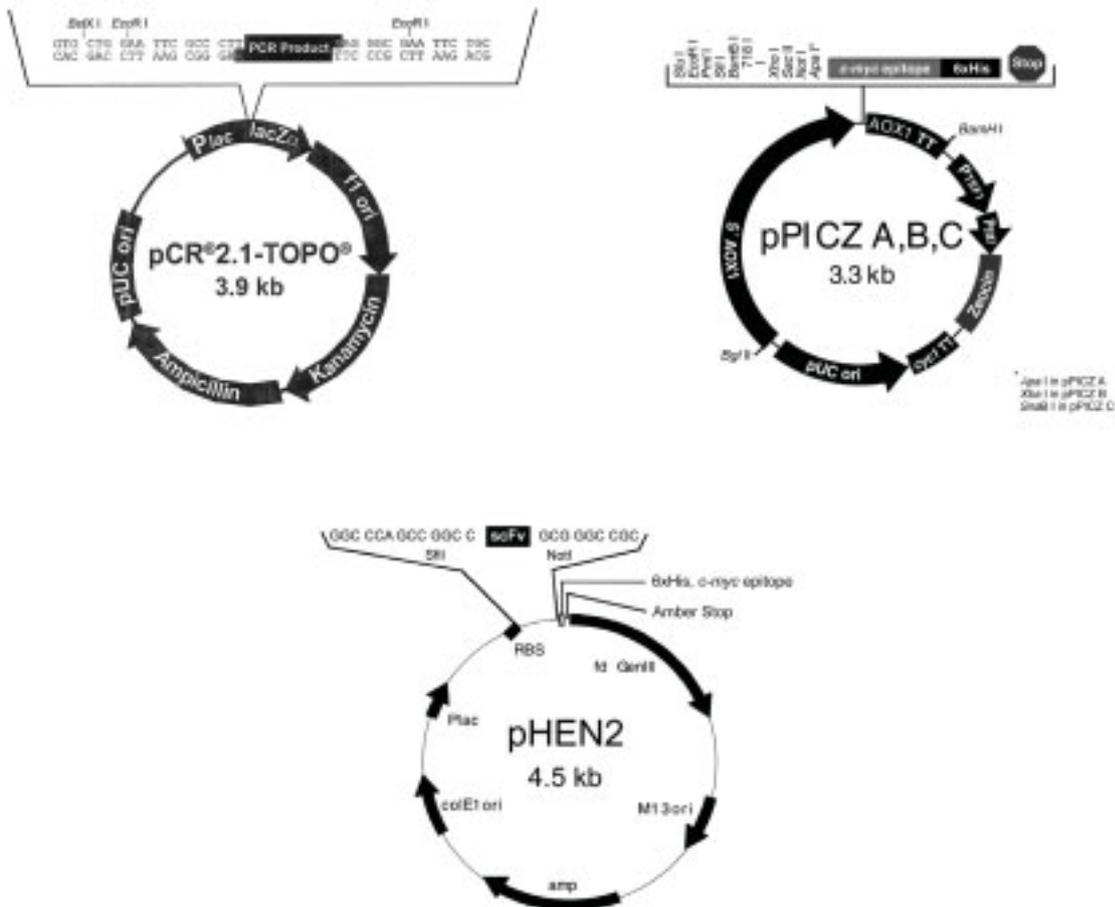
```

VIII.2 Oligonukleotid-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz	T _s [°C]
lmb3	CAG GAA ACA GCT ATG GAC	49
fdseq	GAA TTT TCT GTA TGA GG	45,5
GAPDHright	CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA	56,6
GAPDHleft	TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA	60,4
SojN100%	AAT GGA CTT GGC CAT ACA C	54,5
SojC100%	GTT AGG AGT GAC GAC ATA C	54,5
SojbackN	GTA CGG CCC AGC CGG CCA ATG GAC TTG GCC ATA CAC	77,4
SojCback	GTC AGC GGC CGC GTT AGG AGT GAC GAC ATA C	73,5
SMvor	TGA AGC TTT GGC AAA CAC TG	55,3
SMback	CAT GCC TCC ATT TCC AAC TTC	57,7
M13 universal	GTA AAA CGA CGG CCA GTG CCA A	63,6
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG A	57,7
5'-AOX	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	57,8
3'-AOX	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC	57,7

VIII.3 Vektorkarten

Die Vektoren pCR2.1-TOPO und pPICZ α B (Invitrogen, Groningen, NL) wurden zur Klonierung und Expression in *P. pastoris* (GS115) genutzt. Zur Selektion von scFv und Expression in *E. coli* (TG-1, HB2151) wurden pHEN2-Phagemide (MRC CPE Cambridge, UK) verwendet.



Danksagung

Ich möchte all jenen danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit in der vorliegenden Weise fertigzustellen:

Prof. Dr. R. Bredehorst danke ich für das zur Verfügung gestellte Thema, die anregenden Diskussionen sowie die Unterstützung während der gesamten Zeit. Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Dr. R. Hintsche und der Abteilung Biotechnische Mikrosysteme möchte ich danken für die konstruktiven Diskussionen, die mir gewährten Einblicke und die abwechslungsreiche Zeit in Itzehoe.

Dr. T. Grunwald sei gedankt für unzählige hilfreiche Diskussionen, das Vertrauen und die Motivation.

Dr. E. Spillner danke ich für seine geduldige Art, schier endlose Diskussionen und die Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die prägende gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors, das freundliche Arbeitsklima und Freundschaft, insbesondere Thorsten Mix, Thorsten Riekmann, Benjamin Bockisch, Ingke Braren, Susanne Deckers, Johanna Kölln, Lars Redecke, Dr. H. Bammert, Kerstin Greunke, Khadiga Jenjan, Jan Münster, Amir Sabri, Hanna Schröder-Borm und Dr. P. Ziegelmüller. Dr. E. Nebling, Bruno Elsholz und Mladen Simonovic möchte ich für die gute Laboratmosphäre danken.

Bei Leonie Bubenheim und Conny West bedanke ich mich für den freigehaltenen Rücken auf administrativer Ebene.

Dem Arbeitskreis Meyer danke ich für die kommunikationsfördernde Kurzweil während längerer Laborabende; insbesondere Dr. J. Dojahn und Christian Flügge für diverse ESI-MS-Sessions.

