

Lehrstuhl für Anorganische Chemie
der Technischen Universität München

**Amperometrischer Immunosensor
auf Basis von Interdigitalstrukturen
und
Anwendung als
in vitro Allergietest**

Corinna Haindl

Vollständiger Abdruck der von der
Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
3. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken

Die Dissertation wurde am 27.10.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 27.11.2003 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2001 bis Oktober 2003 in Kooperation mit der Siemens AG München Abteilung für Sensors and Actuators (CT PS 8) im Rahmen der Vorfeldentwicklung angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	4
2.1 Immunsystem und Allergie	4
2.1.1 Antigene und Allergene	5
2.1.2 Die Zellen des Immunsystems	5
2.1.3 Die humorale Immunantwort	7
2.1.4 Antikörper	8
2.1.5 Entstehung einer allergischen Reaktion	10
2.2 Immunosensoren	11
2.2.1 Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen	12
2.2.2 Aufbau der Immunoassays	14
2.2.2.1 Auslesetechnologien	14
2.2.2.2 Kompetitives und nicht-kompetitives Design	15
2.3 Modifizierung von Goldoberflächen	18
2.3.1 Selbstorganisierte Monolagen auf Goldelektroden	18
2.3.2 Kopplungschemie an Oberflächen	20
2.3.3 Immobilisierung mittels Avidin-Biotin	22
2.3.4 Immobilisierung mittels Protein A, G, G' oder L	23
3. AUFBAU DES MESSSYSTEMS MIT DEM MULTIPOTENTIOSTATEN CIPO	26
3.1 Multipotentiostat Modell CIPO	27
3.2 Immunochips	27
3.3 Fluidik	29
3.4 Beschichtung	30
4. UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE	32
4.1 Amperometrische Auslesemethode - Redoxrecycling	32
4.1.1 Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Faktoren auf die Signalintensität des amperometrischen Ausleseschritts	36
4.1.1.1 Abhängigkeit von der Größe der Interdigitalstrukturen	36
4.1.1.2 Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Sensoren	38
4.1.1.3 Spannungsabhängigkeit	39
4.1.1.4 Cyclische Voltammetrie	40
4.1.1.5 Konzentrationsabhängigkeit	43
4.1.1.6 pH-Abhängigkeit	44
4.1.1.7 Abhängigkeit vom Fluss	46
4.1.1.8 Elektrodenbeschichtung	49
4.1.2 Diskussion	59

4.2 Entwicklung eines biologischen Testdesigns	61
4.2.1 Beschichtung der Sensoren und Durchführung der Messungen	64
4.2.2 Optimierung des Detektionsschrittes	65
4.2.2.1 Abhängigkeit von der Enzymkonzentration	65
4.2.2.2 Abhängigkeit von der Beschichtungsdauer	67
4.2.2.3 Diskussion	69
4.2.3 Immobilisierung mittels Cysteamin	69
4.2.3.1 on-chip Kopplung von Cysteamin und Maus IgG	69
4.2.3.2 Blockversuch mit Butanthiol	71
4.2.3.3 Kopplung von Maus IgG und Cysteamin vor der Beschichtung	73
4.2.3.4 Blockversuche bei der Beschichtung mit Cysteamin-gekoppeltem Maus IgG	75
4.2.3.5 Diskussion	78
4.2.4 Immobilisierung mittels Avidin-Biotin	79
4.2.4.1 Versuch ohne Blockschrift	79
4.2.4.2 Versuch mit BSA Blockschrift	80
4.2.4.3 Diskussion	82
4.2.5 Versuche zur Immobilisierung mittels Protein A, G und G'	82
4.2.5.1 Protein A mit BSA als Blockreagenz	83
4.2.5.2 Protein A mit BSA als Blockreagenz, Chip vorher silanisiert	85
4.2.5.3 Vergleich der Blockwirkung von BSA gegenüber dem Detektionsantikörper mit und ohne Protein A	87
4.2.5.4 Konzentrationsabhängigkeit des BSA-Blockschrittes	88
4.2.5.5 Abhängigkeit des Sensorsignals von der antikörperproduzierenden Spezies	89
4.2.5.6 Protein A mit verschiedenen Blockreagenzien	91
4.2.5.7 Protein G und Protein G' mit BSA als Blockreagenz	93
4.2.5.8 Untersuchung der Langzeitstabilität des Protein A-BSA-Systems	95
4.2.5.9 Untersuchung zur Regenerierbarkeit der Protein A-Maus IgG-Bindung	97
4.2.5.10 Diskussion	98
4.3 Entwicklung eines in vitro Allergietests – Nachweis von Der p2-spezifischem IgE	101
4.3.1 Aufbau des Tests	102
4.3.2 Immobilisierung des Fängerantikörpers 1D8	103
4.3.3 Versuche zur Detektion von Human IgE bzw. Ch1 mittels Anti-Human IgE (AP)	105
4.3.4 Untersuchungen zum Nachweis von Der p2-spezifischem IgE - Entwicklung eines Aufbaus für <i>in vitro</i> Allergietests	107
4.3.4.1 Testaufbau mit Der p2 standard als Allergen	107
4.3.4.2 Testaufbau mit rekombinantem Der p2.0102 als Allergen	109
4.3.4.3 Untersuchung zur unspezifischen Bindung des Detektionsantikörpers	111
4.3.4.4 Diskussion	112
4.4 Untersuchungen mit Blutproben	113
4.4.1 Verwendete Blutproben	113
4.4.2 Messergebnisse	115
4.4.3 Diskussion	119
5. ZUSAMMENFASSUNG	121
ANHANG	125
A.1 Durchführung von Messungen mit dem Mikropotentiostaten CIPO	125
A.2 Durchführung von Messungen mit dem Mikropotentiostaten MCP-2	126
A.3 Bestimmung von Gesamtschwefel in Proteinen	128
A.4 Abkürzungsverzeichnis	130
A.5 Verwendete Reagenzien	131
A.6 Beschichtung der Sensorchips	133
LITERATUR	134

1. Einleitung

Die biomolekulare Erkennung stellt das zentrale Ereignis im Stoffwechsel lebender Systeme dar. Sei es die Markierung von Antigenen durch Antikörper, die Umsetzung von Substraten durch Enzyme oder die Auslösung von Signalen durch Hormone: Jeder dieser Prozesse beruht zunächst auf der spezifischen Bindung eines Liganden an einen biologischen Rezeptor.

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie, konnten in den letzten Jahrzehnten Mechanismus und Funktion dieser biochemischen Prozesse ausführlich charakterisiert werden und inzwischen ist auch die biotechnologische Synthese der an diesen Prozessen beteiligten Proteinkomponenten möglich.

Diese Entwicklungen haben vielversprechende Perspektiven in der Anwendung eröffnet. Im Bereich der Analytik ergeben sich mit der sogenannten *Affinitätsanalytik* neue Möglichkeiten, die sich durch die außergewöhnliche Affinität und Selektivität biochemischer Rezeptorkomponenten, sowie durch die Vielfältigkeit der möglichen Einsatzgebiete auszeichnen. Aus diesem Grund hat dieser Zweig der analytischen Chemie, die sogenannte *Biosensorik*, in den letzten Jahren eine starke Entwicklung erlebt [1].

Biosensoren stellen komplexe Systeme dar, deren zentrale Problemstellung in der Umwandlung einer biochemischen Reaktion in ein messbares Sensorsignal besteht. Ausgehend von einem *physikalischen Sensor*, der in der Regel direkt auslesbare Messgrößen liefert (z.B. Thermometer, Barometer, Spektrometer) erfordert bereits der Übergang zu chemischen Sensoren den Einsatz eines Transducers, d.h. eines Messwertumwandler, der die vom Sensormaterial erfassbaren Informationen in ein elektrisch messbares Signal umwandelt. *Chemische Sensoren* besitzen meist eine sensitive Schicht auf einem Transducer, der eine elektrische Auslesung der Reaktionen ermöglicht (z.B. pH-Wert Messung). Hierbei sind die Selektivität, Sensitivität und Stabilität die zentralen Anforderungen an die Beschichtung. Übergehend zu den *Biosensoren* erweitern sich diese Anforderungen: Da die sensitive Schicht eine biologisch aktive Komponente ist, die an die Oberfläche des Transducers angekoppelt werden soll, müssen sterische Verhältnisse und die Bewahrung der Aktivität der Beschichtung im Vordergrund stehen.

Besonders die *Immunosensoren*, wie die Biosensoren auf Basis von Antikörperreaktionen bezeichnet werden, haben sich im Bereich der medizinischen Diagnostik, sowie in der Nahrungsmittel- und Umweltanalytik inzwischen etabliert [2-6]. Für diese

Anwendungsbereiche ist zum einen die hohe Selektivität und Empfindlichkeit des Sensorsystems entscheidend, zum anderen ein robuster, kostengünstiger Aufbau, der zudem einfach anzuwenden ist.

Als Konsequenz besteht ein großes Interesse an der Entwicklung universeller und wirtschaftlicher Methoden für den Nachweis und die Charakterisierung biochemischer Affinitätsreaktionen, die sich durch

- eine schnelle Auslesung ohne Probenvorbereitung,
- eine möglichst hohe Anzahl parallel analysierbarer Proben und
- einen möglichst geringen Reagenzienverbrauch

auszeichnen sollten.

Klassische Verfahren in der Biosensorik beruhen auf der enzymatischen oder radioaktiven Markierung einer der wechselwirkenden Komponenten und der anschließenden Auslesung einer enzymatisch katalysierten Sekundärreaktion (meist photometrische Auslesung einer Farbreaktion) oder des radioaktiven Zerfallsprozesses. Es existieren auch markierungsfreie Nachweisverfahren, wie z.B. die Quarzmikrowaage, bei der eine massenbedingte Resonanzfrequenzänderung eines Oszillators gemessen wird, oder die Oberflächenplasmonenresonanz, bei der die schichtdickenbedingte Resonanzverschiebung eines Oberflächenplasmons ausgelesen wird.

Die zuletzt genannten Methoden haben den Vorteil, dass die biologisch aktive Komponente nicht modifiziert werden muss und daher keine Aktivitätseinbußen zu erwarten sind, der apparative und finanzielle Aufwand solcher Technologien ist jedoch hoch.

Die Auslegungsmethoden mittels enzymmarkierter Komponenten sind sehr vielseitig, neben der photometrischen Auslesemethode, die sehr gut charakterisiert ist und in den oben genannten Anwendungen der Immunosensoren zur Anwendung kommt, stehen auch andere Methoden auf Basis von Fluoreszenz oder elektrochemischen Reaktionen zur Verfügung.

Letztere sind vor allem im Zuge der zunehmenden Miniaturisierung interessant. Neue Silizium-Technologien ermöglichen die Herstellung von Biosensorarrays mit mehreren hundert Messpunkten mit einer Größe im cm^2 Bereich und vereinbaren damit den Vorteil einer großen Empfindlichkeit mit geringen benötigten Analytmengen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung eines solchen miniaturisierten Immunosensors auf Basis von Gold-Interdigitalstrukturen im Submikrometer-Bereich auf einem Siliziumchip gezeigt werden [7]. Die zentralen Schritte sind dabei die ausführliche Charakterisierung des amperometrischen Ausleseschritts, sowie die Untersuchung unterschiedlicher Methoden zur Immobilisierung der biologischen Komponente auf den Goldelektroden.

Da sich die verwendete Technologie dadurch auszeichnet, dass sie bei Verwendung der entsprechenden Chips die Auslesung zahlreicher Positionen bei Einsatz einer sehr geringen Analytmenge ermöglicht, wurde sie für die Anwendung als *in vitro* Allergiediagnostik getestet. Da allergische Erkrankungen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben und einer erfolgreichen Therapie bislang eine recht langwierige und schmerzhafte Identifizierung des Allergieauslösers („Pricktest“) vorausgeht, stellt die Möglichkeit, auf einem Chip mit einem Milliliter Blut über 100 Allergene auslesen zu können, eine reizvolle Alternative dar. Anhand des Hausstaubmilbenallergens Der p2, welches eines der bedeutensten Allergieauslöser im Haushalt darstellt, soll innerhalb dieser Arbeit die Funktionsfähigkeit der entwickelten Technologie für eine solche Anwendung gezeigt werden.

2. Grundlagen

2.1 Immunsystem und Allergie

Ständig ist der menschliche Organismus einer großen Zahl von Erregern ausgesetzt. Sie befinden sich in der Luft, ebenso wie in der Nahrung oder in der Umwelt und gelangen über Atmung, Nahrungsaufnahme oder Hautkontakt ins Körperinnere. Dass nicht jeder dieser Erreger zum Auslöser einer Krankheit wird, ist dem vielschichtigen Abwehrsystem des Körpers zu verdanken. Mit Hilfe des Immunsystems ist der menschliche Körper in der Lage, körperfremde Stoffe wie Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten oder geschädigte körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren.

Das Immunsystem besteht aus vielen ineinandergreifenden Mechanismen, die sich aus Organen (z.B. Haut), aus den Abwehrzellen der weißen Blutkörperchen, den Leukozyten, und aus löslichen Proteinen, den Immunglobulinen, zusammensetzen. Die Haut und die Schleimhäute verhindern zunächst durch Ausbildung des Säureschutzmantels und durch Schleimsekretion das Eindringen der meisten Krankheitserreger. Kommt es durch eine Verletzung der natürlichen Schutzfunktion der Haut, durch Nahrungsaufnahme oder Atmung zum Eindringen des Erregers, so kommen für seine Vernichtung unterschiedliche Mechanismen in Frage. Zum einen die unspezifische Abwehrreaktion durch die sogenannten Natürlichen Killerzellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), die jeden als körperfremd erkannten Stoff „phagozytieren“ oder „auffressen“, zum anderen die spezifischen Immunreaktionen (zelluläre und humorale Immunantwort) durch die B- und T-Zellen, die auf der spezifischen Erkennung des Antigens durch einen Zell-Rezeptor und einer dadurch ausgelösten Zellreaktion beruhen. Die humorale Immunreaktion beruht dabei auf der Bildung von spezifischen Antikörpern, während die zelluläre Immunantwort direkt von den Zellen ausgeführt wird [8].

2.1.1 Antigene und Allergene

Antigene sind allgemein Substanzen, die das Immunsystem als fremd erkennt und auf die es mit der Produktion von Antikörpern (Immunglobulinen) reagiert. Meist handelt es sich hierbei um Proteine viralen oder bakteriellen Ursprungs mit einem Molekulargewicht von mindestens 5 kDa, welche über mehrere bindungsfähige Teilstrukturen (Epitope) verfügen, die aus jeweils 5-8 Aminosäuren bestehen und die Angriffstelle für Zellrezeptoren bzw. Antikörper bilden. Auch andere makromolekulare Substanzen mit einem entsprechenden Molekulargewicht können eine Immunreaktion auslösen, wenn sie in ausreichender Konzentration vorliegen und chemische Teilstrukturen besitzen, die das Immunsystem erkennt. Zu dieser Gruppe gehören Nucleinsäuren, Polysaccharide, Lipopolysaccharide oder synthetische Makromoleküle wie Latex oder Silicon. Kleine Moleküle aus den unterschiedlichsten chemischen Substanzklassen, sogenannte Haptene, können ebenfalls eine Immunreaktion auslösen, sie benötigen aufgrund ihrer geringen Größe jedoch einen sogenannten Carrier, ein hochmolekulares Trägermolekül, um das Immunsystem zu aktivieren. Bekannte Beispiele für diese Gruppe sind Medikamente, Pestizide, Konservierungsmittel und Farbstoffe.

Allergene sind Antigene, die eine allergische Reaktion auslösen. Prinzipiell besitzt jedes Antigen das Potential zum Allergen, ausschlaggebend für die Heftigkeit der Reaktion sind hauptsächlich die Verfassung des Empfängerorganismus, Dosis und chemischer Charakter des Allergens, Grad der Körperfremdheit und Abbaufähigkeit des Allergens im Organismus. Die bekanntesten Allergenlieferanten sind Blütenpollen, Tierhaare und Hausstaubmilben.

2.1.2 Die Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus Leukozyten unterschiedlicher Funktionalität, die im Blut und den Lymphgefäßen zur Abwehr körperfremder Substanzen zirkulieren. Das angeborene Immunsystem besteht aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen, es ist bei allen Individuen gleich und verfügt über keine spezifischen Antigenrezeptoren [9]. Nach dem Erstkontakt mit unterschiedlichen Antigenen wird das angeborene Immunsystem durch das adaptive Immunsystem erweitert, welches aus den sogenannten B- und T-Zellen (B-, T-Lymphozyten) besteht, die Antigen-spezifische Rezeptoren besitzen.

Nachfolgend werden die wichtigsten Eigenschaften der unterschiedlichen Zelltypen kurz zusammengestellt:

Die *neutrophilen Granulozyten* bilden den Hauptbestandteil der zirkulierenden Leukozyten, für ihre Produktion werden etwa 60% des Knochenmarks beansprucht. Ihre Hauptaufgabe ist die Vernichtung eingedrungener Mikroorganismen durch Aufnahme in das Zellinnere, Abtötung durch mikrobizide Substanzen und letztlich die enzymatische Verdauung. Dieser Vorgang wird „Phagozytose“ genannt.

Die *Mastzellen* im Gewebe und die *basophilen Granulozyten* im Blut sind die Leukozyten, die die Entzündungsreaktion bei allergischen Sofortreaktionen auslösen. Sie tragen Rezeptoren für Immunglobuline der Klasse E und enthalten Mediatoren (Botenstoffe) wie z.B. Histamin, die bei einer allergischen Reaktion ausgeschüttet werden.

Die *Eosinophilen Granulozyten* sind ebenfalls an der Phagozytose beteiligt, zudem an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, der Bekämpfung von Parasitenbefall und allergischen Reaktionen.

Monozyten und *Makrophagen (Fresszellen)* übernehmen nach den Granulozyten die weiteren Abwehrreaktionen. Monozyten differenzieren im Knochenmark von Promonozyten und zirkulieren nach dem Verlassen des Knochenmarks für 12 Stunden im Blut. Danach wandern sie in Gewebe wie Bindegewebe, Leber, Lunge und Haut, wo sie spezielle Aufgaben wie Phagozytose und Zytotoxizität (Zerstörung von Zielzellen) übernehmen und Makrophagen genannt werden.

B-Zellen stammen aus dem Knochenmark und produzieren Antigen-spezifische Immunglobuline, die sie an ihrer Oberfläche als Rezeptoren anlagern. Erkennt die B-Zelle mit einem Rezeptor ein Antigen, so erfolgt eine Bindung und die B-Lymphozyten werden aktiviert und in B-Effektorzellen (Plasmazellen) und B-Gedächtniszellen differenziert. Die Plasmazellen führen zur Ausschüttung von Antikörpern, die Gedächtniszellen bewirken, dass bei einem weiteren Antigen-Kontakt eine schnellere Immunantwort möglich ist [10].

T-Zellen werden in der Thymusdrüse geprägt und dienen der Vernichtung von geschädigten oder von Mikroorganismen befallenen Zellen. Sie reagieren nicht auf freie Antigene sondern nur auf einzelne Peptidsequenzen zellgebundener Antigene, den sogenannten Haupt-Histokompatibilitätskomplexen. Diese werden an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. B-Zellen, Monozyten, Makrophagen) exponiert [11] und transportieren auf diesem Weg gebundene Antigenfragmente zu den T-Zellen.

2.1.3 Die humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort ist die von den B-Zellen gesteuerte „normale Immunreaktion“ beim Eindringen eines körperfremden Antigens in den Organismus. Das Antigen wird dabei zunächst von Makrophagen vereinnahmt, zerlegt und die Proteinbruchstücke in einem Haupt-Histokompatibilitätskomplex an die Oberfläche der Makrophagen transportiert. Dort werden sie von T-Zellrezeptoren erkannt und es kommt zu einer Aktivierung mit folgender Differenzierung und Vermehrung der T-Zellen in T-Gedächtniszellen, T-Entzündungszellen und T-Helferzellen. Die T-Gedächtniszellen führen zu keiner direkten Immunreaktion, sie bleiben jedoch über lange Zeit im Organismus und speichern die Informationen des Antigens. Die T-Entzündungszellen aktivieren weitere Makrophagen zur Vereinnahmung neuer Erreger, während die T-Helferzellen mit B-Zellen, die den entsprechenden Rezeptor besitzen, in den Lymphknoten mittels Mediatoren (Botenstoffen) Kontakt aufnehmen und diese aktivieren. Es erfolgt eine Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen und B-Gedächtniszellen. Die entstandenen Plasmazellen produzieren nun zahlreiche Antikörper gegen das Antigen des eingedrungenen Erregers, die B-Gedächtniszellen werden ebenso wie die T-Gedächtniszellen lange Zeit gespeichert [12].

Der Ablauf der humoralen Immunantwort ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt:

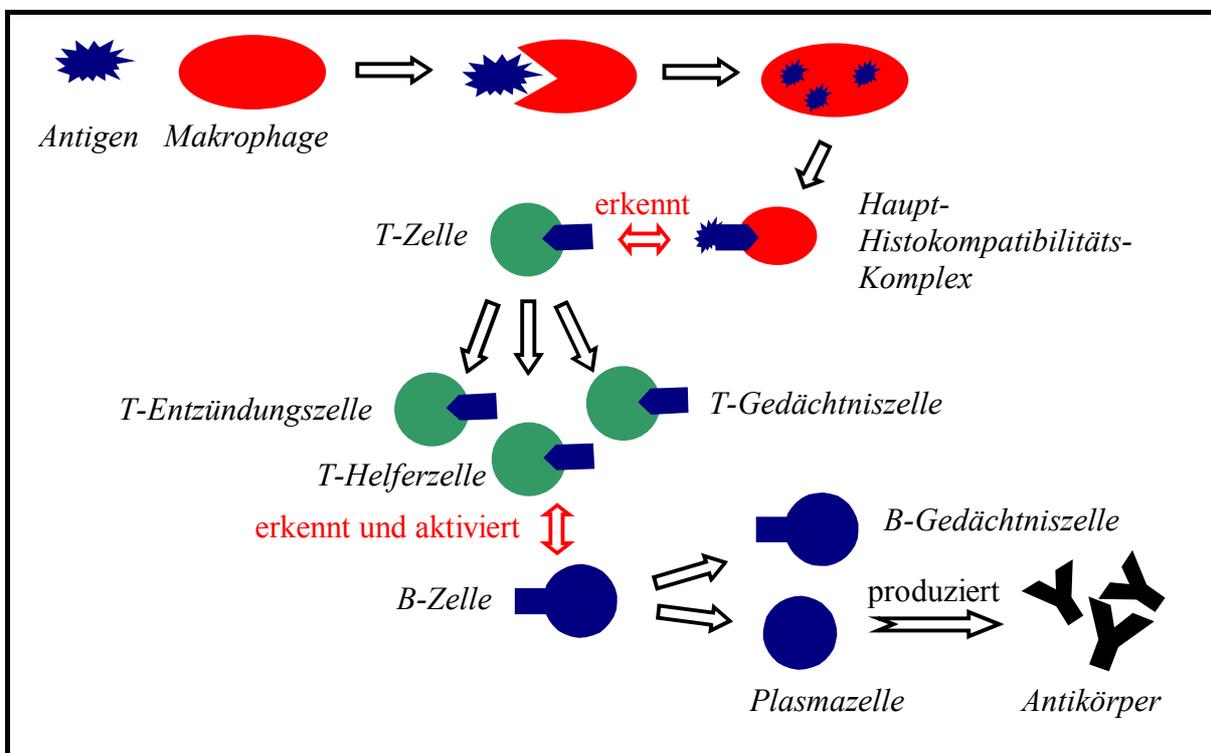


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humoralen Immunantwort

2.1.4 Antikörper

Antikörper sind von den B-Zellen (B-Lymphozyten) des Immunsystems gebildete Glycoproteine und stellen die Antwort des Immunsystems auf den Kontakt mit einer körperfremden Substanz dar. Eine B-Zelle trägt an ihrer Oberfläche einen spezifischen Rezeptor, welcher beim ersten Kontakt das Antigen bindet und die sogenannte primäre Immunantwort auslöst. Dabei findet eine Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen in Plasma- und Gedächtniszellen statt, was bewirkt, dass bei einer weiteren Immunisierung mit demselben Antigen größere Mengen an Antikörpern (Immunglobulinen) ausgeschüttet werden (sekundäre Immunantwort). Da ein Antigen über verschiedene bindungsfähige Teilstrukturen (Epitope) an B-Zellen-Rezeptoren gebunden werden kann, werden bei unterschiedlichen Typen von B-Zellen Immunreaktionen ausgelöst. Jeder Typ regt die Produktion eines eigenen Antikörperklons an, weshalb man die entstandenen Antikörper als „polyklonale“ Antikörper gegen das jeweilige Antigen bezeichnet.

Durch die zelltechnische Vermehrung von B-Lymphozyten ist es möglich, monospezifische, sogenannte „monoklonale“ Antikörper herzustellen. Die B-Zelle wird durch Fusion mit einer permanent wachsenden Tumorzelle (Myelomzelle) verschmolzen, es entsteht eine sogenannte „Hybridomzelle“, die die Eigenschaften beider Zelltypen, die Antikörperproduktion und das permanente Wachstum miteinander vereint [13, 14].

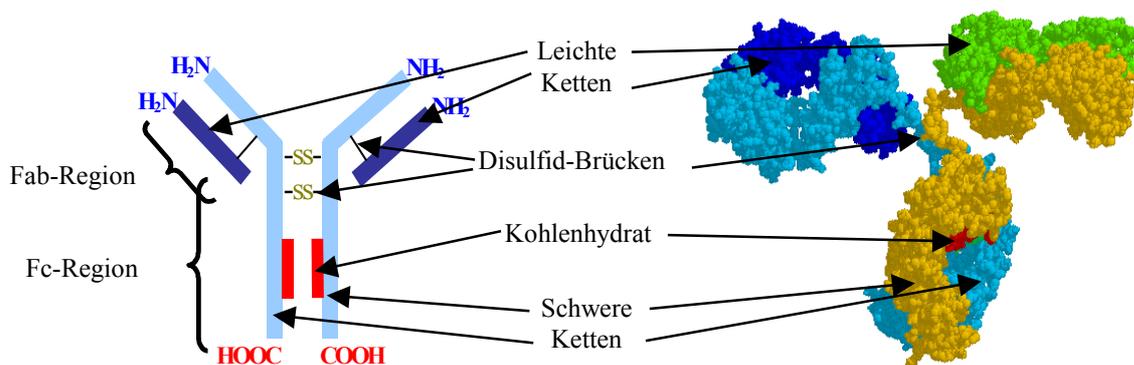


Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Strukturmodell eines IgG-Antikörpers [15-17]

Abbildung 2 zeigt den Y-ähnlichen schematischen Aufbau und das Strukturmodell eines Immunglobulins der Klasse G (IgG). Neben den Typen IgA, IgD, IgE und IgM bilden die etwa 150 kDa schweren IgG mit rund 80% den Hauptvertreter aller Antikörper. Das Grundgerüst des Glycoproteins stellen zwei Polypeptidketten, die sogenannten „schweren Ketten“, aus etwa 450-550 Aminosäuren dar (in Abbildung 2 hellblau bzw. gelb), die über

Disulfid-Brücken kovalent mit den „leichten Ketten“ aus etwa 220 Aminosäuren (in Abbildung 2 dunkelblau bzw. grün) verknüpft sind. Die schweren Ketten tragen die für den Namen „Glycoprotein“ verantwortlichen Kohlenhydrat-Seitenketten (in Abbildung 2 rot).

Durch enzymatische Spaltung mit Papain kann der Y-ähnliche Aufbau des Immunglobulins in drei Fragmente gespalten werden: Die beiden Arme des Y bilden zwei identische „Fab-Fragmente“ (Fragment antigen binding), sie tragen die antigenbindenden funktionellen Gruppen und variieren je nach Spezifität des Antikörpers. Der Fuß des Y bildet das dritte Fragment ohne Antigen-Bindungsstelle, das gut kristallisierbare „Fc-Fragment“ (Fragment crySTALLIZABLE), welches für die Klassifizierung der Immunglobuline verantwortlich ist.

Die beim Menschen auftretenden Immunglobuline werden wie bereits erwähnt in fünf Klassen eingeteilt, sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau in den schweren Ketten und in ihrer Funktion [9]:

IgG: Die Immunglobuline G, die sich in die Subklassen IgG1 bis IgG4 unterteilen, bilden 80% aller Immunglobuline und sind Antikörper der sekundären Immunantwort. Sie komplexieren Krankheitserreger durch Bindung an das Fab-Fragment und transportieren diese zu den sogenannten Killerzellen, an die sie Fc-spezifisch andocken und so eine Eliminierung des Erregers ermöglichen. Da sie als einzige Ig-Klasse durch die Plazenta transportiert werden können, stellen sie bereits im Mutterleib einen wichtigen immunologischen Schutz für den Embryo dar.

IgM: Die Immunglobuline der Klasse M sind Antikörper der primären Immunantwort, sie werden bei einer Erstinfektion schnell gebildet. Der IgM-Spiegel sinkt bei länger andauernder Infektion zugunsten von IgG ab. IgM liegt pentamer vor und ist deshalb in der Lage pro Immunglobulin-Einheit zehn Antigene zu binden.

IgA: Immunglobulin A dient der Abwehr von Infektionen, da es vermehrt in den menschlichen Schleimhäuten zu finden ist und dort eine Barriere gegen das Eindringen von Krankheitserregern darstellt.

IgD: Immunglobulin D ist nur in geringen Mengen im Plasma nachweisbar, weshalb seine Funktion auch noch nicht vollständig geklärt ist. Da es an der Oberfläche der B-Zellen gebunden ist, wird vermutet, dass es bei deren Entwicklung eine Rolle spielt.

IgE: Immunglobulin E stellt mit 0,001% den geringsten Anteil der Immunglobuline dar und spielt eine Rolle bei der Abwehr von Parasiten, vor allem jedoch bei allergischen Reaktionen. IgE wurde als letztes Immunglobulin bei der Untersuchung allergischer Reaktionen entdeckt und zunächst nicht den Immunglobulinen zugeordnet, sondern bekam den Namen „Reagin“. Es wird im Lymphgewebe abgesondert und ist vor allem in Haut und Schleimhaut zu finden.

Findet dort der Kontakt mit einem Allergen statt, so bewirkt IgE die Ausschüttung von Histamin, so dass eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (vgl. Kapitel 2.1.5).

2.1.5 Entstehung einer allergischen Reaktion

Allergische Erkrankungen lassen sich nach Coombs und Gell [18] in vier verschiedene Reaktionstypen einteilen.

Die am häufigsten auftretende und daher bekannteste Form ist die ***Soforttyp-Reaktion (Typ I)***, welche zu Nies- und Juckreiz, Schleimhautschwellung und Augenrötung führt. Sie tritt beispielsweise bei Nahrungsmittelallergien, Heuschnupfen und Hausstaubmilbenallergie auf. Die Entstehung einer allergischen Reaktion diesen Typs setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Zunächst erfolgt eine *Sensibilisierung*, die anfangs den selben Verlauf nimmt wie die nicht allergische humorale Immunantwort: Das Allergen wird von Makrophagen aufgenommen, zerlegt und mittels Haupt-Histokompatibilitätskomplex an die Oberfläche transportiert und den T-Zellen präsentiert. Nach der Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen kommt es durch die T-Helferzellen zu einer Ausschüttung von Mediatoren, die die B-Zellen zur Reifung als Plasmazelle stimulieren, welche Antikörper produziert. Im Falle einer allergischen Reaktion senden die T-Helferzellen große Mengen an Botenstoffen aus, die die Bildung von IgE in den Plasmazellen initiieren, während die Ausschüttung der hemmenden Mediatoren unterdrückt wird. Durch eine Fehlfunktion der T-Helferzellen wird also eine erhöhte IgE-Produktion angeregt, die über Monate anhält. Die gebildeten Immunglobuline heften sich an die Rezeptoren von zwei verschiedenen Zelltypen: den Mastzellen, die sich bevorzugt im Körpergewebe aufhalten und den basophilen Granulozyten, die im Blutstrom zirkulieren. Sind die Immunsystemzellen mit IgE überhäuft, so ist die Sensibilisierung vollzogen.

Bei einem weiteren Kontakt mit dem Allergen, der auch Jahre später stattfinden kann, wird dieses an die spezifischen IgE-Bindungsstellen an der Oberfläche der Mastzelle gebunden und überbrückt dabei zwei benachbarte IgE-Moleküle. Dies bewirkt eine Enzymaktivierung, die zu einer Reihe von Zellreaktionen und schließlich zur Ausschüttung von Mediatoren aus den Mastzellen führt. Die Freisetzung dieser Mediatoren löst die typischen allergischen Reaktionen aus. Histamin, Prostaglandin und Leukotriene sind beispielsweise für die Erweiterung der Blutgefäße, verstärkte Schleimbildung in den Atemwegen und für die

Verengung der Bronchien zuständig und sorgen dadurch für Atemnot, Nies- und Juckreiz sowie Augenrötungen [19].

Bei der **Zytotoxischen Reaktion (Typ 2)** richten sich IgG- und IgM-Antikörper gegen zellgebundene Antigene. Dadurch werden die körpereigenen Zellen Ziel der Immunreaktion und werden in einer zytotoxischen Reaktion zerstört. Ein Beispiel für diese Art der allergischen Reaktion ist beispielsweise die Blutgruppenunverträglichkeit.

Für die **Immunkomplexreaktion (Typ3)** ist die Bildung von Immunkomplexen aus Allergenen und Antikörpern verantwortlich. Aus bisher nicht geklärten Ursachen kommt es zu einer Aggregation, an der im wesentlichen Immunglobuline der Klasse G beteiligt sind. Diese Komplexe zirkulieren im Blut und lösen eine unspezifische Immunabwehr aus, die zu einer Zerstörung der Komplexe aber auch des umliegenden Gewebes führt. Ein typischer Verlauf dieses Allergietyps ist die Ablagerung der Immunkomplexe im Gewebe, wo sie zu allergischen Entzündungsreaktionen führen. Die bekannteste Krankheitsform dieses Typs ist die Entzündung der Gelenke, die Arthritis.

Die **Spättypreaktion (Typ4)** wird ohne Beteiligung von Antikörpern von den T-Zellen bestimmt und wird deshalb auch zelluläre Immunreaktion genannt. T-Zellen erkennen an Zellrezeptoren gebundene Allergene und setzen Mediatoren frei, welche Makrophagen anlocken, gleichzeitig aber auch das umliegende Gewebe schädigen. Da die Symptome erst nach 12 bis 72 Stunden auftreten, spricht man von der Spätreaktion. Ein typisches Beispiel ist das Kontaktekzem oder die Abstoßung eines Transplantats.

2.2 Immunosensoren

Die zentrale Reaktion vieler biologischer Vorgänge ist die sogenannte „Schlüssel-Schloss“- oder „Induced Fit“-Reaktion, die auf der selektiven Erkennung zweier hochmolekularer Komponenten (Ligand und Rezeptor) beruht. Die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor basiert dabei auf nicht-kovalenten Bindungen zahlreicher funktioneller Gruppen, was zu einem stabilen dreidimensionalen Komplex, dem sogenannten Affinitätskomplex führt. Da die Ausbildung des Affinitätskomplexes ein Zusammenspiel vieler Einzelreaktionen unter Einbeziehung der räumlichen Struktur der Komponenten erfordert, weisen Reaktionen dieses Typs wie z.B. Antikörper-Antigen-Reaktion, DNA-Hybridisierung oder die Bildung eines Avidin-Biotin-Komplexes, eine hohe Spezifität auf. Diese wird in der Affinitätsanalytik genutzt, da es möglich ist, mit Hilfe des einen Bindungspartners den anderen nachzuweisen.

Aufgrund der Vielfältigkeit solcher Systeme kommt diese Form der Analytik bereits in den verschiedensten Bereichen (z.B. Lebensmittelkontrolle, medizinische Diagnostik, Schadstoffuntersuchungen) zum Einsatz [1].

Den speziellen Fall der Affinitätsanalytik, in dem sich die Affinität des Antikörpers zu einem bestimmten Antigen zunutze gemacht wird, bezeichnet man als Immunanalytik, die unterschiedlich aufgebauten Tests heißen allgemein Immunosensoren oder Immunoassays.

2.2.1 Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen

Die Bindung des Antikörpers erfolgt über antigene Determinanten, sogenannte Epitope aus 5-8 Aminosäuren und setzt eine sterische Komplementarität beider Komponenten voraus [20].

Räumlich betrachtet gibt es für die Ausbildung einer Antikörperbindungsstelle innerhalb des Antigen-Proteins zwei Möglichkeiten:

1. Die beteiligten 5-8 Aminosäuren sind alle kovalent aneinander gebunden und gehören einem Polypeptidstrang an. Dieser Fall wird als kontinuierliches oder lineares Epitop bezeichnet.
2. Die räumliche Form des Epitops und damit auch die beteiligten Aminosäuren werden durch die räumliche Faltung, also die Quartärstruktur des Proteins festgelegt. Es handelt sich dann um eine diskontinuierliche oder konformationelle Struktur des Epitops.

Durch den Einsatz kristallographischer Verfahren konnte gezeigt werden, dass alle betrachteten Proteinepitope konformationeller Struktur sind und die beteiligten Aminosäuren eines Epitops über die ganze Sequenzkette verteilt sind [21].

Weiterhin ist kristallographischen Untersuchungen zufolge die bei der Antigen-Antikörper-Bindung benötigte Oberfläche zum Erreichen eines stabilen Affinitätskomplexes 54-89 nm² groß [21]. Da ein sphärisches 20 kDa Protein eine Oberfläche von ca. 500-1000 nm² besitzt, beansprucht die Wechselwirkung mit einem Antikörper nur 5-10% der Oberfläche des Antigens, so dass je nach sterischer Beschaffenheit des Antikörpers 5-10 Antikörper pro Antigen binden können.

Die Spezifität bei der Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Affinitätskomplexes ist dadurch bedingt, dass die Gesamtheit zahlreicher nicht-kovalenter Bindungen, die in drei Dimensionen zwischen Antigen und der Fab-Region des Antikörpers geknüpft werden, die Bindungsenergie ausmacht [22].

Bei der affinen Wechselwirkung wird pro Antikörperbindung eine Bindungsenergie (ΔG^0) von etwa 20-90 kJ/mol frei, die sich aus der Summe aller vorkommenden nicht-kovalenten Bindungen zusammensetzt. Die Tabelle, welche die Bindungsenergien aller möglichen Bindungstypen wiedergibt, macht deutlich, dass nur durch Einbeziehung möglichst vieler nicht-kovalenter Wechselwirkungen ein stabiler Affinitätskomplex gebildet werden kann.

Bindungstyp	Bindungsenergien [kJ/mol]
Ionische Wechselwirkungen	12,5
Wasserstoff-Brückenbindungen	4
Van-der-Waals-Wechselwirkungen	0,4

Abbildung 3: Bindungsenergien nicht-kovalenter Bindungstypen [23]

Thermodynamisch betrachtet handelt es sich bei der Bildung des Affinitätskomplexes um eine Gleichgewichtsreaktion der folgenden allgemeinen Form:



Wobei in Gleichung (1) [A] die Antikörperkonzentration, [B] die Antigenkonzentration, [AB] die Konzentration an gebildetem Affinitätskomplex und k_{ass} und k_{diss} die kinetischen Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziations- und Dissoziationsreaktion repräsentieren. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz kann eine Gleichgewichtskonstante K_{aff} , die sogenannte Affinitätskonstante, formuliert werden, für die gilt:

$$K_{\text{aff}} = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} \quad (2)$$

Gemäß Gleichung (2) gibt die Größe von K_{aff} Auskunft über die Stabilität des Affinitätskomplexes. Kinetische Untersuchungen [24] haben ergeben, dass k_{ass} bei Affinitätsreaktionen Werte in der Größenordnung von 10^7 bis 10^8 l/mol annehmen und sich k_{diss} zwischen 10^{-5} (grosse Affinität) und 10^3 (geringe Affinität) l/mol bewegen, was einer Affinitätskonstanten von 10^4 bis 10^{13} l/mol entspricht [25, 26].

Mit $\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{aff}}$ ergibt sich der oben erwähnte Wert für ΔG^0 von -20 bis -90 kJ/mol.

2.2.2 Aufbau der Immunoassays

Die spezifische Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen kann zum Nachweis einer der beiden Substanzen über einen Immunoassay genutzt werden. Meist wird eine Komponente (Antikörper) an eine feste Phase gebunden, während der Analyt (Antigen) in Lösung vorliegt, weshalb man in diesem Fall auch von „heterogenen Immunoassays“ spricht. Zur Auslesung der Antigen-Antikörper-Reaktion sind direkte, markierungsfreie Verfahren bekannt, die jedoch einen großen apparativen Aufwand erfordern (Oberflächenplasmonenresonanz, Ellipsometrie, Schwingquarze). Häufiger erfolgt die Detektion deshalb indirekt über sogenannte Marker, die chemisch an einen der Reaktionspartner gebunden werden und eine empfindliche Auslesung mit relativ geringem Aufwand ermöglichen. Je nach Markierung wird zwischen Radioimmunoassay (RIA), Fluoreszenzimmunoassay (FIA) und Enzymimmunoassay (EIA) unterschieden. Aufgrund der schwierigen Handhabung des sehr sensitiven RIA (schneller Isotopenzerfall, Erzeugung radioaktiven Abfalls), sind FIA und vor allem EIA in den letzten Jahren immer populärer geworden.

2.2.2.1 Auslesetechnologien

Immunosensoren dienen dazu, biochemische Reaktionen in ein analytisch auswertbares Signal umzuwandeln. Sie bestehen aus einer biologisch aktiven Komponente, einem Transducer, der ein optisches, thermisches oder elektrisches Signal erzeugt [27, 28] und einer elektronischen Komponente, die für das Auslesen des Signals zuständig ist [29].

Während der biologische Aufbau der Immunosensoren meistens auf der Ausbildung eines Affinitätskomplexes des Analyten mit einem Rezeptor beruht, gibt es mehrere Möglichkeiten diese biochemische Reaktion in ein messbares Signal umzuwandeln.

Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über die gebräuchlichsten Auslesemethoden gegeben.

- *direkte Immunosensoren*

Direkte Immunosensoren kommen ohne chemische Modifizierung der biologischen Komponenten aus, die Beobachtung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung erfolgt in Realzeit. Zu dieser Gruppe gehören piezoelektrische Immunosensoren [30-32], bei denen massensensitive Schwingquarze als Transducer dienen, die über Frequenzänderung Auskunft über die Menge an gebundenem Analyten geben. Potentiometrische Immunosensoren werten

die durch die Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene Potentialverschiebung an einer Elektrodenoberfläche aus [33], mittels optischer Immunosensoren (Ellipsometrie, Oberflächenplasmonenresonanz [34, 35]) wird aus der Schichtdicken-Zunahme durch Ausbildung des Affinitätskomplexes auf die Menge an gebundenem Analyt geschlossen.

- *indirekte Immunosensoren*

Indirekte Immunosensoren benötigen zur Detektion eines messbaren Signals eine Markierung, d.h. chemische Modifizierung einer der Immunokomponenten. Beim Radioimmunoassay ist dieser Marker ein radioaktives Isotop, durch Messung des Isotopenzerfalls wird die Konzentration an gebundener markierter Substanz bestimmt. Häufiger wird jedoch ein optisches Signal erzeugt, beim Fluoreszenzimmunoassay beispielsweise trägt eine Immunokomponente einen Fluoreszenzmarker, die Intensität der Fluoreszenz führt zum Sensorsignal.

Enzymimmunoassays basieren auf der Existenz eines enzymmarkierten Reaktionspartners.

Als Enzyme kommen meist Peroxidase oder Phosphatase zum Einsatz, welche nach Zugabe eines geeigneten Substrats eine Spaltungsreaktion zu einem optisch oder elektrochemisch aktiven Molekül katalysieren. Die Auslesung des Sensorsignals erfolgt dann entweder photometrisch d.h. eine Farbreaktion wird detektiert oder amperometrisch. Amperometrische Immunosensoren messen den aus der Redoxreaktion des gespaltenen Substrats resultierenden Strom zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode. Dieser Strom ist proportional der Menge an enzymatischem Spaltungsprodukt und so auch proportional der Menge an enzymmarkiertem Detektionsantikörper (siehe Kapitel 4).

2.2.2.2 Kompetitives und nicht-kompetitives Design

Eine weitere Einteilung der Immunoassays erfolgt nach ihrem biologischen Design in nicht-kompetitive, kompetitive (Abbildung 4) und Verdrängungsimmunoassays (Abbildung 5).

- *Nicht-kompetitiver (Sandwich-)Immunoassay*

Beim Sandwich-Immunoassay wird ein Fängerantikörper an die feste Phase gebunden und dessen Reaktion mit dem in Lösung befindlichen Antigen (=Analyt) mit einem im Überschuss eingesetzten markierten Sekundärantikörper ausgelesen. Voraussetzung für diesen Aufbau ist eine ausreichende Größe des Antigens, da es über mindestens zwei Epitope verfügen muss (Abbildung 4(a)).

Das durch die enzymatische Substratspaltung gemessene Signal ist direkt proportional der Menge an gebundenem Antigen [36].

- *Kompetitiver Immunoassay*

Kompetitive Immunoassays werden bevorzugt eingesetzt, wenn das Antigen nicht über zwei bindungsfähige Teilstrukturen (Epitope) verfügt. In diesem Fall wird der Analyt mit einem enzymmarkierten Antigen versetzt. Unter kompetitiven Bedingungen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen enzymmarkiertem Antigen und in der Lösung vorhandenem unmarkiertem Antigen ein, welche beide an den Fängerantikörper binden (Abbildung 4(b)). Da die Menge an gebundenem Enzym umso größer ist, je weniger Analyt vorhanden war, ist das gemessene Signal in diesem Fall umgekehrt proportional zur Analytmenge [2, 37].

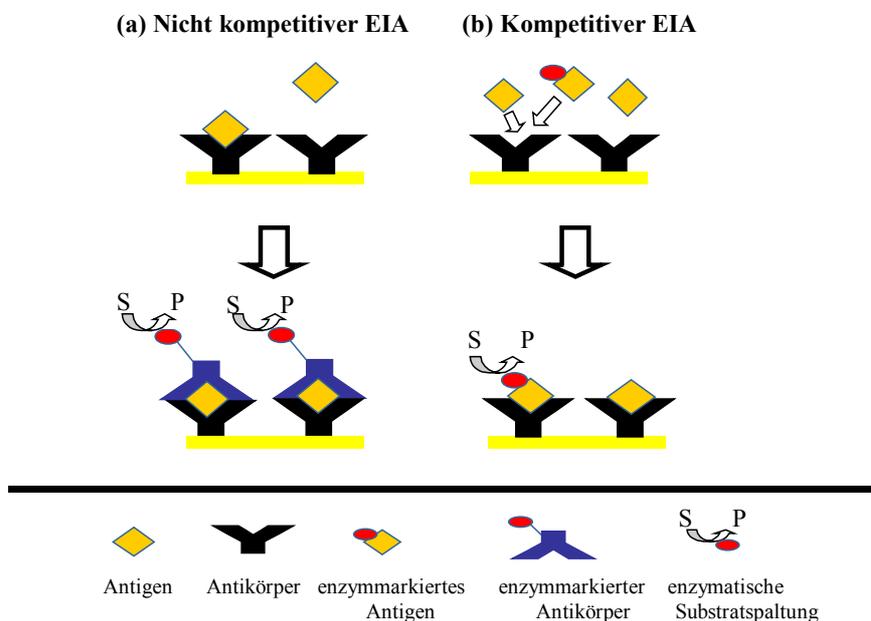


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines nicht-kompetitiven (Sandwich) und eines kompetitiven enzymmarkierten Immunoassays

- *Verdrängungsimmunoassay*

Die Funktion des Verdrängungsimmunoassays beruht auf der Verdrängung einer bereits gebundenen markierten Immunkomponente durch den zu bestimmenden Analyten. Da normalerweise die Dissoziationsrate eines Affinitätskomplexes geringer ist als die Assoziationsrate, wird eine gering affine Antigen-Antikörper-Bindung durch eine höher affine Wechselwirkung ersetzt. Durch Analyse der Abspaltungsprodukte kann direkt die Menge an vorhandenem Analyten bestimmt werden [38] (Abbildung 5).

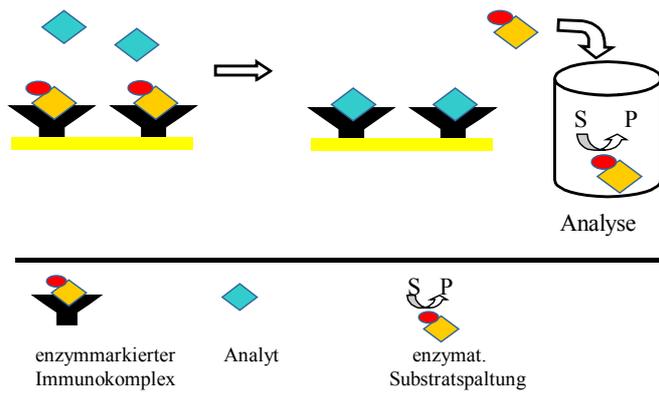


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Verdrängungsimmunoassays

2.3 Modifizierung von Goldoberflächen

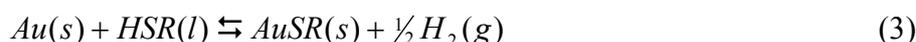
Zentrales Problem bei der Entwicklung jedes Immunosensors ist die Immobilisierung der biologischen Schicht auf der Sensoroberfläche. Je nach Material und Beschaffenheit der Oberfläche kommen dabei die unterschiedlichsten Methoden von der einfachen Physisorption über Langmuir-Blodgett-Filme bis zu selbstorganisierten Monolagen zum Einsatz [39]. Wichtig ist dabei, eine möglichst vollständige Belegung der Oberfläche zu gewährleisten, um erstens viele organische Bindungsstellen zu gewinnen und zweitens die ungewollte, unspezifische Adsorption von Molekülen an der Grenzfläche zu unterdrücken.

Da der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Biosensor auf der biologischen Modifizierung von Goldelektroden basiert, soll an dieser Stelle die Funktionalisierung von Goldoberflächen näher betrachtet werden [40].

2.3.1 Selbstorganisierte Monolagen auf Goldelektroden

Die Bildung geordneter orientierter monomolekularer Schichten an einer Grenzfläche durch spontane Adsorption aus verdünnter Lösung wird Self-assembly Verfahren genannt, die entstehenden Schichten werden als *Self-assembly Monolayer (SAM)* oder *selbstorganisierte Monolagen* bezeichnet. Zur Beschichtung von Goldelektroden bietet sich dabei die Ausnutzung der starken Gold-Schwefel-Wechselwirkung an, um mittels terminal funktionalisierter Thiole eine reaktive Oberfläche zu schaffen. Dabei entstehen hochgeordnete monomolekulare Filme, die eine vielfältige organische Kopplungschemie und so auch die Immobilisierung der unterschiedlichsten Biomoleküle ermöglichen [41].

Die Ausbildung der Gold-Thiol-Bindung erfolgt dabei nach folgender formalen Gleichung:



Wobei Au(s) für die feste Goldoberfläche steht, HSR(l) für Thiol in Lösung und AuSR(s) für Thiol, gebunden an die Goldoberfläche.

Es handelt sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion mit der Gleichgewichtskonstanten

$$K = \frac{[AuSR(s)] p_{H_2}^{1/2}}{[RSH(l)][Au(s)]} \quad (4)$$

wobei das Gleichgewicht auf der Seite der Produkte liegt, da H₂ als gasförmiges Produkt dem Gleichgewicht entzogen wird.

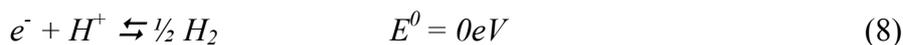
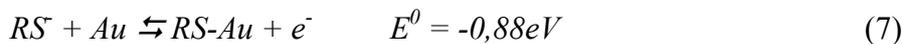
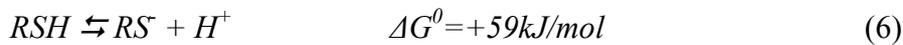
Um die Größenordnung der Gleichgewichtskonstanten abzuschätzen, bietet sich die Berechnung von ΔG^0_{ads} an, da sich über $\Delta G^0_{\text{ads}} = -RT \ln K$ die Gleichgewichtskonstante K ergibt. Hierfür gibt es unterschiedliche Ansätze:

a) Bindungsenergien:

$$\Delta G^0_{\text{ads}} = \Delta G^0_{\text{bind}}(\text{Au-SR}) + \Delta G^0_{\text{bind}}(\text{H}_2) - \Delta G^0_{\text{bind}}(\text{AuSH}) \quad (5)$$

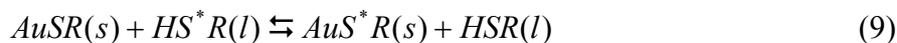
Unter Berücksichtigung der Bindungsenergien von RS-H (364kJ/mol), Au-SR (167kJ/mol) und H₂ (434kJ/mol) ergibt sich für die Adsorption $\Delta G^0_{\text{ads}} = -20\text{kJ/mol}$, die Reaktion läuft also spontan ab [42, 43] und die Gleichgewichtskonstante liegt bei etwa $1,1 \cdot 10^4$.

b) Elektronenübergänge:



Eine andere Möglichkeit ist die Betrachtung der Elektronenübergänge. Ausgehend von RSH, welches mit einer Dissoziationsenergie von $\Delta G^0 = +59\text{kJ/mol}$ in RS^- und H^+ dissoziiert, erhält man für die Redoxreaktion an der Goldoberfläche $\Delta E^0_{\text{cell}} = 0,88\text{eV}$. Mit $\Delta G^0 = -zF \Delta E^0_{\text{cell}}$ ergibt sich eine freie Reaktionsenthalpie von $\Delta G^0 = -84\text{kJ/mol}$ für die Elektronenübergänge und für die Gesamtreaktion $\Delta G^0_{\text{ads}} = -25\text{kJ/mol}$ [44]. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der über die Bindungsenergien berechneten Reaktionsenthalpie überein.

Anhand von isotope markierten Thiolen konnte zudem festgestellt werden, dass ein Austausch zwischen gebundenen Thiolen und Thiolen in Lösung stattfindet [45]:



Die Stabilität der selbstorganisierten Monolagen ist durch ein Gleichgewicht intermolekularer Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte gewährleistet, weshalb die stabilste Konformation der Thiole diejenige ist, in der die Ketten in ausgestreckter Form vorliegen. Da die Adsorption der Thiole meist aus verdünnter wässriger Lösung erfolgt, wo die thermodynamisch stabile Konformation ein statistisches hydratisiertes Knäuel darstellt, ist die Ausrichtung der Kohlenwasserstoffketten an der Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Ausbildung der Monolage, die Adsorption des Schwefels an die Goldoberfläche erfolgt spontan [46]. Die zwischenmolekularen Kräfte sind

umso größer, je langkettiger die Thiole sind, was erklärt, dass langkettige aliphatische Thiole die stabilsten Monolagen ausbilden [47].

Die Bindung des Schwefels an die Goldoberfläche ist nicht kovalenter Art, viel mehr bildet sich eine Überstruktur aus Schwefelatomen mit einem Gitterabstand von 0,4995 nm (vgl. Gold 0,2885 nm), in der jedes Schwefelatom koordinativ an drei Goldatome gebunden ist [48]. Der Schwefel liegt sp^3 -hybridisiert vor, was auch die Abweichung der Thiolketten von der Oberflächennormalen um 30° erklärt [47] (Abbildung 6).

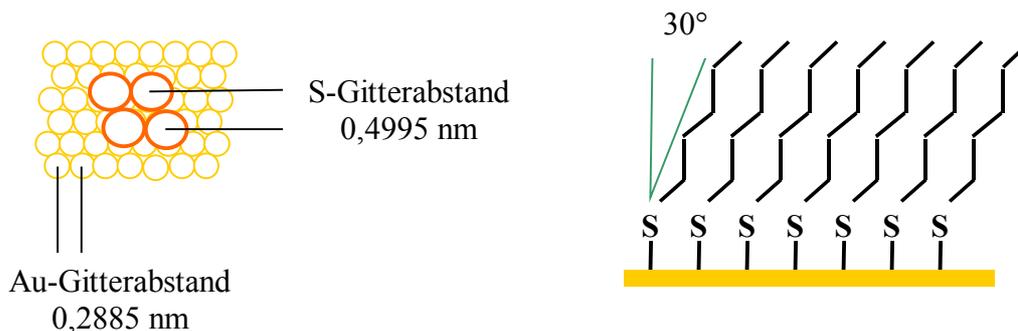


Abbildung 6: Orientierung der selbstorganisierten Thiolmonolagen.

2.3.2 Kopplungschemie an Oberflächen

Im Rahmen der kombinatorischen Chemie ist die Festphasenchemie in den letzten Jahren immer populärer geworden und die Zahl der an der Oberfläche synthetisierbaren Verbindungen stark angewachsen. Ein Beispiel ist die Peptid-Festphasensynthese nach Merrifield [49], bei der die einfache Aufarbeitung der Reaktionsprodukte an der Festphase zur Synthese von Proteinen genutzt wird. Zunächst wird ein Substrat mit einem bifunktionellen Molekül, dem sogenannten Linker, an ein Trägermaterial, meist ein funktionalisiertes Polymer, gebunden. An der entstandenen funktionalisierten Oberfläche erfolgt mittels geeigneter Kopplungsreagenzien und Schutzgruppen der Aufbau des gewünschten Polypeptids. Langwierige Aufarbeitungsschritte zwischen den einzelnen Reaktionsschritten werden durch Spülen des Trägermaterials ersetzt, erst nach Abspaltung des Reaktionsproduktes vom Träger ist eine chromatographische Aufreinigung notwendig. Weiterhin ist es vorteilhaft, dass Nebenreaktionen wie Quervernetzung erschwert sind und folglich die Ausbeute gegenüber der klassischen Lösungsschemie erhöht werden kann. Nachteile der Festphasensynthese sind, dass nicht alle Reaktionen auf die feste Phase übertragen werden können. Heterogene Katalysatoren können beispielsweise nicht eingesetzt

werden und da die Bindung des Substrats an das Trägermaterial reversibel und unter milden Bedingungen spaltbar sein sollte, können auch nur sehr milde Reaktionsbedingungen angewendet werden.

Durch den Einsatz terminal funktionalisierter Thiole als Linker ist es möglich, das Prinzip der Festphasensynthese auf Goldoberflächen zu übertragen und mit Hilfe der geeigneten organischen Kopplungsmethoden molekular definierte stabile Oberflächen zu schaffen. Für die Fc-spezifische Immobilisierung eines Antikörpers bieten sich dabei Thiole mit terminaler Aminfunktion an, die den Antikörper über eine Peptidkopplung kovalent binden. Dabei erfolgt die Aktivierung der Carboxylfunktion des Antikörpers mit dem Kopplungsreagenz *N*-Ethyl-*N'*(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) unter Bildung eines *O*-Acylureids [50]. Um die Umlagerung in unreaktive *N*-Acylureide zu verhindern, wird *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) zugegeben [51], welches zur Ausbildung eines sogenannten Aktivesters unter Abspaltung eines Harnstoffderivats führt. Unter Rückbildung des HOBT bzw. NHS kommt es zur Knüpfung der Peptidbindung zwischen der immobilisierten Aminfunktion und der aktivierten Carboxylfunktion (Abbildung 7).

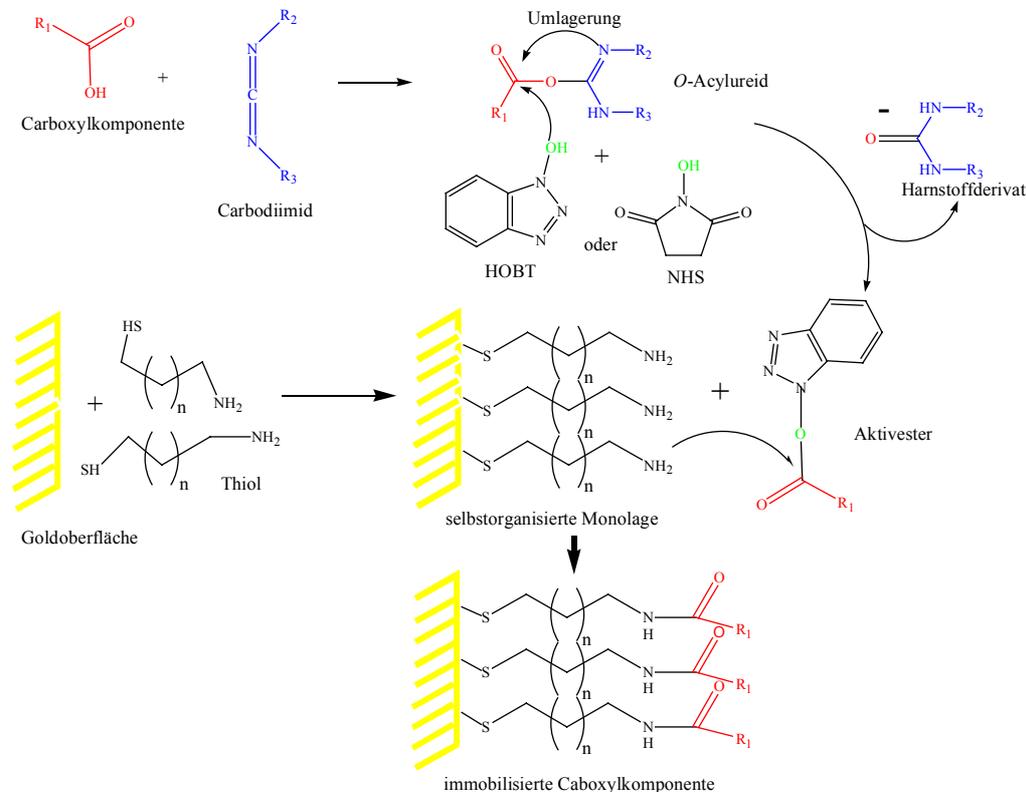


Abbildung 7: Knüpfung einer Peptidbindung mittels EDC und HOBT/NHS an einer Goldoberfläche mit immobilisierter Aminkomponente

Neben der Carbodiimidmethode kommen auch andere Kopplungsreagenzien wie z.B. Phosphonium-, Uroniumreagenzien oder 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) für die Immobilisierung in Frage. Alle Methoden beruhen auf der Aktivierung der Carbonsäure durch Ausbildung eines Aktivesters oder eines gemischten Anhydrides [52].

2.3.3 Immobilisierung mittels Avidin-Biotin

Avidin ist ein im Eiklar des Hühnereis natürlich vorkommendes tetrameres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa, welches einen stabilen Affinitätskomplex (Bindungskonstante $K = 10^{15}$ l/mol) mit vier Äquivalenten Biotin ausbildet. Abbildung 8 zeigt die vier Untereinheiten des Avidins, die jeweils ein Biotinmolekül binden und macht die Größenunterschiede zwischen beiden Bindungspartnern deutlich:

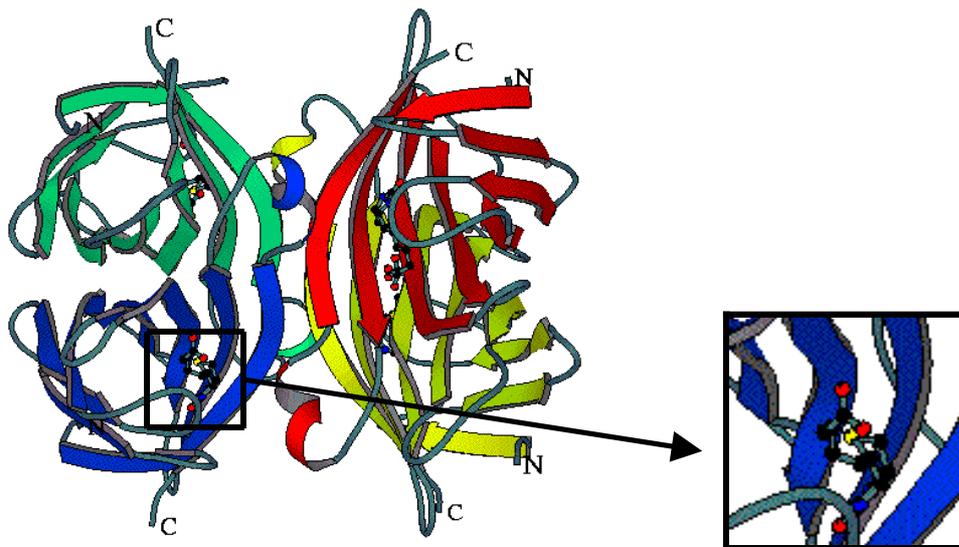


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Avidin mit vier gebundenen Biotin-Molekülen, Ausschnittsvergrößerung einer Bindungsstelle [53]

Da Biotin aufgrund seiner Valeriansäure-Seitenkette leicht an Proteine gebunden werden kann [54], ohne dass die Bindungseigenschaften von Biotin an Avidin wesentlich beeinflusst werden [55], ist dieses System zur Immobilisierung von Proteinen weit verbreitet. Das Avidin-Biotin-System fungiert dabei als eine Art „Bindungsvermittler“ für zwei Komponenten, die spontan nicht miteinander reagieren, jedoch leicht an Biotin oder Avidin gebunden werden können. Unter milden Reaktionsbedingungen können so stabile, definierte Systeme geschaffen werden.

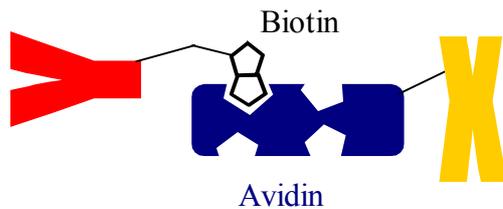


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Biotin-Avidin-Bindung

Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau einer Biotin-Avidin-vermittelten Bindung zwischen einer Komponente X und einer Komponente Y. Typischerweise stellt die Komponente Y ein Protein dar, welches mittels Peptidbindung an Biotin gekoppelt werden kann, X kann beispielsweise ein Enzym darstellen, was zur Detektion des Proteins Y verwendet wird, oder eine Oberfläche, an die das Protein gebunden werden soll.

Die Vielfältigkeit des Systems beinhaltet auch die im Rahmen dieser Arbeit interessante Immobilisierung eines Immunglobulins auf einer Goldoberfläche. Wie fast alle natürlich vorkommenden Proteine verfügt Avidin über Cystein- d.h. thiolhaltige Bausteine, die zu einer spontanen Adsorption an die Goldoberfläche führen. Über Aminfunktionen in den Proteinseitenketten der Immunglobuline wird mittels Peptidbindung Biotin an den Antikörper gebunden, ohne die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung oder der Avidin-Biotin-Bindung zu beeinträchtigen.

2.3.4 Immobilisierung mittels Protein A, G, G' oder L

Die Proteine A, G, G' und L sind natürlich in der Zellwand von Bakterien vorkommende Proteine, die mit Antikörpern spezifische affine Wechselwirkungen eingehen, ohne deren Antigenbindungsvermögen zu beeinträchtigen und sind deshalb in der Immunchemie besonders in der Affinitätschromatographie weit verbreitet [56].

Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus* und weist eine spezifische Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der Klasse IgG auf. Dabei sind die Bindungseigenschaften abhängig von der Herkunft (Spezies) und Unterklasse des Antikörpers, so bindet Protein A beispielsweise IgG1 des Menschen sehr gut, IgG1 der Maus jedoch kaum, dafür IgG2a der Maus wiederum gut. Die affine Bindung zwischen Protein A und IgG ist im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich stabil und kann durch pH-

Verschiebung in den stark sauren und stark basischen Bereich reversibel gespalten werden [57-60].

Die Proteine G und G' werden aus der Zellwand einer *Streptococcus* Spezies gewonnen und verfügen über ähnliche Eigenschaften wie Protein A, d.h. beide bilden wie Protein A einen Affinitätskomplex mit der Fc-Region der Immunglobuline aus, sie binden jedoch an andere IgG-Unterklassen und andere Spezies als Protein A [61-64]. Der Unterschied zwischen Protein G und Protein G' ist, dass es sich bei Protein G' um eine gentechnisch weiterentwickelte Form des Protein G handelt, welche die Bindungseigenschaften für IgG beibehält, jedoch bei Protein G vorhandene Affinitäten für Albumine und andere Proteine nicht mehr aufweist [65].

Protein L, aus dem *Peptostreptococcus magnus* Bakterium, bindet im Gegensatz zu den Proteinen A, G und G' nicht Fc-spezifisch an die Immunglobuline sondern Fab-spezifisch und das unabhängig von Herkunft und Art des Immunglobulins. Anders als die Fc-spezifisch bindenden Proteine A, G und G', die nur eine Affinität zu den verschiedenen Subklassen des IgG aufweisen, kann Protein L auch IgA, IgD, IgE und IgM komplexieren [66].

Ebenso wie Avidin adsorbieren die Proteine A, G, G' und L mit Hilfe der in den Proteinseitenketten vorhandenen Thiolgruppen aus verdünnter Lösung unter Ausbildung einer koordinativen Bindung des Schwefels an die Goldoberfläche. Im Fall von Protein A wurde die Assoziationskonstante der Wechselwirkung zu $1,5 \cdot 10^8$ l/mol bestimmt [67][68, 69] und entspricht damit einer starken nicht-kovalenten Bindung.

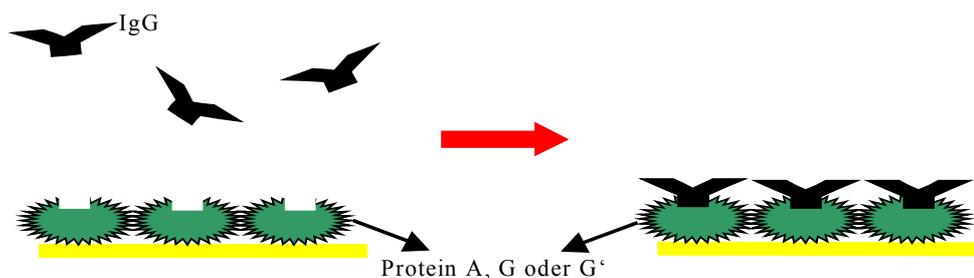


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fc-spezifischen Immobilisierung mittels Protein A, G oder G'

In Abbildung 10 ist eine schematische Darstellung der Fc-spezifischen Antikörper-Immobilisierung mittels Protein A, G oder G' zu erkennen. Wie bereits erwähnt ist die Wahl des geeigneten Proteins von der antikörperproduzierenden Spezies, sowie von der Unterklasse des Antikörpers abhängig, da die Proteine unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Subklassen aufweisen. Soll das Immunglobulin Fab-spezifisch immobilisiert werden, so kann

ohne Berücksichtigung von Spezies, Klasse oder Subklasse des Antikörpers Protein L verwendet werden.

3. Aufbau des Messsystems mit dem Multipotentiostaten CIPO

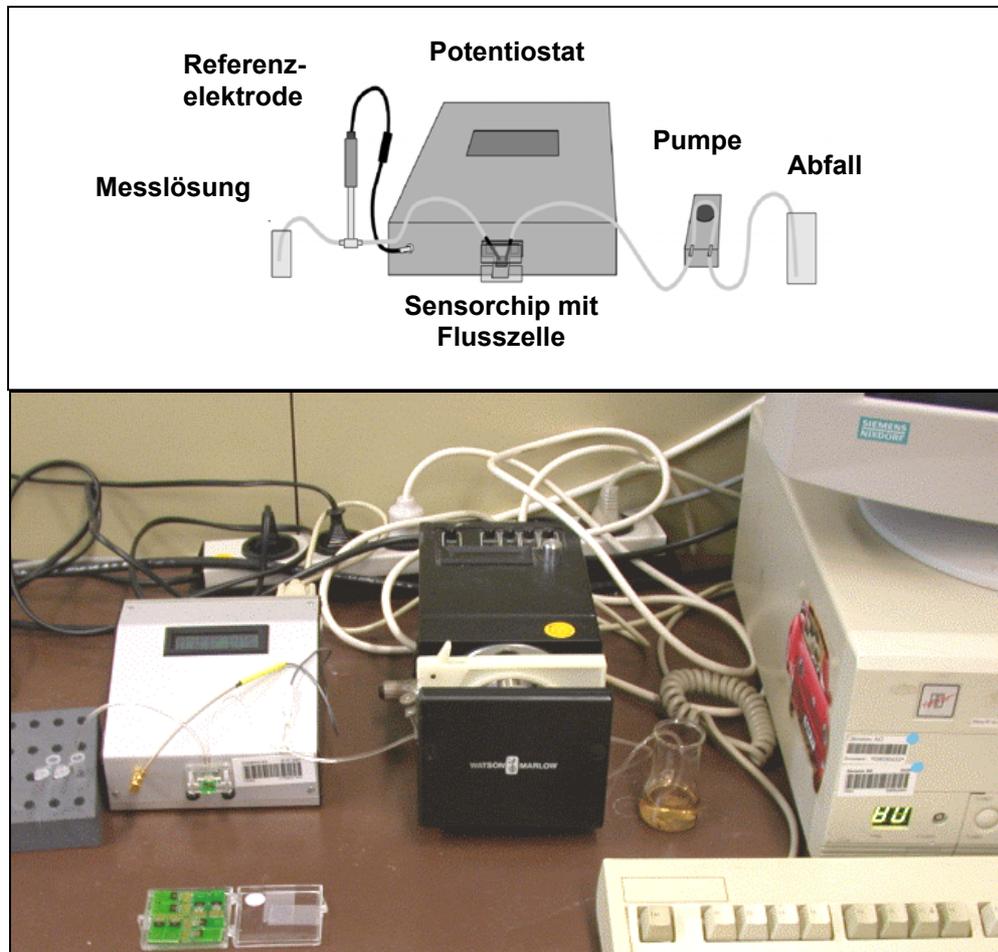


Abbildung 11: Messaufbau zur Auslesung der Sensorchips. Von links nach rechts sind zunächst die Vorratsgefäße zu erkennen, dann der Potentiostat mit Flusszelle und Sensorchip, die externe Referenzelektrode, die Peristaltikpumpe, das Sammelgefäß und der Rechner zur Datenverarbeitung.

Der in Abbildung 11 gezeigte Messaufbau enthält als zentrales Element den rechnergesteuerten Potentiostaten zur Auslesung des Sensorsignals, der mit dem selektiv beschichteten Immunochip über eine 14 PIN Schnittstelle kontaktiert wird. Der Chip wird von einer Durchflußzelle umschlossen, die über Silikonschläuche einerseits mit der Probenkammer und der externen Referenzelektrode verbunden ist, andererseits mit der Pumpe und einem Sammelgefäß.

3.1 Multipotentiostat Modell CIPO

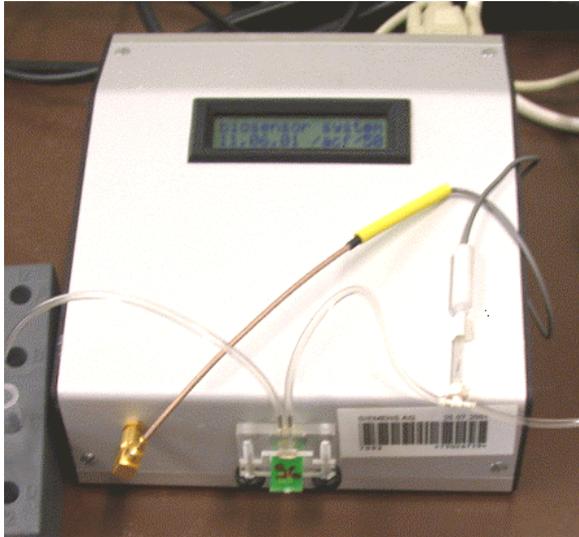


Abbildung 12: 8-Kanal-Multipotentiostat Modell CIPO der Firma eBiochip Systems GmbH

Bei dem von der Firma eBiochip Systems GmbH bezogenen Multipotentiostat Modell CIPO (Abbildung 12) handelt es sich um einen Mikroprozessor-gesteuerten Potentiostaten mit unabhängigen Messkanälen, welcher am Fraunhofer Institut ISIT in Itzehoe zur amperometrischen Auslesung von Ultramikroelektroden-Arrays auf der Basis von Si-Technologie entwickelt wurde [7, 70]. Die 8 unabhängigen Kanäle plus Gegenelektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode können mit der mitgelieferten Software („MCDDE“) unter Windows 3.1-98 selektiv angesteuert werden und so maximal 4 Positionen eines Siliziumchips bestehend aus je einem Kathoden/Anoden-Paar parallel ausgelesen werden. Die Einstellung der angelegten Spannung erfolgt bis auf $\pm 1\text{mV}$ genau, der Messbereich liegt zwischen -100 und 100 nA mit einer Auflösung von $2,5\text{ pA}$. Die Auslesefrequenz für die Aufnahme von Messwerten beträgt 2 Hz . Der Transfer der ausgelesenen Daten in Origin Microcal Version 4.1 welches den Verlauf der Messung graphisch wiedergibt, ermöglicht die direkte Beobachtung der gemessenen Ströme.

3.2 Immuno-chips

Die in Abbildung 13 gezeigten Sensoren des Fraunhofer Instituts für Siliziumtechnologie bestehen aus Submikrometer-Elektrodenarrays aus Gold, die auf einen Siliziumchip aufgedampft sind, welcher an eine Leiterkarte gebondet ist und über diese mit dem Potentiostaten kontaktiert wird [7].

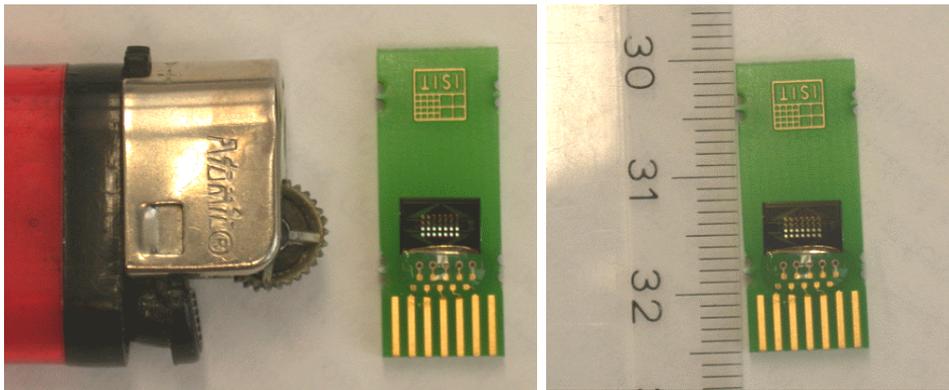


Abbildung 13: Verwendeter Sensorchip im Größenvergleich

Die 4,5mm*6mm großen Siliziumchips tragen je nach Layout zwischen 12 und 28 kreisförmige Gebiete mit Interdigitalstrukturen eines Durchmessers von 200 μm oder 400 μm , deren kammartige Elektrodenfinger eine Breite von 1 μm und einen Abstand von 0,8 μm aufweisen, sowie eine Gegenelektrode aus Gold. Die Referenzelektrode befindet sich nicht auf dem Chip, sie ist in das Flusssystem integriert. Da der zur Auslesung verwendete Multipotentiostat, wie in Kapitel 3.1 beschrieben 8 unabhängige Kanäle besitzt, können 4 Positionen eines solchen Chips parallel ausgelesen werden. Zur Gewährleistung der selektiven Beschichtung der einzelnen Strukturen ist jede Position von mehreren SU8-Polymerringen umgeben, die das Überlaufen von Tropfen auf die Nachbarposition verhindern sollen (Abbildung 14).

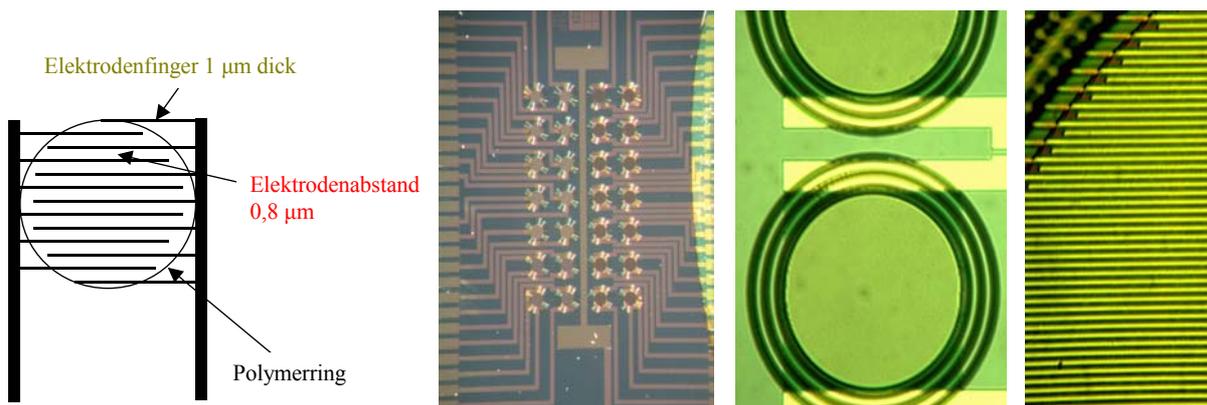


Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer Interdigitalstruktur und Siliziumchip mit Gold-Interdigitalstrukturen in von links nach rechts zunehmender Vergrößerung

3.3 Fluidik

Da die Auslesung des Immuno-chips zum einen unter physiologischen Bedingungen, d.h. in einer gepufferten Salzlösung erfolgen soll, um die Aktivität von Enzym und Antikörper zu gewährleisten, zum anderen die freie Diffusion zwischen den Elektroden möglich sein muss, ist der Aufbau eines entsprechenden Fluidiksystems notwendig. Dieses besteht aus einer Durchflusszelle mit einem Durchflussvolumen von 15 μl , welche den Chip umschließt, sowie Zu- und Ablaufkanülen zum Flüssigkeitsaustausch. Die zur Messung benötigte Flüssigkeit wird über Silikonschläuche (Innendurchmesser 0,8 mm, Randdicke 0,8 mm) mittels einer Peristaltikpumpe durch die Messkammer gepumpt. Das Fördervolumen der Pumpe bei den verwendeten Schläuchen liegt bei 0,1-0,8 ml/min bei 10 bis 90 Umdrehungen pro Minute (gemessen mit Wasser) (Abbildung 15).

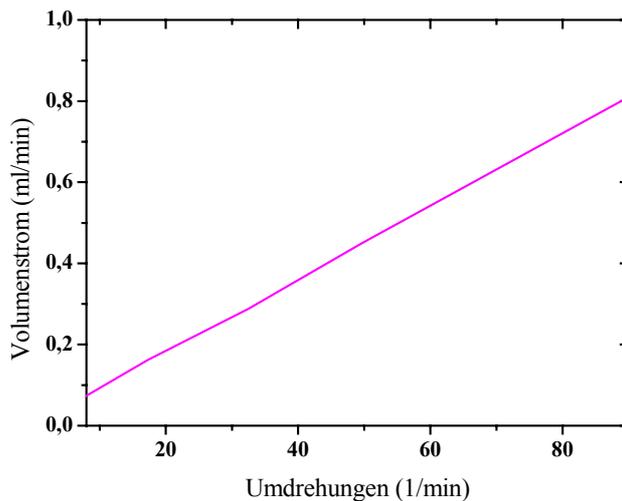


Abbildung 15: Volumenstrom der Peristaltikpumpe in Abhängigkeit von der Drehzahl (LM: Wasser, Schlauchinnendurchmesser 0,8 mm)

3.4 Beschichtung



Abbildung 16: Versuchsaufbau zur selektiven Beschichtung der Sensorchips, bestehend aus Mikroskop, Mikromanipulator und Spritze.

Die selektive Beschichtung der 200 bzw. 400 μm großen Interdigitalstrukturen mit Thiolen und Proteinen erfolgt mit Diabetikerspritzen der Firma Braun, deren Kanülenaußendurchmesser 330 μm beträgt und die mit Hilfe eines Mikromanipulators mikrometergenau manövriert werden können. Der Mikromanipulator DC-3K der Firma Märzhäuser Wetzlar ist in allen drei Achsen manuell und motorisch verstellbar, wobei die motorische Ansteuerung mit dem joystickähnlichen Steuergerät STM3 den Vorteil hat, schwingungs- und vibrationsfreies Positionieren bis in den Submikrometerbereich zu ermöglichen. Die Spritze wird an dem Schwenkarm des Manipulators mit einer Klemme befestigt.

Der Sensor wird zur Beschichtung unter einem Mikroskop mit einer 100fachen Vergrößerung auf einem dreidimensional beweglichen Mikroskoptisch platziert und mit einer 150W Kaltlichtquelle ausgeleuchtet. Mit Hilfe des Mikromanipulators wird ein Tropfen an der Spitze der Kanüle an die gewünschte Position des Sensors gebracht (Abbildung 16).

Das Tropfenvolumen liegt bei 200 μm Strukturen bei etwa 1-2 nl (Näherungsweise ein Kontaktwinkel von 90° , d.h. ein halbkugelförmiger Tropfen mit 100 μm Radius angenommen) und bei 400 μm Strukturen bei etwa 12 nl.

4. Untersuchungen und Ergebnisse

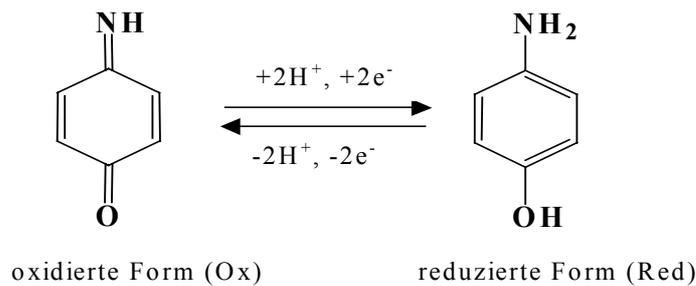
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein amperometrischer Immunoassay auf Basis eines Messsystems mit Technologie des Fraunhofer-Instituts (ISIT) Itzehoe entwickelt.

Nachfolgend werden die einzelnen Schritte von der Untersuchung des amperometrischen Ausleseschritts über die Entwicklung eines biologischen Testdesigns mit verschiedenen Immobilisierungs- und Blockvarianten bis hin zur Übertragung der Ergebnisse auf ein System mit praktischer Relevanz, der Entwicklung eines *in vitro* Allergietests, beschrieben.

4.1 Amperometrische Auslesemethode - Redoxrecycling

Amperometrische Immunosensoren basieren auf einem elektrochemischen Transducer, der bei Existenz eines elektrochemisch aktiven Substrats wie Kaliumhexacyanoferrat oder p-Aminophenol ein messbares Stromsignal erzeugt [27]. Durch Anlegen definierter Potentiale an den Arbeitselektroden des Transducers wird eine Redoxreaktion, das sogenannte Redoxrecycling des Substrats initiiert und der aus den Elektronenübergängen resultierende Strom zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode gemessen.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten amperometrischen Immunosensor basieren alle durchgeführten Messungen auf der Existenz des redoxrecyclingfähigen Moleküls p-Aminophenol (p-AP). Dieses unterliegt in Abhängigkeit von der angelegten Spannung an den Anodenfingern der als Transducer dienenden Interdigitalstrukturen zunächst einer Oxidation. Unter Auflösung des aromatischen Systems bildet sich p-Iminochinon, welches zu den Kathodenfingern diffundiert, an denen es wieder reduziert wird und durch die Elektronenübergänge an den Elektrodenoberflächen einen messbaren Strom im nA-Bereich erzeugt (Abbildung 17).



Elektrodenvorgänge:

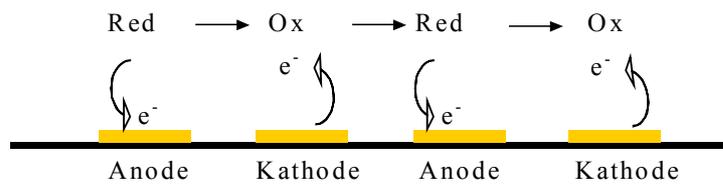


Abbildung 17: Elektronenübergänge beim Redoxrecycling von p-Aminophenol

In Abbildung 17 sind p-Aminophenol (reduzierte Form) und p-Iminoquinon (oxidierte Form), sowie die Vorgänge an den Elektrodenfingern der Interdigitalstrukturen veranschaulicht.

Abbildung 18 zeigt eine typische Messkurve der Kathoden- und Anodenströme bei der Messung des Redoxrecycling von p-Aminophenol im Fluss mit einer unbeschichteten Interdigitalstruktur und dem Mikropotentiostaten CIPO. Wird die Flusszelle mit NaCl-Lösung gespült, so liegen die Signale beider Elektroden bei etwa 0 nA, sofort nach der Zugabe von p-AP steigen sie auf einen konstanten Strombetrag an und bei erneutem Spülen mit NaCl fallen sie wieder auf 0 nA zurück. Zur Auswertung des Sensorsignals werden die Beträge der Kathoden- und Anodenströme addiert.

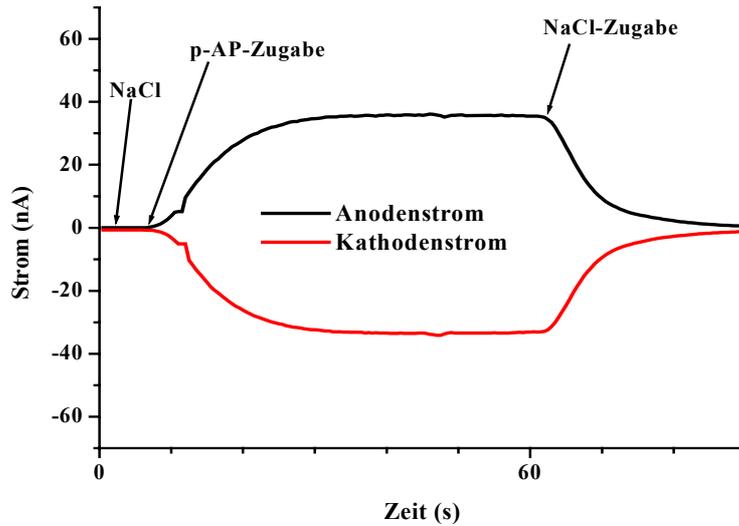


Abbildung 18: Typische Messkurve bei der Messung des Redoxrecycling von p-Aminophenol im Fluss mit dem Mikropotentiostaten CIPO

Da die Intensität des Stromsignals neben anderen Faktoren von der Konzentration an in der Lösung bzw. an den Elektroden vorhandenem p-AP abhängig ist, wird die Proportionalität des Stromsignals zur Konzentration an p-AP als empfindliche, selektive Nachweisreaktion für Antikörperreaktionen genutzt:

Ein sogenannter Detektionsantikörper trägt ein Alkalische Phosphatase Enzym [71], welches aus p-Aminophenylphosphat (p-APP) p-Aminophenol (p-AP) freisetzt [72, 73], was wiederum während der Messung durch Redoxrecycling an den Elektrodenfingern das Sensorsignal erzeugt (Abbildung 19).

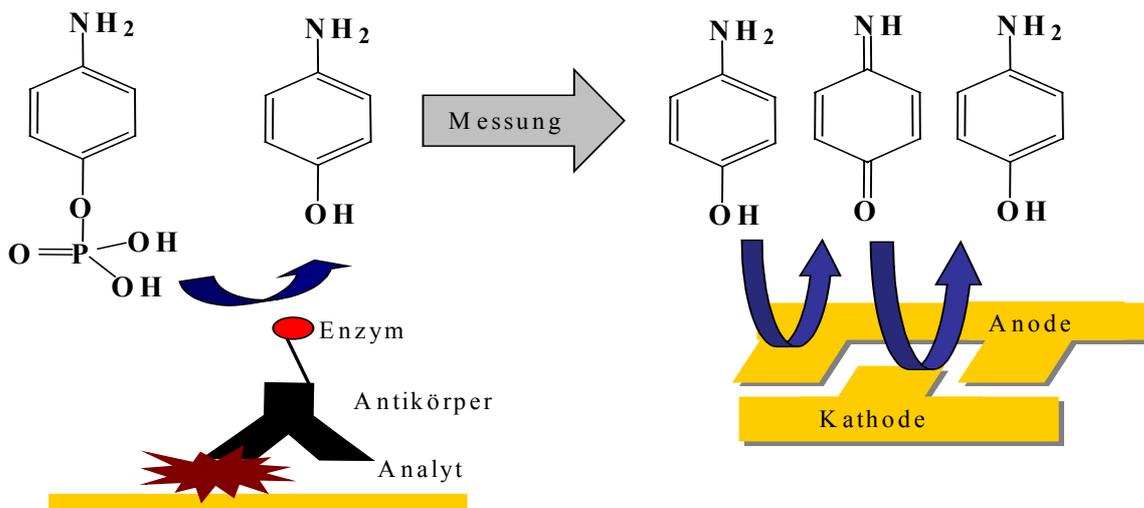


Abbildung 19: Auslesereaktion des Immunoassays auf einer Interdigitalstruktur mit Alkalischer Phosphatase als Markierungsenzym und p-Aminophenylphosphat als Substrat.

Bindet der Detektionsantikörper quantitativ an den nachzuweisenden Analyten, so gibt der nach Zugabe von p-APP gemessene Strom Auskunft über die Menge an vorhandenem Analyt. Die typische Form einer Messkurve mit zwei beschichteten Interdigitalstrukturen ist in Abbildung 20 dargestellt, die die Summensignale einer Positivprobe mit Detektionsantikörper im Vergleich zu einer Negativprobe ohne Detektionsantikörper zeigt.

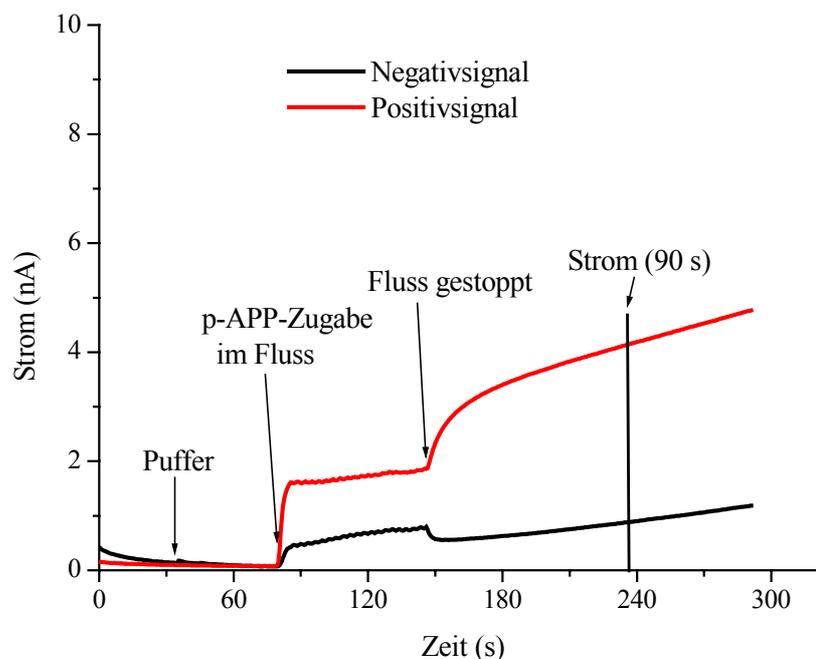


Abbildung 20: Typische Summensensorsignale einer Positiv- (rot) und einer Negativprobe (schwarz) bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat.

Abbildung 20 zeigt einen typischen Kurvenverlauf bei der Messung eines beschichteten Sensors mit p-Aminophenylphosphat, der wie folgt entsteht:

Wird der beschichtete Sensor in die Flusszelle eingebaut und mit dem Potentiostaten kontaktiert, so liegen alle Positionen bei null, solange die Kammer mit Puffer gespült wird. Erfolgt die Zugabe von p-Aminophenylphosphat, so ist innerhalb weniger Sekunden die enzymatische Freisetzung von p-Aminophenol an der Einstellung eines konstanten Stroms erkennbar. Wird nun der Fluss gestoppt, kann innerhalb der Kammer kein p-AP mehr transportiert werden und das an den verschiedenen Positionen gemessene Sensorsignal wird ausschließlich durch die Spaltungsreaktion an der jeweiligen Interdigitalstruktur verursacht.

Aus diesem Grund ist die Steigung beim Flussstop eine wichtige Größe für die Auswertung der Sensorsignale. Bricht das Sensorsignal ein, d.h. weist es eine negative Steigung nach Stoppen des Flusses auf, so handelt es sich um ein Negativsignal: es ist kein Enzym an der Oberfläche gebunden. Im Fall eines Positivsignals steigt das Signal nach Flussstop an. Bricht

das Sensorsignal ein und zeigt danach eine deutlich positive Steigung, so wird der kurze Einbruch nicht berücksichtigt.

Weiterhin dient das Stromsignal 90 Sekunden nach Flusstop der Beurteilung des Sensorsignals. Um die einzelnen Positionen vergleichen zu können, wird dem Signal der Positivprobe, bzw. falls keine Positivprobe beschichtet wurde, dem höchsten Signal der Wert 100% zugeteilt und angegeben, wie sich die Sensorsignale der einzelnen Positionen prozentual zueinander verhalten. Diese Methode ist deshalb empfehlenswert, weil nachfolgend gezeigt werden wird, dass die Absolutwerte der Stromsignale bei verschiedenen Chips nicht vergleichbar sind.

4.1.1 Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Faktoren auf die Signalintensität des amperometrischen Ausleseschritts

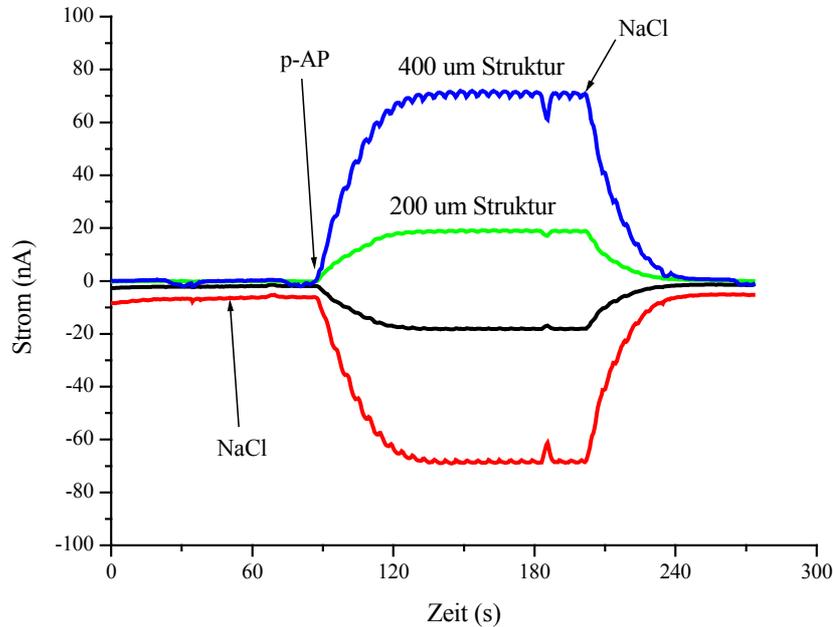
Bei der Entwicklung eines Immunosensors mit einem indirekten Ausleseschritt (Kapitel 2.2.2.1), in diesem Fall die enzymatische Substratspaltung mit nachfolgender amperometrischer Detektion, ist zunächst eine ausführliche Charakterisierung des Detektionsschrittes mit einem unbeschichteten Sensorchip notwendig, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Messsignal abschätzen zu können. In einem nächsten Schritt werden die Reaktions- und Messbedingungen für die weiteren Untersuchungen so gewählt, dass das Ergebnis der Messung optimiert werden kann.

4.1.1.1 Abhängigkeit von der Größe der Interdigitalstrukturen

Die Intensität des Sensorsignals ist proportional zur Anzahl der Elektronenübergänge an den Elektrodenoberflächen. Ein Elektronenübergang kommt zustande, wenn ein p-Aminophenol-Molekül an die Elektrodenoberfläche diffundiert und dort eine Reaktion eingeht. Da bei größeren Interdigitalstrukturen mehr Oberfläche zur Verfügung steht, ist die Zahl der reaktiven Zusammenstöße zwischen Elektrode und Substrat pro Zeiteinheit größer und damit auch das Stromsignal höher [74, 75].

Um die Abhängigkeit des Sensorsignals von der Elektrodenfläche zu untersuchen, wurde das Redoxrecycling einer p-Aminophenollösung mit zwei verschiedenen Interdigitalstruktur-Typen gemessen. Die Messkurve in Abbildung 21 zeigt die unterschiedliche Intensität des

Messsignals bei der Verwendung von 200 μm (grün, schwarz) bzw. 400 μm (rot, blau) Interdigitalstrukturen. Die Tabelle gibt die gemessenen Ströme an den einzelnen Elektroden nach Einstellung eines konstanten Stroms wieder.



Durchmesser IDS	I(Kathode)/nA	I(Anode)/nA	I(gesamt)/nA
200 μm	-18	19	37
400 μm	-69	72	141

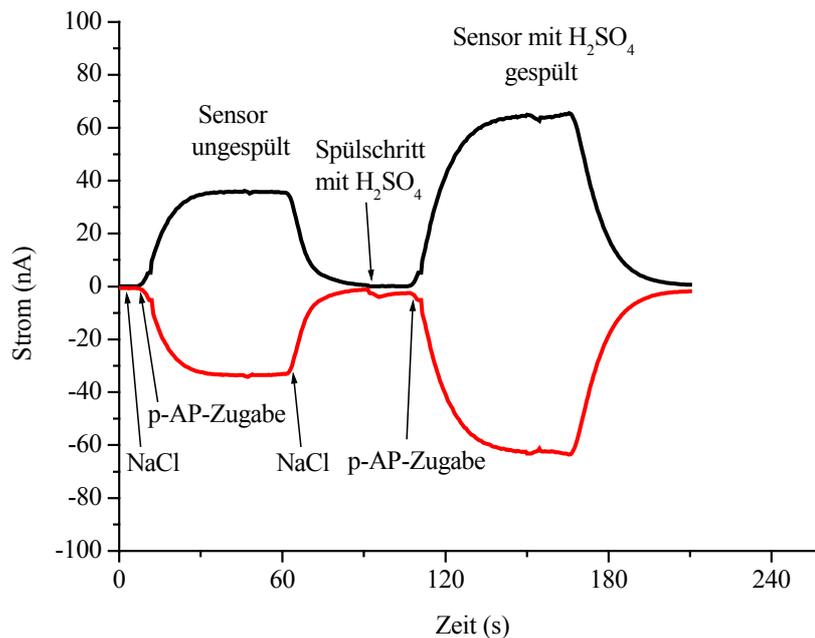
Abbildung 21: Unterschiedliche Signalintensität bei der Messung einer $2 \cdot 10^{-4}$ molaren p-AP-Lösung mit Strukturen von 200 μm und 400 μm Durchmesser

Da der „aktive Teil“ der Interdigitalstrukturen (Abbildung 14) eine runde Form mit einem Durchmesser von 200 μm bzw. 400 μm aufweist, ist mit $A_{\text{IDA}} = k \pi r^2$ (k =Proportionalitätskonstante, r =Radius der Interdigitalstruktur) die Elektrodenoberfläche A_{IDA} der 400 μm Strukturen viermal so groß wie die der 200 μm Strukturen. Entsprechend der Erwartung zeigt die große Interdigitalstruktur ein annähernd viermal (3,8 mal) größeres Messsignal, was die Theorie bestätigt, dass das Sensorsignal bei gleicher Substratkonzentration proportional zur Elektrodenoberfläche aufgrund der größeren Zahl an Elektronenübergängen zunimmt.

4.1.1.2 Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Sensoren

Neben der Größe spielt auch die Beschaffenheit der Elektrodenoberfläche eine wichtige Rolle für die Intensität des Sensorsignals. Da das Stromsignal wie oben beschrieben abhängig ist von der Anzahl der Elektronenübergänge pro Zeiteinheit, ist neben der Diffusion des p-Aminophenols zu den Elektrodenoberflächen auch die Reaktivität der Elektrodenoberfläche von Bedeutung. Mit zunehmender Reaktivität der Oberfläche steigt die Anzahl der *reaktiven* Stößen zwischen Substrat und Elektrode und so auch die Anzahl der Elektronenübergänge und das resultierende Sensorsignal.

Die Abhängigkeit des Sensorsignals von einem Schwefelsäure-Spülschritt sollte zeigen, in welcher Größenordnung eine Signaländerung durch die Reinigung der Oberfläche stattfindet. Abbildung 22 zeigt die Messkurve einer Interdigitalstruktur vor und nach Behandlung mit Schwefelsäure, der Tabelle sind die Stromwerte der gespülten bzw. ungespülten Elektroden nach Einstellung eines konstanten Stroms zu entnehmen.



IDS	I(Kathode)/nA	I(Anode)/nA	I(gesamt)/nA
ungespült	-33	36	69
gespült	-63	65	128

Abbildung 22: Abhängigkeit des Sensorsignals bei der Messung mit p-Aminophenol ($c=10^{-4}$ mol/l) von der Behandlung des Sensorchips mit Schwefelsäure

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass das Sensorsignal eines Sensors bei zweimaliger Messung mit derselben p-Aminophenol-Lösung durch einen Spülschritt mit konzentrierter Schwefelsäure nahezu verdoppelt wird (der Gesamtstrom des gespülten Chips ist 1,8 mal so hoch wie der des ungespülten Chips). Durch den Spülschritt werden an den Goldelektroden adsorbierte Verunreinigungen entfernt und so die Elektrodenaktivität und daraus resultierend auch das Sensorsignal erhöht.

Daraus kann gefolgert werden, dass die Kinetik des Redoxrecycling durch die Reaktion an der Elektrodenoberfläche und nicht durch die Diffusion zwischen den Elektrodenfingern bestimmt wird.

4.1.1.3 Spannungsabhängigkeit

Bei der Messung des Redoxrecycling von p-Aminophenol an Interdigitalelektroden wird an den beiden kammartigen Arbeitselektroden der Interdigitalstruktur (Kapitel 3.2) ein Potential angelegt, welches als Spannung gegen das Potential einer Ag/AgCl-Bezugselektrode vorgegeben wird und als Anregungssignal für die Redoxreaktion dient. Der resultierende Strom zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode ergibt das messbare Antwortsignal [76] [77].

Bei der Wahl des Potentials, welches an die Arbeitselektroden angelegt werden soll, ist zu beachten, dass die Spannung groß genug sein muss, um die Redoxreaktion zwischen p-Aminophenol und p-Iminochinon zu initiieren. Sie sollte jedoch nicht beliebig groß gewählt werden, da p-Aminophenol bzw. die oxidierte Form p-Iminochinon, welches bei höheren Spannungen bevorzugt vorliegt, stabile Radikale ausbildet und so die Bildung von Dimeren und Polymeren bei zu hohen Spannungen eine mögliche Nebenreaktion ist [78]. Dies würde einerseits zu einer Abnahme des Sensorsignals führen, da dem Redoxreaktionsgleichgewicht Reaktionspartner entzogen werden, andererseits zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Interdigitalstrukturen durch die Polymerisation an der Goldoberfläche.

Die Messungen zur Spannungsabhängigkeit wurden mit dem Mikropotentiostaten MCP-2 nach dem im Anhang A.2 beschriebenen Messprotokoll und einem Sensor mit 200 μm Strukturen durchgeführt. Mit einer 10^{-5} molaren p-AP-Lösung in Phosphatpuffer pH=6,6 wurde die Spannungsabhängigkeit des Redoxrecycling bei manueller Spannungseinstellung untersucht. Beginnend mit einer angelegten Gesamtspannung U_{ges} von 100 mV wurde die Spannung

manuell in Schritten von 10 mV erhöht und jeweils bis zur Einstellung eines konstanten Stroms ($\Delta I(10s) < 0,1 \text{ nA}$) gemessen

Abbildung 23 zeigt die Messwerte des Gesamtstroms in Abhängigkeit von der eingestellten Spannung.

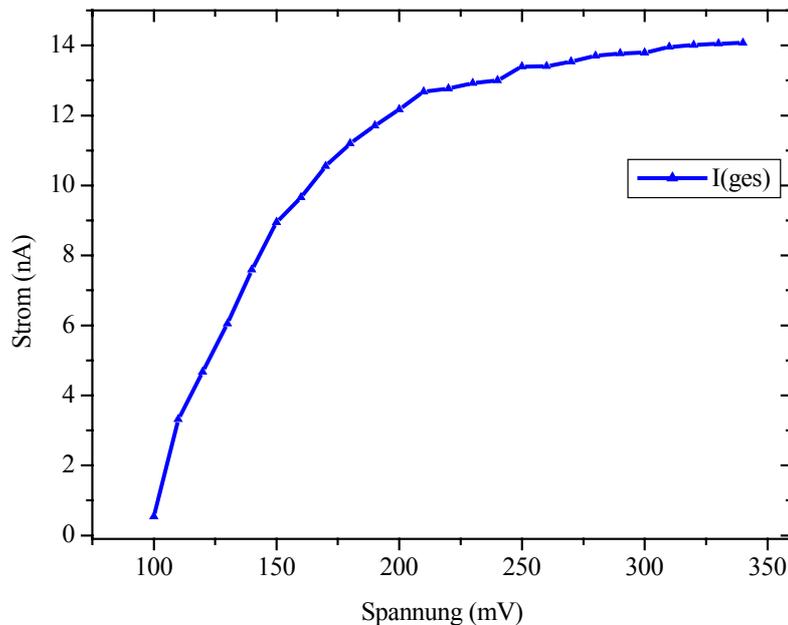


Abbildung 23: Messkurve der voltammetrischen Messung von p-Aminophenol ($c=10^{-5} \text{ mol/l}$) in Phosphatpuffer ($\text{pH}=6,6$) bei manueller Spannungsvorgabe

Die Messung zeigt deutlich, dass das Stromsignal ausgehend von 0,5 nA (bei 100 mV) bei einer Erhöhung der Spannung in 10 mV-Schritten mit einer Anfangssteigung von $2,78 \text{ nA}/10 \text{ mV}$ steil bis auf 12,2 nA (bei 200 mV) ansteigt und sich bei einer weiteren Spannungserhöhung asymptotisch einem Maximalwert (14 nA bei 350 mV) annähert.

4.1.1.4 Cyclische Voltammetrie

Die cyclische Voltammetrie ist eine elektrochemische Technik zur Untersuchung und Charakterisierung des elektrochemischen und kinetischen Verhaltens einer Verbindung oder einer Elektrodenoberfläche. Durch diese Methode können die elektrochemischen Prozesse in einem weiten Potentialbereich erfasst werden, um beispielsweise eine Aussage über die Reversibilität einer Redoxreaktion treffen zu können [76, 79, 80].

Die Messung beruht auf der linearen zeitlichen Änderung einer Potentialdifferenz zwischen einer Potentialunter- und Obergrenze. Beginnend bei einem Startpotential wird das Potential der Arbeitselektroden mit einer konstanten Geschwindigkeit (Scangeschwindigkeit) bis zur gewählten Ober- oder Untergrenze erhöht bzw. gesenkt. Dort erfolgt eine Umkehr der Scanrichtung und das Potential läuft rückwärts bis zum Ausgangspotential. Durchläuft das Elektrodenpotential in dem eingestellten Potentialfenster Bereiche, in denen elektrochemische Prozesse an den Arbeitselektroden ablaufen können, so fließt ein Strom, der in dem Diagramm $I(\text{ges}) = f(U(\text{ges}))$ dem entsprechenden Potential zuzuordnen ist. Die Form des resultierenden Diagramms gibt schließlich Auskunft über die elektrochemischen Eigenschaften des Substrates unter den gegebenen Reaktionsbedingungen. Weist das Cyclovoltammogramm zwei Peaks (Peak = Auftreten eines Minimums bzw. Maximums im Verlauf des Diagramms) auf, so kann daraus geschlossen werden, dass die an den Elektroden stattfindende Reaktion diffusionskontrolliert und reversibel ist, im Falle einer irreversiblen Reaktion ist nur ein Peak im Diagramm zu beobachten, da die Rückreaktion ausbleibt.

Die Entstehung eines Peaks im Cyclovoltammogramm einer diffusionskontrollierten Reaktion kann wie folgt erklärt werden:

Ausgehend von einem hohen Startpotential bei dem nur die oxidierte Form vorliegt, wird das Potential mit der gewählten Scangeschwindigkeit gesenkt. Erreicht es den Bereich des Reduktionspotentials des Substrates, so beginnt der Stoffumsatz von der oxidierten in die reduzierte Form, verbunden mit dem Fluss eines negativen kathodischen Stroms. Der Strom steigt an, bis die Konzentration der oxidierten Form des Substrats an der Elektrodenoberfläche auf Null abgesunken ist, weil durch Diffusion nicht genügend Substrat nachgeliefert wird. Es tritt eine sogenannte Verarmung ein und der Strom fällt ab. Bei einer reversiblen Reaktion erfolgt nach Umkehr der Scanrichtung die Rückreaktion (Oxidation) und es entsteht ein positiver anodischer Strom, welcher solange ansteigt, bis erneut eine Verarmung an der Oberfläche eintritt. Wird die Scangeschwindigkeit viel langsamer gewählt als die Diffusionsgeschwindigkeit der redoxaktiven Spezies, so entsteht eine stationäre Strom-Spannung-Kurve ohne Peak.

Die Untersuchung zur Cyclischen Voltammetrie wurden mit einer 200 μm Struktur und dem Mikropotentiostaten MCP-2 nach dem im Anhang A.2 unter Punkt zwei beschriebenen Messprotokoll in nicht gerührter Lösung durchgeführt.

Ausgehend von einer Spannung U_{ges} von 71 mV wurde mit einer Frequenz von 1,428 mHz, d.h. einer Spannungsvorschubgeschwindigkeit von 1mV/s bis zu einer Endspannung von 312

mV das cyclische Voltammogramm einer 10^{-5} molaren p-Aminophenol in Phosphatpuffer (pH=6,6) aufgenommen

In Abbildung 24 ist die Messung der cyclischen Voltammetrie dargestellt, die schwarze Kurve zeigt den Strom in Abhängigkeit der Spannung bei ansteigenden Spannungswerten, die rote Kurve bei fallenden Spannungswerten.

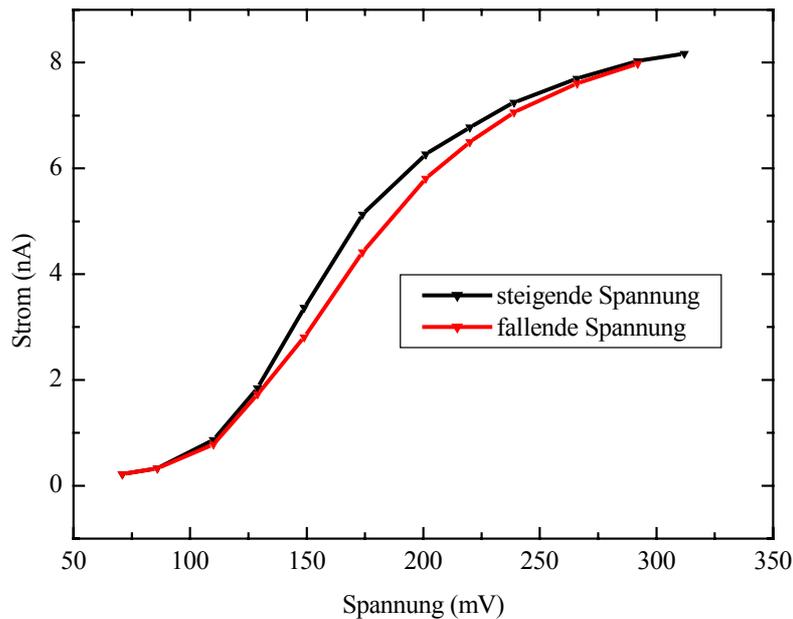


Abbildung 24: Cyclische Voltammetrie von p-Aminophenol ($c=10^{-5}$ mol/l) in Phosphatpuffer (pH=6,6), Größe der Interdigitalstruktur $200\ \mu\text{m}$

Das in Abbildung 24 gezeigte cyclische Voltammogramm einer 10^{-5} molaren p-Aminophenollösung in 0,1 molarer NaCl wurde mit einer Scangeschwindigkeit von 1mV/s aufgenommen. Es zeigt, dass bei dieser Scangeschwindigkeit durch die kammartige Elektrodenanordnung der Interdigitalstrukturen mit Elektrodenabständen von $0,8\ \mu\text{m}$ keine Diffusionshemmung beim Redoxrecycling von p-Aminophenol auftritt. Für die Charakterisierung des Ausleseschritts ist das eine wichtige Erkenntnis, weil durch den Aufbau einer stationären Schicht an der Oberfläche der Elektrodenfinger, welche die Diffusion zwischen den Elektroden behindern würde, das Redoxrecycling zum Erliegen käme. Da bei der cyclischen Voltammetrie keine Diffusionskontrolle erkennbar ist, kann auch davon ausgegangen werden, dass unter Messbedingungen (konstante Spannung) der Stofftransport zwischen Kathoden- und Anodenfingern gewährleistet ist.

Dieses Ergebnis stützt die Erkenntnis aus Kapitel 4.1.1.2 wonach die Kinetik der Redoxreaktion durch die Oberflächenreaktion und nicht durch die Diffusion bestimmt ist.

4.1.1.5 Konzentrationsabhängigkeit

Der grundlegende Gedanke bei der Wahl des Redoxrecyclings von p-Aminophenol als Ausleseschritt einer immunochemischen Reaktion ist die Proportionalität des Stromsignals zur Konzentration an p-Aminophenol in Lösung. Um einen Einblick zu bekommen, welche Signalintensität welchem Konzentrationsbereich zuzuordnen ist, wie groß der erfassbare Konzentrationsbereich ist und welche Nachweisgrenze mit dem verwendeten Messaufbau zu erreichen ist, wurden Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an p-Aminophenol durchgeführt.

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Redoxrecycling wurde eine Verdünnungsreihe von p-Aminophenol in Phosphatpuffer pH=6,6 hergestellt. Ausgehend von einer 10^{-3} molaren p-Aminophenol-Lösung (1,09mg/10ml) wurden durch Verdünnung von 1:10, 1:100, 1:1000 usw. Konzentrationen von 10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l, 10^{-6} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-8} mol/l und 10^{-9} mol/l erreicht. Dabei stellte es sich als wichtig heraus, die Lösungen vor der Messung frisch anzusetzen und möglichst schnell zu verarbeiten, da p-Aminophenol sehr licht- und luftempfindlich ist.

Die Messung zur Konzentrationsabhängigkeit erfolgte mit dem Mikropotentiostaten MCP-2 nach dem in Anhang A.2 beschriebenen Messprotokoll mit einer 200 μ m Struktur in nicht gerührter Lösung bei einer konstanten Spannung von 300 mV bis zur Stromkonstanz ($\Delta I(10s) < 0,1 \text{ nA}$)

Abbildung 25 zeigt die gemessenen Ströme in Abhängigkeit von der Konzentration der p-Aminophenol-Lösung.

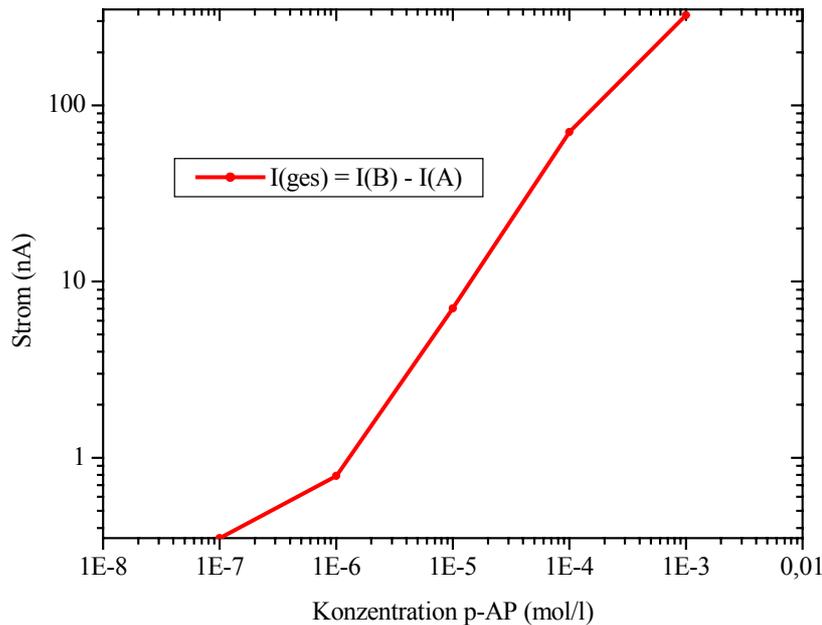


Abbildung 25: Doppellogarithmische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des Redoxrecyclings von p-Aminophenol bei $U_{\text{ges}}=300$ mV in Phosphatpuffer pH=6,6

Da die Konzentration an p-Aminophenol nicht der einzige Faktor ist, der die Intensität des Sensorsignals beeinflusst, ist die in Abbildung 25 gezeigte Messung nur mit den verwendeten Sensoren unter den beschriebenen Bedingungen exakt reproduzierbar. Sie gibt jedoch wieder, dass die Nachweisgrenze von p-Aminophenol in Lösung bei etwa 10^{-6} mol/l liegt und unter Berücksichtigung, dass der Messbereich des zur Auslesung von Immunreaktionen verwendeten Potentiostaten CIPO auf einen Gesamtstrom von 200 nA begrenzt ist, bis etwa $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l p-Aminophenol ausgelesen werden könnten. In Abhängigkeit von anderen Einflussfaktoren wie Größe und Beschichtung der Interdigitalstrukturen können sich diese Konzentrationswerte, bzw. die Signalintensitäten bei den jeweiligen Konzentrationen verschieben, was in dieser Arbeit in Kapitel 4.1.1.8 genauer beschrieben wird.

4.1.1.6 pH-Abhängigkeit

Die Redoxreaktion von p-Aminophenol ist zur Erhaltung der Ladungsneutralität bei der Abgabe bzw. Aufnahme von Elektronen mit einem Übergang von H^+ -Ionen verbunden. Da alle Messungen in wässrigem Milieu durchgeführt werden und durch Wahl des pH-Werts die

Konzentration an H^+ -Ionen in Lösung variiert werden kann, wurde das Redoxrecycling von p-Aminophenol in Phosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (pH=6,0 bis pH=7,6) untersucht.

Abbildung 26 zeigt die Abhängigkeit des Messsignals von dem pH-Wert des Puffers. Die Messungen wurden mit dem Mikropotentiostaten MCP-2 nach dem in Anhang A.2 beschriebenen Messprotokoll mit einer 200 μm Struktur in nicht gerührter Lösung bei einer konstanten Spannung von 300 mV bis zur Stromkonstanz ($\Delta I(10s) < 0,1 nA$) durchgeführt

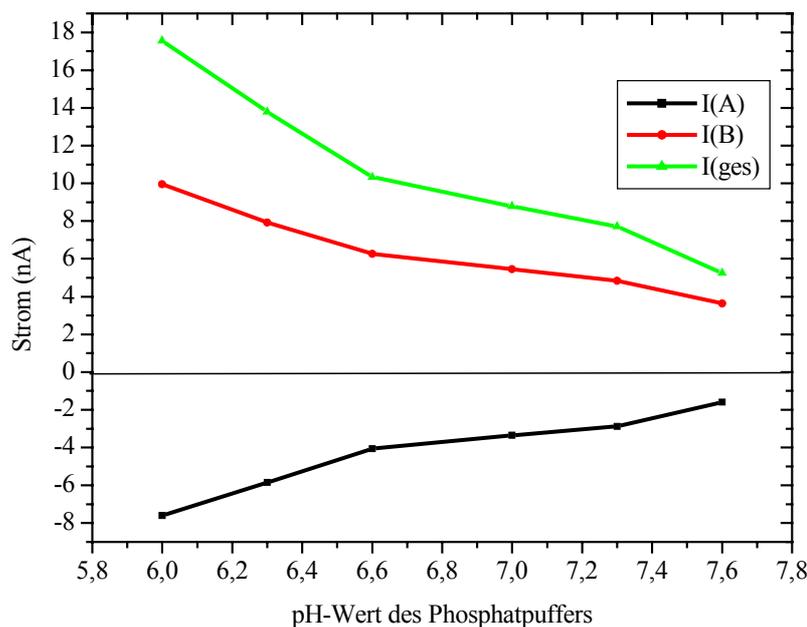


Abbildung 26: pH-Wert-Abhängigkeit des Messsignals beim Redoxrecycling von p-Aminophenol ($U_{ges}=300$ mV, $c=10^{-5}$ mol/l)

Die Messkurve in Abbildung 26 gibt die Abhängigkeit des Stromsignals von dem pH-Wert des Puffers wieder und zeigt einen deutlichen Anstieg des Gesamtstroms bei sinkendem pH-Wert. Bei pH=6,0 beträgt der Gesamtstrom 18 nA und ist damit mehr als dreimal so hoch wie der Gesamtstrom bei pH=7,6 mit 5 nA. Die höhere Konzentration an H^+ -Ionen in Lösung bei niedrigen pH-Werten beschleunigt die Aufnahme von H^+ -Ionen, also die Rückreaktion des Iminochinons und erhöht damit den gesamten Stoffumsatz, was durch die größere Zahl an Elektronenübergängen auch den resultierenden Strom erhöht.

Im Gegensatz zu der Tatsache, dass das Redoxrecycling von p-Aminophenol im sauren Milieu zu höheren Signalen führt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit des vorausgehenden enzymatischen Spaltungsschrittes im basischen am größten. Die Aktivität des katalysierenden Enzyms ist im Bereich von pH=9,5 bis 10,5 am höchsten [72].

Ein weiterer Aspekt bei der Wahl des pH-Werts bei der Messung ist die Stabilität der Antigen-Antikörper-Bindung bei pH-Verschiebung, die im physiologischen pH-Bereich am besten ist. Sowohl im stark sauren als auch im stark basischen pH-Bereich ist die Dissoziation des Affinitätskomplexes begünstigt [22].

4.1.1.7 Abhängigkeit vom Fluss

Da die Intensität des Messsignals bei der Messung mit p-Aminophenol auch von der Diffusionsgeschwindigkeit zwischen den Elektrodenfingern abhängig ist, nimmt auch die Tatsache, ob in ruhender oder bewegter Lösung gemessen wird, Einfluss auf das Sensorsignal. Bei eingeschalteter Pumpe findet ein aktiver Stofftransport statt und die Ausbildung einer stationären Schicht an den Elektrodenoberflächen wird vermindert. Wird der Fluss gestoppt, kann der Stofftransport zwischen Kathoden- und Anodenfingern nur durch Diffusion erreicht werden und die Ausbildung einer diffusionshemmenden Doppelschicht an der Oberfläche ist möglich [74].

Um die Abhängigkeit des Messsignals vom Fluss zu untersuchen, wurde eine Messung mit dem Mikropotentiostat CIPO und 200 μm Strukturen durchgeführt. Zunächst wurde die Flusszelle bei einem Volumenstrom von 0,27 ml/min mit 0,1 molarer NaCl gespült, dann p-Aminophenol (10^{-4} mol/l in 0,1 mol/l NaCl) zugegeben und bis zur Einstellung eines konstanten Stroms gewartet, dann der Fluss gestoppt.

Abbildung 27 zeigt den Signaleinbruch des Sensorsignals bei der Messung mit p-Aminophenol, wenn der Fluss gestoppt wird.

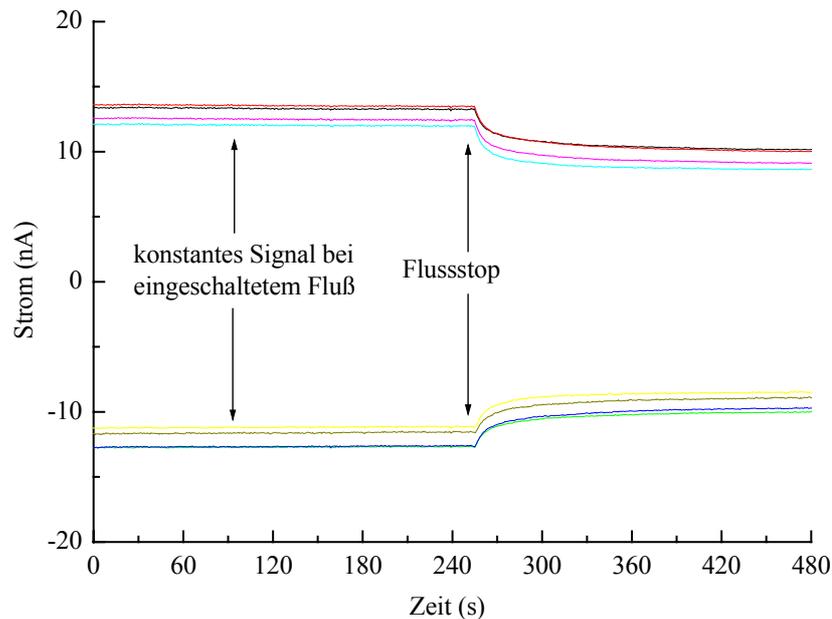


Abbildung 27: Signaleinbruch beim Redoxrecycling von p-Aminophenol ($c=10^{-4}$ mol/l) beim Abschalten der Pumpe

Die Messung in Abbildung 27 zeigt, dass durch das Stoppen des Flusses eine Verringerung des Sensorsignals um etwa 20-25% auftritt. Wie oben bereits beschrieben fällt bei Flusstopp der aktive Stofftransport zwischen den Elektroden weg und die Ausbildung einer stationären Schicht an den Elektrodenoberflächen ist stärker. Bei der Messung eines unbeschichteten Sensors mit p-Aminophenol führt das offensichtlich zu einer leichten Diffusionshemmung und daraus resultierend auch zu einem geringeren Stoffumsatz an den Elektroden und damit auch zu einer Signalabnahme.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen der antikörperbeschichteten Immunoassays geht dem Redoxrecycling ein enzymatischer Spaltungsschritt durch Alkalische Phosphatase voraus. In diesem Fall ist die Messung im Fluss eher nachteilig. Die enzymatische Spaltung des zugegebenen Substrats (p-Aminophenylphosphat) an der beschichteten Elektrodenoberfläche verläuft nur in ruhender Lösung quantitativ, weil die Kontaktzeit zwischen Enzym und Substrat im Fluss zu klein ist, um eine vollständige Umsetzung des Substrats zu katalysieren. Da zudem im Fluss das abgespaltene p-Aminophenol durch die gesamte Flusszelle transportiert wird, ist die Differenzierbarkeit der einzelnen Positionen in diesem Fall schlechter.

In Abbildung 28 ist das Verhalten einer enzymbeschichteten Position bei Zugabe von p-Aminophenylphosphat und anschließendem Flusstopp gegenüber einer nicht mit Enzym

belegten Position gezeigt. Die rote Kurve stellt das Sensorsignal der mit Enzym belegten Positivprobe dar, die schwarze Kurve die Negativposition ohne Enzym. In Phase 1 wird der Chip mit Puffer gespült, es kann an beiden Positionen kein Signal gemessen werden. In Phase 2 erfolgt die Substratzugabe im Fluss, an der enzymbeschichteten Position (rot) findet die Substratspaltung statt, es stellt sich ein konstanter Strom ein. Abgespaltenes p-Aminophenol wird durch den Fluss innerhalb der Zelle transportiert, weshalb an der Negativposition (schwarz) ebenfalls ein (kleineres) Signal gemessen wird. Wird in Phase 3 der Messung der Fluss gestoppt, so zeigt sich an der Negativposition, dass kein Enzym gebunden ist, da das Signal, wie bei dem unbeschichteten Sensor in Abbildung gezeigt, einbricht. An der Positivposition steigt in Phase 3 das Sensorsignal an, da mehr Substrat enzymatisch umgesetzt wird und zum Redoxrecycling zur Verfügung steht.

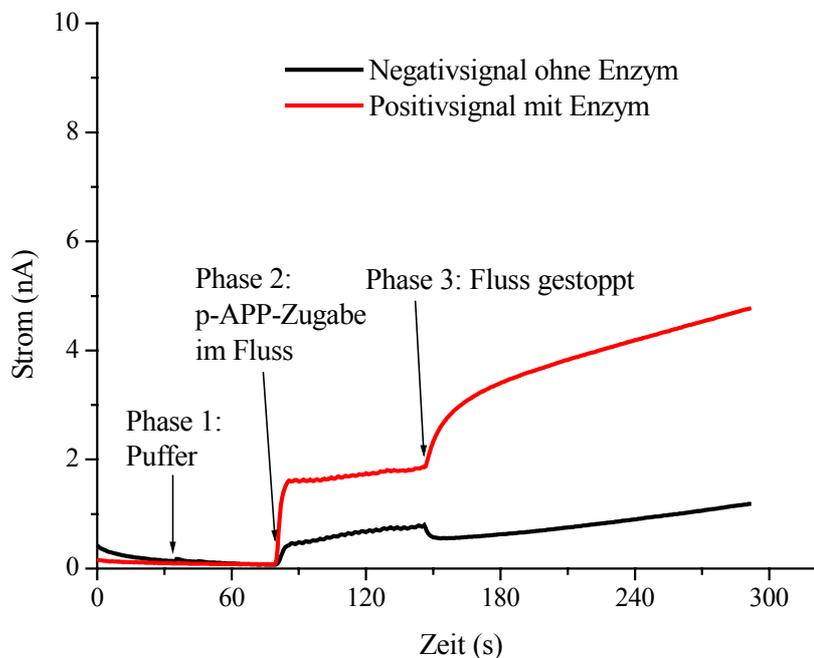


Abbildung 28: Vergleich der Sensorsignale von Positiv- und Negativprobe eines beschichteten Chips bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat.

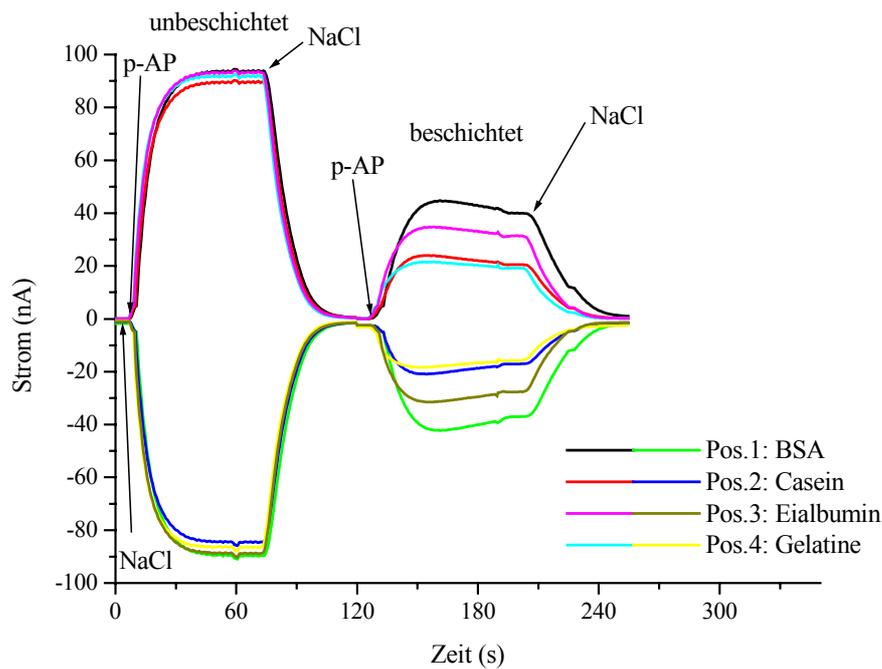
Aufgrund der Tatsache, dass eine nicht beschichtete Position bei der Messung mit p-Aminophenol bei Flusstopp einen Signaleinbruch zeigt, eine mit Enzym beschichtete Position dagegen nach Substratzugabe im Fluss zunächst auf einen konstanten Wert ansteigt und nach Flusstopp das Sensorsignal nochmals ansteigt, wird das Verhalten der einzelnen Sensorpositionen beim Stoppen des Flusses zur Einordnung nach Positiv- und Negativsignal herangezogen.

4.1.1.8 Elektrodenbeschichtung

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Sensorsignals beim Redoxrecycling von p-Aminophenol von der Beschichtung der Elektroden wurden 200 μm Strukturen zunächst mit H_2SO_4 gespült und mit dem Mikropotentiostaten CIPO das Redoxrecycling von p-Aminophenol ($c=10^{-4}$ mol/l) gemessen. Dabei wurde die Messzelle zunächst mit NaCl gespült, anschließend p-Aminophenol zugegeben, bis zur Stromkonstanz gemessen und wieder mit NaCl gespült. Anschließend erfolgte die zweistündige Beschichtung der Interdigitalstrukturen mit unterschiedlichen Proteinen, Thiolen und Blockreagenzien in einer Konzentration von jeweils 1mg/ml in H_2O und eine erneute Messung mit p-Aminophenol.

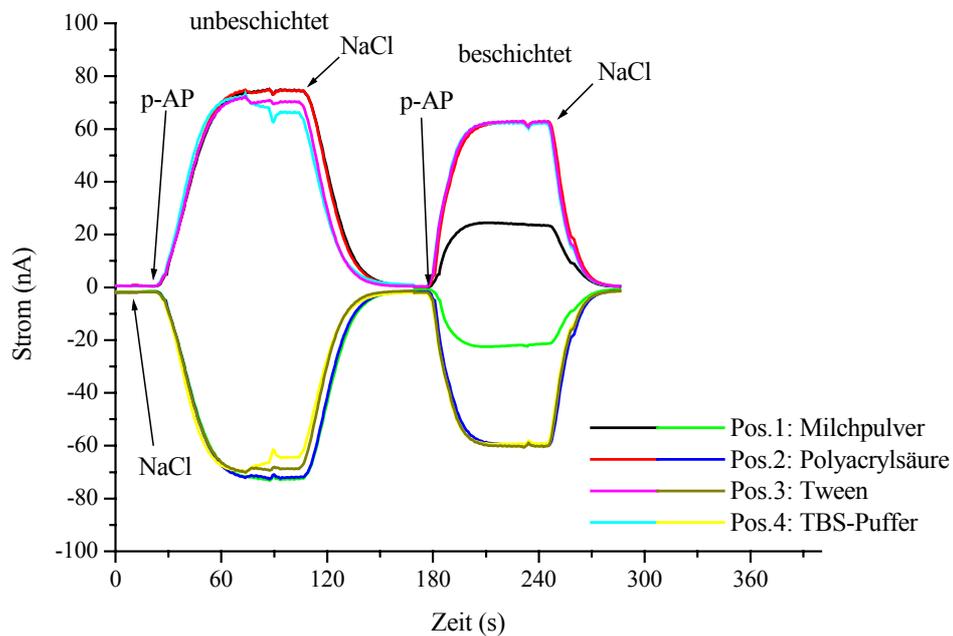
Um zu gewährleisten, dass das p-Aminophenol in konstanter Konzentration vorliegt, wurde eine 10^{-4} molare Masslösung in kleinen Portionen eingefroren und unmittelbar vor der Messung aufgetaut.

Die nachfolgenden Abbildungen 28-33 zeigen die Sensorsignale der unbeschichteten Sensoren und der mit verschiedenen Blockreagenzien, Proteinen und Antikörpern beschichteten Sensoren bei der Messung mit p-Aminophenol. Den Tabellen sind die Zahlenwerte für Kathoden- und Anodenströme im unbeschichteten und beschichteten Zustand zu entnehmen, sowie die Gesamtströme, die sich aus der Differenz aus Anoden- und Kathodenstrom ergeben. Die letzte Spalte zeigt, wie viel Prozent des ursprünglichen Signals nach der Beschichtung noch gemessen werden können ($\% = \text{Gesamtstrom des beschichteten Sensors} / \text{Gesamtstrom des unbeschichteten Sensors}$).



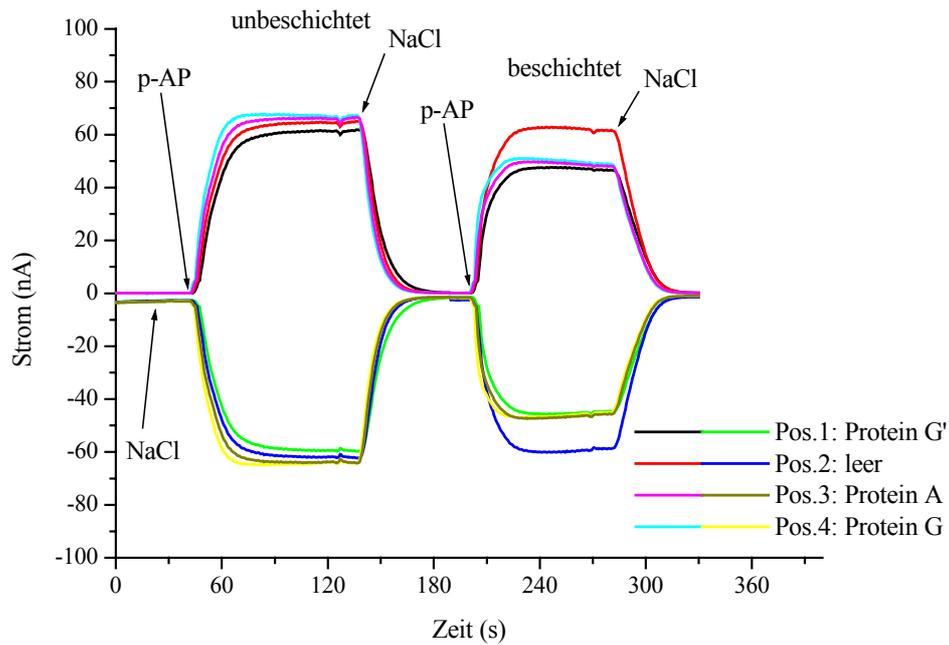
Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			% gesamt
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	gesamt	
1	-90	94	184	-42	45	87	47
2	-85	89	174	-21	24	45	25
3	-89	93	182	-32	35	67	36
4	-86	92	178	-18	21	39	22

Abbildung 28: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit BSA (schwarz/grün), Casein (rot/blau), Eialbumin (pink/oliv) und Gelatine (türkis/gelb) beschichteten Sensors



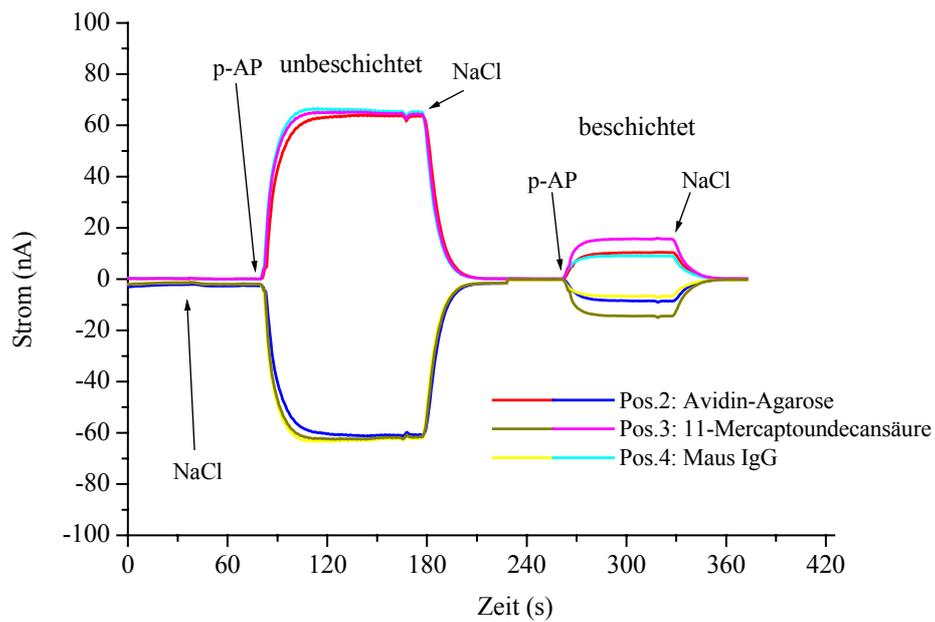
Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			% gesamt
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	gesamt	
1	-73	75	148	-22	24	46	31
2	-72	74	146	-60	63	123	84
3	-70	72	142	-60	63	123	87
4	-69	72	141	-59	62	121	87

Abbildung 29: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit Milchpulver (schwarz/grün), Polyacrylsäure (rot/blau), Tween 20 (pink/oliv) und TBS (pH=7,6) (türkis/gelb) beschichteten Sensors



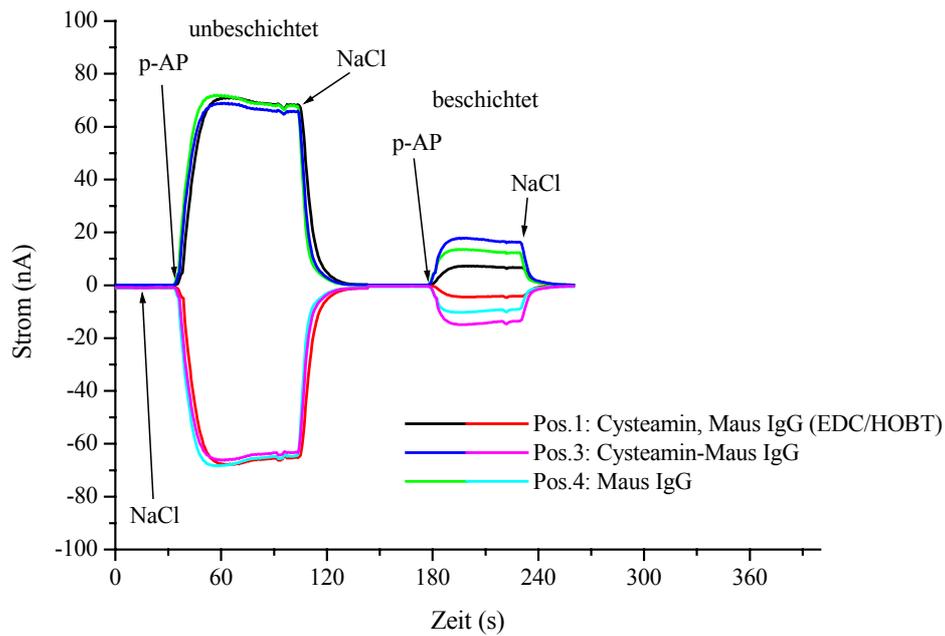
Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			%
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	gesamt	
1	-59	61	120	-46	47	93	77
2	-62	65	127	-60	63	123	97
3	-64	66	130	-47	50	97	75
4	-65	67	132	-47	50	97	73

Abbildung 30: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit Protein G' (schwarz/grün), Protein A (pink/oliv) und Protein G (türkis/gelb) beschichteten Sensors



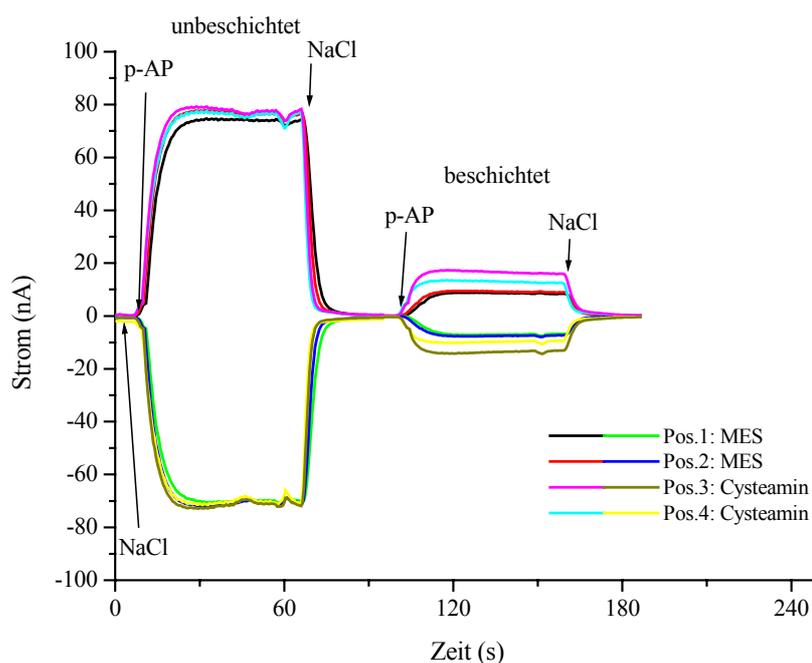
Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			%
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	Gesamt	
2	-61	64	125	-8	10	18	15
3	-62	65	127	-14	16	30	24
4	-63	65	128	-7	9	16	13

Abbildung 31: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit Cysteamin (schwarz/grün), Avidin-Agarose (rot/blau), 11-Mercaptoundecansäure (pink/oliv) und Maus IgG (türkis/gelb) beschichteten Sensors



Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			% gesamt
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	Gesamt	
1	-68	71	139	-4	7	11	8
3	-66	69	135	-15	18	33	24
4	-68	72	140	-10	13	23	16

Abbildung 32: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit Cysteamin und Maus IgG (EDC/HOBT) (schwarz/rot), Cysteamin-Maus IgG (vorher gekoppelt) (blau/pink) und Maus IgG (türkis/grün) beschichteten Sensors



Position	I_{\max} unbeschichtet /nA			I_{\max} beschichtet /nA			%
	Kathode	Anode	gesamt	Kathode	Anode	gesamt	
1	-70	74	144	-7	9	16	11
2	-71	77	148	-7	9	16	11
3	-72	78	150	-14	17	31	21
4	-71	77	148	-10	13	23	16

Abbildung 33: Vergleich der Signalintensität bei der Messung mit p-Aminophenol eines unbeschichteten und eines mit Mercaptoethansulfonsäure (schwarz/grün), (rot/blau) und Cysteamin (pink/oliv), (türkis/gelb) beschichteten Sensors

Die Abbildungen 28 bis 33 zeigen, dass bei der Beschichtung der Elektroden mit unterschiedlichen Reagenzien eine mehr oder weniger starke Signalabnahme im Vergleich zum unbeschichteten Sensor bei der Messung mit p-Aminophenol zu beobachten ist. Die Ursache hierfür ist, dass die Intensität des Stromsignals wie oben bereits beschrieben zum einen von der Diffusion zwischen den Elektrodenfingern zum anderen von der Aktivität der Goldoberfläche abhängig ist. Die Beschichtung der Oberfläche mit mehr oder weniger voluminösen Molekülen führt dazu, dass durch sterische Hinderung der „Zugang“ des Substrats zur Elektrode verschlechtert ist, da einige Bindungsplätze an der Elektrodenoberfläche durch die Beschichtung belegt sind und nicht mehr für die Redoxreaktion von p-Aminophenol zur Verfügung stehen.

In Abbildung 34 sind die relativen Sensorsignale in Prozent (letzte Spalte der Tabellen in den Abbildungen 28 bis 33) der unterschiedlich beschichteten Sensoren in einer Übersicht

dargestellt, der Prozentwert ergibt sich aus dem Quotienten der Summensignale für die beschichtete Elektrode und die unbeschichtete Elektrode. Diese Art der Auswertung hat den Vorteil, dass Unregelmäßigkeiten, die bei unterschiedlichen Chips und selbst zwischen einzelnen Positionen eines Chips auftreten können, nicht in das Messergebnis eingehen und dadurch die Vergleichbarkeit der Messergebnisse verbessern. Wie die Messungen unterschiedlicher Positionen mit derselben Beschichtung gezeigt haben, liegt die Abweichung bei den angegebenen Prozentwerten bei etwa $\pm 5\%$, bedingt durch unregelmäßige Beschichtung und Schwankungen bei den einzelnen Messungen.

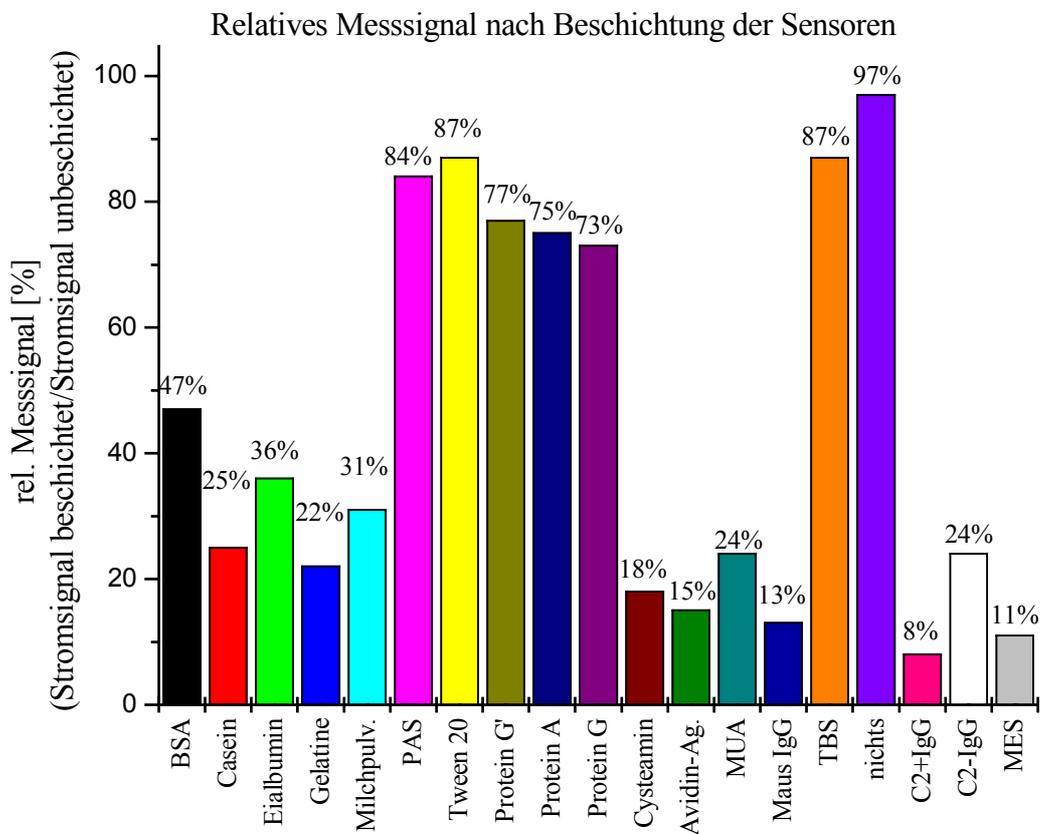


Abbildung 34: Relative Messsignale bei unterschiedlicher Beschichtung der Interdigitalstrukturen

Auffällig bei der übersichtlichen Darstellung der relativen Messsignale in Abbildung 34 ist, dass vor allem bei der Beschichtung mit Thiolen (Cysteamin, MUA=Mercaptoundecansäure, C2-IgG=an Cysteamin gekoppeltes IgG, C2+IgG=Cysteamin-Monolayer und anschließende *on chip*-Kopplung von IgG und MES=Mercaptoethansulfonsäure) mit einem relativen Signal von 8%-25% eine große Signalabnahme zu beobachten ist, d.h. ein kleines Signal nach der Beschichtung. Dass die Signalabnahme und damit die Belegung der Oberfläche bei der

Beschichtung mit funktionalisierten Thiolen am größten ist, ist nicht überraschend, da die in der Literatur beschriebenen dichtest gepackten selbstorganisierten Monolagen [45, 47, 81] dem Substrat nahezu keinen freien Zugang zur Elektrodenoberfläche mehr erlauben.

Die Beschichtung mit verschiedenen Proteinen führt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen: Während die Beschichtung mit Protein A, G oder G' ein recht hohes relatives Messsignal im Bereich von etwa 75% zeigt, war die Signalabnahme bei der Beschichtung mit Maus IgG, Avidin-Agarose, Gelatine, Casein, Milchpulver, Eialbumin oder BSA mit Messsignalen von 13% bis 47% gegenüber dem unbeschichteten Chip teilweise sehr hoch.

Die höchsten Sensorsignale nach der Beschichtung sind mit einem relativen Messsignal von 84%-87% bei Reagenzien ohne Thiolgruppen zu erkennen, ein unbeschichteter Sensor zeigt nach einer Stunde noch 97% des ursprünglichen Stromsignals.

Da die größten relativen Messsignale nach der Beschichtung bei Versuchen mit Reagenzien ohne Schwefelgehalt beobachtet wurden und die geringsten Sensorsignale bei der Beschichtung mit Thiolen, sollte bei den Proteinen mit unbekanntem Schwefelanteil durch Bestimmung des Schwefelgehalts untersucht werden, ob auch bei den Proteinen eine Korrelation zwischen Schwefelgehalt und Oberflächenbelegung zu erkennen ist.

Die Schwefelbestimmung wurde von der Firma Infracor durchgeführt, die Methode und die genauen Messergebnisse sind im Anhang A.3 beschrieben.

Alle untersuchten Proteine enthalten erwartungsgemäß weniger als 2% Schwefel, entsprechend dem durchschnittlichen Schwefelgehalt aller Proteine. Im Fall von Maus IgG und Maus-IgG gekoppelt an Cysteamin konnte Schwefel qualitativ nachgewiesen werden, eine quantitative Bestimmung war nicht möglich.

In Abbildung 35 ist das relative Messsignal der mit den jeweiligen Proteinen beschichteten Sensoren bei der Messung mit p-Aminophenol gegen den Schwefelgehalt der Proteine aufgetragen. Würde sich das relative Messsignal streng proportional zum Schwefelgehalt der Beschichtungsreagenzien ändern, so müssten sich alle Punkte im Diagramm auf einer Diagonale von links oben (großes Messsignal, kleiner Schwefelgehalt) nach rechts unten (kleines Messsignal, hoher Schwefelgehalt) befinden.

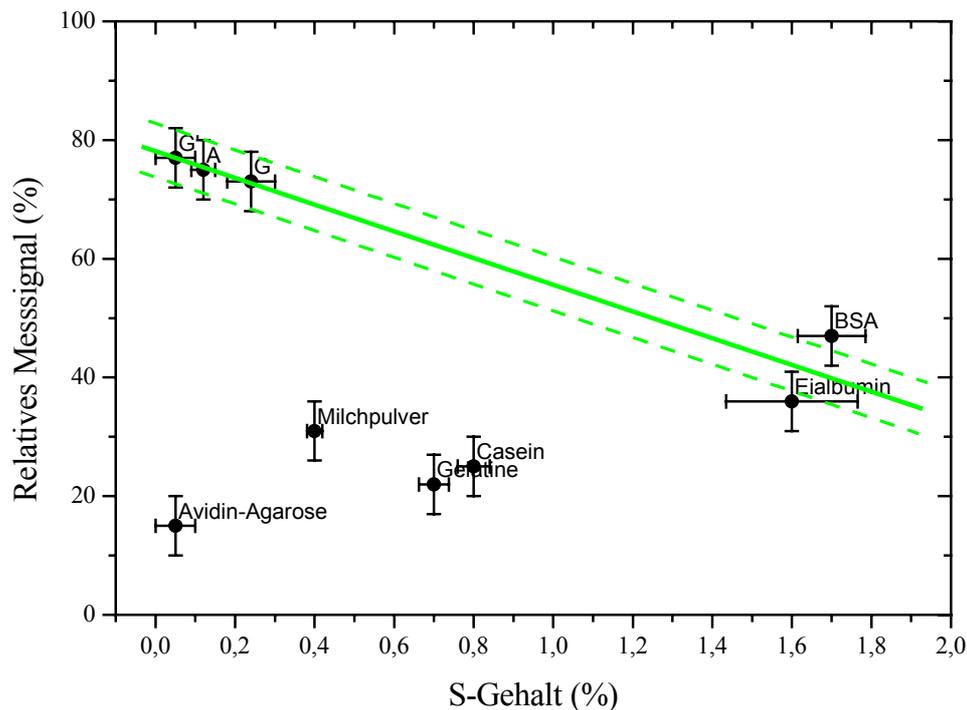


Abbildung 35: Relatives Messsignal der beschichteten Sensoren in Abhängigkeit vom Schwefelgehalt der Beschichtungsreagenzien.

In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass die zur Immobilisierung der Antikörper verwendeten Proteine A, G und G' mit relativ geringem Schwefelgehalt von unter 0,25% ein recht hohes Sensorsignal ergeben und so der Erwartung entsprechen. Es ist auch eine Korrelation zwischen zunehmendem Schwefelgehalt und abnehmendem relativen Sensorsignal d.h. eine diagonale Anordnung der drei Punkte im Diagramm zu erkennen. Führt man diese Diagonale unter Berücksichtigung des Messfehlers von +/-5% im Diagramm fort (grün), so befinden sich die beiden Albuminproben Eialbumin und BSA (Bovine Serum Albumine) mit einem hohen Schwefelgehalt von ~1,6% und einem relativen Messsignal nach der Beschichtung von ~40% im Bereich dieser Diagonale.

Unterhalb dieser Diagonalen d.h. mit einem geringen relativen Messsignal im Vergleich zum Schwefelgehalt befinden sich Milchpulver, Casein und Gelatine mit einem Schwefelgehalt von 0,4%-0,8% und einem relativen Sensorsignal von ~25%.

Der größte Ausreißer ist Avidin-Agarose, welches bei einem Schwefelgehalt von unter 0,1% zu dem kleinsten relativen Messsignal von 15% führt.

Die Grafik in Abbildung 35 macht deutlich, dass bei Proteinen vergleichbarer Struktur wie den Zellwandproteinen Protein A, G und G' und den Albuminen Eialbumin und BSA die Oberflächenbelegung der Elektroden und der Schwefelgehalt des Proteins gut korrelieren.

Das geringe relative Messsignal des mit Avidin-Agarose beschichteten Sensors sowie die Signale von Milchpulver (verschiedene Proteine enthalten), Casein (Phosphathaltiges Glycoprotein) und Gelatine (stäbchenförmiges Skleroprotein) zeigen zudem, dass ganz offensichtlich auch die Struktur des Proteins Einfluss auf das relative Sensorsignal nach der Beschichtung hat. Selbst bei einem geringen Schwefelgehalt von unter 0,1%, welcher ausreicht, um das Protein mittels Schwefel-Gold-Bindung an die Oberfläche zu binden, ist (wie bei Avidin-Agarose durch die voluminöse Agarose (ein Polysaccharid)) eine große sterische Abschirmung der Elektrodenoberfläche möglich, welche ein geringes Sensorsignal zur Folge hat. Das Protein mit dem höchsten Schwefelgehalt, BSA, hat dagegen eine kompakte runde Form, welche die Oberfläche weniger abschirmt und entsprechend zeigt das Sensorsignal des beschichteten Chips mit 47% einen recht hohen Wert.

Neben der direkten Belegung der Oberfläche durch die Ausbildung von Gold-Schwefel-Bindungen ist für die Größe des Messsignals nach der Beschichtung also auch die sterische Abschirmung der Elektrodenoberfläche durch die mehr oder weniger voluminösen und dichten Beschichtungsreagenzien von Bedeutung.

Die Eigenschaften der jeweiligen Beschichtungsreagenzien bei der Immobilisierung des Antikörpers und dem eigentlichen Ausleseschritt mit enzymatischer Spaltung und anschließendem Redoxrecycling von p-Aminophenol wird nachfolgend bei der Entwicklung des biologischen Testdesigns beschrieben.

4.1.2 Diskussion

Die ausführliche Charakterisierung des Ausleseschrittes mittels Redoxrecycling von p-Aminophenol sollte zum einen zeigen, wie die optimalen Messbedingungen aussehen, zum anderen erste Anhaltspunkte dafür geben, welche Auswertungsmethode zu reproduzierbaren, vergleichbaren Ergebnissen führt.

Die Untersuchungen zu Spannungsabhängigkeit und pH-Wert-Abhängigkeit haben ergeben, dass die besten Messbedingungen bei einem angelegten Gesamtpotential von 300-350 mV und einem pH-Wert von 7,6 zu erreichen sind. Niedrigere pH-Werte sind zwar für die Intensität des Sensorsignals günstiger, da jedoch die enzymatische Spaltung durch Alkalische

Phosphatase einen basischen pH-Wert erfordert, wurde pH=7,6 gewählt und für alle weiteren Messungen aufgrund der Vergleichbarkeit TBS-Puffer pH=7,6 verwendet.

Ansonsten konnte festgestellt werden, dass die Vergleiche zwischen den absoluten Sensorsignalen verschiedener Sensoren schwierig zu ziehen sind, da die Intensität des Stromsignals von vielen Faktoren, wie der Größe der Interdigitalstruktur, der Reinigung der Elektroden und der Beschichtung der Elektrodenoberfläche abhängig ist und diese Effekte das Sensorsignal bis zu Faktor 4 beeinflussen können. Um beim Redoxrecycling derselben p-Aminophenollösung mit unterschiedlich beschichteten Chips vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollten also Interdigitalstrukturen derselben Größe verwendet werden, dieselben Spülschritte durchgeführt werden und das gemessene Sensorsignal nach der Beschichtung relativ zu dem Sensorsignal des unbeschichteten Sensors betrachtet werden.

Das Verhalten des Sensorsignals bei Stoppen des Flusses ist interessant für die Differenzierung zwischen einer mit Enzym belegten Position und einer unbeschichteten Position bei Zugabe von p-Aminophenylphosphat. Während die unbeschichtete Position mit p-Aminophenylphosphat ebenso wie bei der Messung mit p-Aminophenol einen Signaleinbruch zeigt, steigt das Signal der enzymbeschichteten Position mit p-Aminophenylphosphat bei Flusstopp an.

Für die Entwicklung eines biologischen Testdesigns, wo die Existenz des enzymgebundenen Antikörpers über Positiv- oder Negativsignal Auskunft geben soll, ist das eine wichtige Erkenntnis, da dieses Verhalten nachfolgend die Grundlage der Signalinterpretation darstellt. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Signalauslese mittels Redoxrecycling von p-Aminophenol sehr komplex ist, da sehr viele Faktoren Einfluss auf das Sensorsignal haben. Ein wesentlicher Bestandteil bei der Entwicklung des biologischen Testdesigns wird daher sein, den Einfluss dieser Faktoren zu minimieren und eine Methode zu finden, die zu vergleichbaren, reproduzierbaren Ergebnissen führt.

4.2 Entwicklung eines biologischen Testdesigns

Nachdem wie in Kapitel 4.1 gezeigt, das Verhalten der Interdigitalelektroden bei Redoxrecycling von p-Aminophenol ausführlich charakterisiert wurde, sollen nachfolgend die Untersuchungen zur Immobilisierung der Antikörperschicht mittels unterschiedlicher Strategien und der nachfolgenden Detektion mittels enzymmarkiertem Antikörper vorgestellt werden.

Als Modellsystem wurde für die Immobilisierung auf der Goldelektrode ein Maus Immunglobulin G (IgG) verwendet, welches direkt mittels Anti-Maus IgG, an Alkalische Phosphatase (AP) gebunden, nachgewiesen wird. In diesem Fall ist also der immobilisierte Antikörper gleichzeitig Analyt (Abbildung 36), was den Vorteil hat, dass die beiden wichtigsten Schritte beim Aufbau des Immunosensors, die Immobilisierung des Fängerantikörpers und die Detektion mittels enzymmarkiertem Antikörper, ohne weitere Zwischenschritte optimiert werden können.

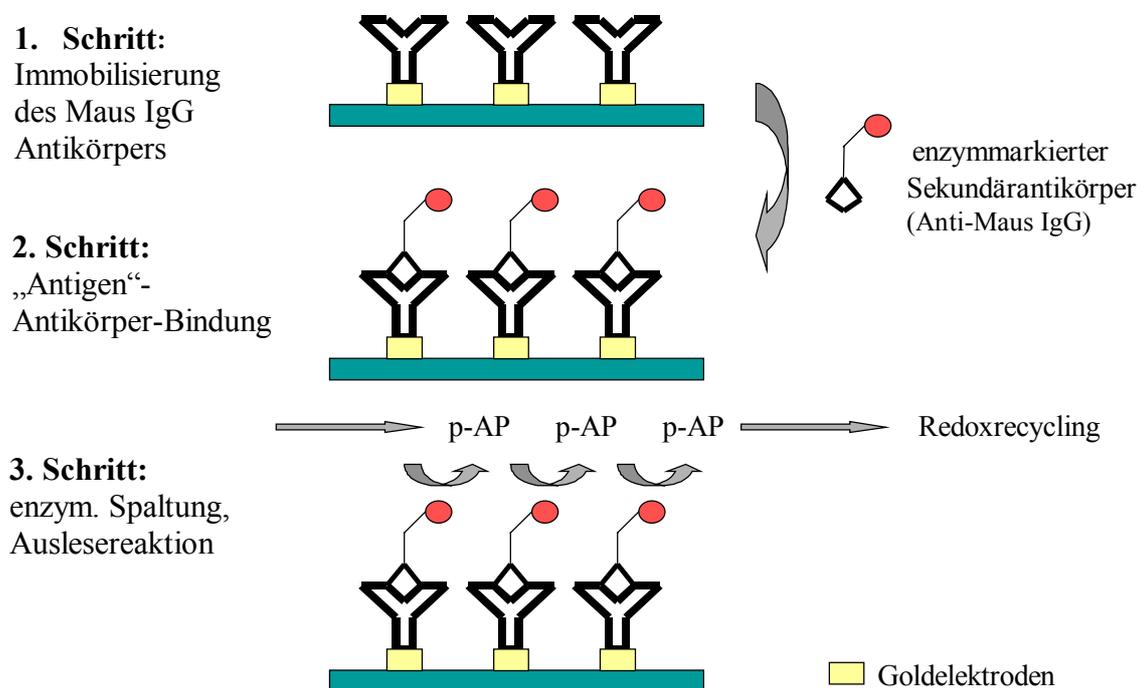


Abbildung 36: Schematische Darstellung des verwendeten biologischen Testdesigns

Wie in Abbildung 36 gezeigt, umfasst der Aufbau eines biologischen Testdesigns drei Schritte:

1. die Immobilisierung des Antikörpers,
2. die immunochemische Reaktion,
3. die Auslesereaktion.

Schritt 1: Die selektive Beschichtung der Elektrodenoberflächen mit Antikörpern bildet die Grundlage für die erfolgreiche Entwicklung eines Immunosensors.

In Bezug auf die Antikörperschicht sollte die Beschichtung folgende Eigenschaften aufweisen:

- sie sollte möglichst vollständig sein, d.h. es sollten keine freien Bindungsplätze verbleiben, die unspezifische Wechselwirkungen eingehen können,
- sie sollte gut reproduzierbar sein,
- sie sollte selektiv nur die gewünschten Antikörper bzw. Antigene binden,
- sie sollte unter den Messbedingungen stabil sein.

Für die Bindung von Antikörpern auf einer Goldoberfläche sind prinzipiell drei Konzepte möglich:

- Physisorption des Antikörpers auf der Oberfläche [82, 83]:

Die unspezifische Adsorption der Antikörper an der Goldoberfläche erfolgt durch Ausbildung von Gold-Schwefel-Bindungen an den Cystein-Bausteinen der Antikörper. Sie ist zwar einfach durchzuführen, hat jedoch den Nachteil, dass die Oberflächenbelegung ungeordnet und schlecht reproduzierbar ist, da sie stark von der Konstitution des Antikörpers abhängt. Ein weiteres Problem für die Anwendung als Biosensor ist, dass diese Methode für die weitere Bindung von Antikörpern bzw. Antigenen durch die physisorbierten Antikörper nur bedingt geeignet ist, weil die Bindungsstellen der Antikörper in der ungeordneten Schicht schwer zugänglich sind.

- Adsorptive Beschichtung der Goldoberfläche mit einem Protein-Layer (Proteine A, G, G', L oder Avidin/Streptavidin) und anschließende spezifische affine Bindung eines Antikörpers [84-88]:

Die Protein-Gold-Bindung wird ebenfalls durch Schwefel-Gold-Bindungen realisiert, da wie in allen Proteinen auch bei den hier verwendeten Proteinen Thiolgruppen aufgrund von Cystein-Bausteinen vorkommen. Die Methode der Belegung der Goldelektroden mit einer Proteinschicht und anschließender Bindung des Antikörpers

hat gegenüber der direkten Adsorption des Antikörpers auf der Oberfläche den Vorteil, dass der Antikörper auf der Proteinschicht spezifisch gebunden wird. Im Fall von Protein A binden IgG-Antikörper unter Ausbildung eines Affinitätskomplexes Fc-spezifisch, im Fall von Avidin wird die Affinität zwischen Avidin und Biotin genutzt, um biotinylierte Antikörper spezifisch zu binden.

- Belegung der Goldoberfläche mit einem funktionalisierten Thiol, welches eine selbstorganisierte Monolage ausbildet, an die Proteine kovalent gebunden werden können [89-91]:

Die Ausbildung einer selbstorganisierten Monolage auf Goldoberflächen durch Thiole ist die bekannteste Methode zur Belegung der Elektrodenoberfläche mit einer definierten organischen Schicht. Sie hat gegenüber den anderen genannten Methoden, die auf Physisorption beruhen, den Vorteil, dass die Oberflächenbelegung in der Regel vollständig ist und dadurch wenig freie Bindungsplätze für unspezifische Wechselwirkungen verbleiben. Durch die kovalente Kopplung der Antikörper an die terminalen funktionellen Gruppen der Thiole wird außerdem eine definierte Antikörperschicht aufgetragen.

Die genannten Vor- und Nachteile der Beschichtungskonzepte sollen verdeutlichen, inwieweit die genannten Methoden die oben genannten Anforderungen für die Antikörperschicht erfüllen, für unterschiedliche Auslesemethoden und Anwendungen muss die Art der Beschichtung jedoch immer neu auf das jeweilige Messsystem abgestimmt werden.

Die Auswirkungen der einzelnen Beschichtungsvarianten auf die amperometrische Auslesemethode wurde bereits in Kapitel 4.1.1.8 unter *Elektrodenbeschichtung* gezeigt, nachfolgend in diesem Kapitel werden die Untersuchungen bezüglich der Spezifität der Antikörperschicht bei der Entwicklung des biologischen Testdesigns beschrieben.

Schritt 2: Nach der Immobilisierung des Fängerantikörpers Maus IgG erfolgt in einem zweiten Schritt die immunologische Reaktion des Fängerantikörpers mit dem enzymgebundenen Detektionsantikörper Anti-Maus IgG (AP). Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, bilden Antikörper (Anti-Maus IgG (AP)) und Antigen (Maus IgG) unter physiologischen Bedingungen durch Einbeziehung zahlreicher nicht-kovalenter Wechselwirkungen einen stabilen Affinitätskomplex aus, welcher sich durch hohe Spezifität und Selektivität auszeichnet.

Schritt 3: Der dritte und letzte Schritt bei der Entwicklung des biologischen Testdesigns ist die enzymatische Substratspaltung und die elektronische Auslesung des Redoxrecycling von p-Aminophenol, was in Kapitel 4.1 bereits sehr ausführlich beschrieben wurde.

Das Ziel bei der Optimierung des Testdesigns ist vor allem, durch Untersuchung verschiedener Beschichtungsstrategien und deren Auswirkungen auf das Sensorsignal, die einzelnen Reaktionsschritte aufeinander abzustimmen und die beste Beschichtungsvariante für die gewählte Auslesemethode zu finden. Die Hauptkriterien bei der Auswertung der Messsignale sind dabei Differenzierbarkeit von Positiv- und Negativproben und Intensität des Messsignals.

Da die Charakterisierung des Detektionsschrittes ergeben hat, dass der Vergleich der Messsignale zwischen verschiedenen Chips aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren sehr schwierig ist, erfolgt die Interpretation der Sensorsignale nach einer relativen Methode:

Dem Strom der Positivposition 90 Sekunden nach Flusstop wird ein Wert von 100% zugeordnet und prozentual dazu angegeben, wie sich Negativ- bzw. Blindprobe gegenüber der Positivprobe verhalten. Anhand der Intensität der Sensorsignale und der Form der Messkurve (Verhalten bei Flusstop, Konstanz der Steigung), kann zudem eine Aussage über Positiv- und Negativsignal, sowie über die Elektrodenbelegung bei der jeweiligen Beschichtung getroffen werden. So stellt eine negative Steigung bei Flusstop ein deutliches Negativsignal dar und ein sehr großer Maximalwert der Steigung der Flusstop mit Ausbildung eines „Plateaus“ (Anhaltspunkt: $m(7\text{sek})/m(\text{max}) \ll 0,5$) deutet auf eine starke Oberflächenbelegung oder möglicherweise eine undefinierte Beschichtung hin, wie nachfolgend noch genauer beschrieben wird.

4.2.1 Beschichtung der Sensoren und Durchführung der Messungen

Die selektive Beschichtung der einzelnen Positionen erfolgte mit dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Aufbau. Die Sensoren wurden zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure gespült und die Reagenzien in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, sofern nicht anders angegeben. Die Reaktionszeit zwischen den einzelnen Beschichtungsschritten betrug normalerweise eine Stunde, in dieser Zeit wurde der Sensorchip in einer feuchten Kammer

aufbewahrt, um ein Austrocknen des Tropfens zu verhindern. Anschließend wurde der Chip mit dest. Wasser gespült, getrocknet und die nächste Schicht aufgetragen.

Die nachfolgenden Messungen wurden alle mit dem in Kapitel 3.1 vorgestellten Messsystem basierend auf dem Mikropotentiostaten CIPO durchgeführt. Der Start des Messprogramms erfolgte wie im Anhang A.1 beschrieben. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Messung mit einer 2 mmolaren p-Aminophenylphosphat-Lösung in TBS-Puffer pH=7,6 durchgeführt, die angelegten Potentiale lagen bei -50 mV und 300 mV. Die Messzelle wurde zunächst mit TBS-Puffer gespült (Fördervolumen $0,27$ ml/min / Einstellung der Pumpe auf 30 Umdrehungen), dann p-Aminophenylphosphat zugegeben, bis zur Einstellung eines konstanten Stroms gewartet und dann der Fluss gestoppt.

4.2.2 Optimierung des Detektionsschrittes

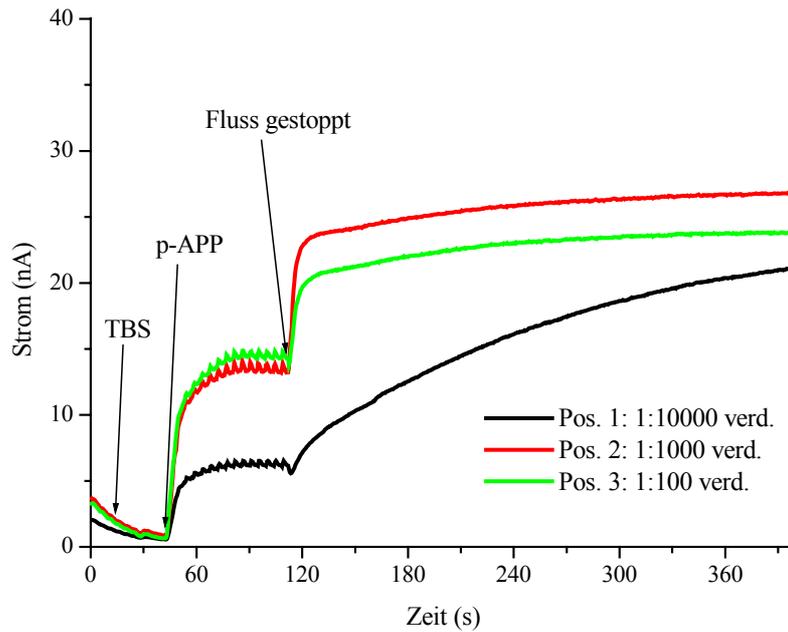
Um reproduzierbare Ergebnisse bei der Untersuchung der verschiedenen Immobilisierungsvarianten zu erhalten, sollte zunächst die Abhängigkeit des Sensorsignals von der Konzentration an enzymmarkiertem Detektionsantikörper, sowie von der Dauer der Beschichtung untersucht werden.

4.2.2.1 Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben hat die Konzentration an Beschichtungsreagenz an der Elektrodenoberfläche einen großen Einfluss auf die Intensität des Sensorsignals. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Konzentration des Detektionsantikörpers so zu wählen, dass alle Bindungsstellen besetzt werden und auf der anderen Seite die Oberflächenbelegung nicht zu groß ist und das Redoxrecycling des enzymatisch freigesetzten p-Aminophenol behindert.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Messsignals von der Konzentration an enzymmarkierten Detektionsantikörper wurden drei $400\mu\text{m}$ Strukturen eines Chips mit unterschiedlich konzentrierten Antikörperlösungen beschichtet.

Abbildung 37 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors. Der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung nach Flussstop, die Steigung der ersten sieben Sekunden nach Flussstop und den Strom 90 Sekunden nach Flussstop zu entnehmen.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,28	0,24	14
2 (rot)	2,83	0,69	25
3 (grün)	1,51	0,59	22

Abbildung 37: Summensignal der Messung eines mit unterschiedlichen Konzentrationen an Detektionsantikörper beschichteten Sensors mit 400 μ m Strukturen

Die Messung in Abbildung 37 zeigt, dass sich das Sensorsignal bei der Beschichtung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Detektionsantikörper nicht proportional zur Enzymkonzentration verhält. Von den drei untersuchten Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10000 zeigt die mittlere Verdünnung von 1:1000 (rot) sowohl im ersten Anstieg nach Flusstopp, wie auch 90 Sekunden nach Flusstopp das größte Messsignal.

Auffällig bei der Messung ist die unterschiedliche Signalform der einzelnen Kurven nach Flusstopp. Während beide Positionen mit höheren Konzentrationen (rot, grün) einen sehr steilen ersten Anstieg zeigen, nach 10 Sekunden jedoch auf einem nahezu konstanten Stromwert verbleiben (deutlich zu erkennen an einem großen Unterschied in den Messwerten von $m(\max)$ und $m(7\text{sek})$: $m(7\text{sek})/m(\max)=0,24$ bzw. $0,39$), nimmt das Stromsignal von Position 1 mit der höchsten Verdünnung nach Flusstopp über die gesamte Messdauer mit einer relativ konstanten Steigung zu ($m(\max) \sim m(7\text{sek})$).

Eine Erklärung für diese Beobachtungen kann sein, dass das Sensorsignal sowohl von der Enzymkonzentration als auch von der Oberflächenbeschichtung abhängig ist. Eine hohe

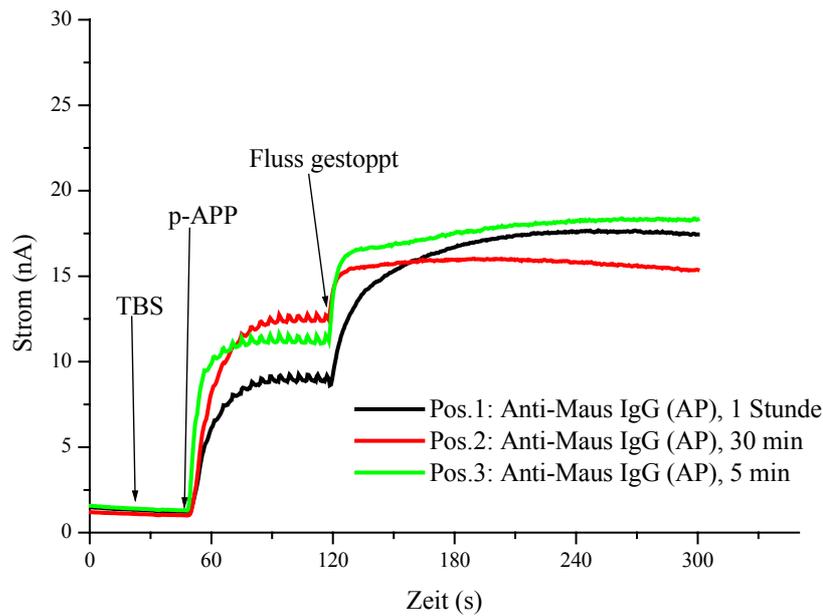
Enzymkonzentration bewirkt bei Flusstopp einen steilen Anstieg, weil viel gebundenes Enzym viel p-Aminophenylphosphat umsetzen kann. Andererseits ist eine hohe Enzymkonzentration auch mit einer größeren Oberflächenbelegung verbunden, so dass nur eine begrenzte Menge an freigesetztem p-Aminophenol an der Elektrodenoberfläche reagieren kann, was sich an der Einstellung eines fast konstanten Stroms nach dem steilen Anstieg der ersten Sekunden zeigt. Die höhere Oberflächenbelegung ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass die höhere Verdünnung von 1:1000 (rot) ein höheres Sensorsignal erzeugt als die geringere Verdünnung von 1:100 (grün).

Bei kleinen Enzymkonzentrationen (Verdünnung 1:10000, schwarz) wird pro Zeiteinheit weniger p-Aminophenylphosphat umgesetzt, weshalb die Steigung bei Flusstopp um Faktor 5-10 geringer ist als bei den höheren Konzentrationen. Da die Oberflächenbelegung in diesem Fall auch geringer ist als bei den höheren Konzentrationen, kann das freigesetzte p-Aminophenol vollständig an der Elektrodenoberfläche umgesetzt werden und es ist über die gesamte Messdauer ein gleichmäßiger Anstieg des Stroms entsprechend der Abspaltung von mehr p-Aminophenol zu erkennen. Eine durch die Oberflächenbelegung bedingte „Sättigung“ des Stromsignals wie bei höheren Enzymkonzentrationen wird nicht beobachtet.

4.2.2.2 Abhängigkeit von der Beschichtungsdauer

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Ausleseschritts von der Beschichtungszeit des Sensors mit Detektionsantikörper wurden drei 400µm Strukturen eines Sensors mit derselben Antikörperlösung (Anti-Maus IgG (AP) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS) unterschiedlich lang beschichtet.

In Abbildung 38 sind die Summensignale der Messung mit p-Aminophenylphosphat dargestellt, die Tabelle gibt die Werte für die maximale Steigung nach Flusstopp, die mittlere Steigung in den ersten 7 Sekunden nach Flusstopp und den Strom nach 90 Sekunden wieder.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,67	0,50	17
2 (rot)	0,89	0,29	16
3 (grün)	1,49	0,51	18

Abbildung 38: Summensignale der Messung eines Sensors mit drei unterschiedlich lang mit Detektionsantikörper beschichteten 400 μ m Strukturen

Abbildung 38 zeigt, dass das Sensorsignal mit dem größten Anstieg bei Flussstopp und dem höchsten Strom nach 90 Sekunden bereits durch 5 Minuten Beschichtung (grün) erreicht wird. Allerdings zeigt die Messkurve an dieser Position nach einem sehr steilen Anstieg wieder die Einstellung eines nahezu konstanten Stromwerts etwa 10 Sekunden nach Flussstopp. Position 3 mit 1 Stunde Beschichtungsdauer (schwarz) hat eine geringere Steigung direkt nach Flussstopp, das Sensorsignal steigt jedoch kontinuierlich an, bis es nahezu denselben Wert annimmt wie das an Position 1.

Da der steile Anstieg mit darauffolgender Einstellung eines konstanten Stroms wie oben beschrieben wahrscheinlich auf eine unzugängliche Elektrodenoberfläche und dadurch bedingte Diffusionshemmung des freigesetzten p-Aminophenol zurückzuführen ist, scheint 1 Stunde Beschichtungsdauer zu einer definierten Beschichtung zu führen und die Diffusion von p-Aminophenol zwischen den Elektrodenfingern weniger zu behindern.

4.2.2.3 Diskussion

Durch Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen und Zeiten bei der Beschichtung des Sensorchips mit Detektionsantikörper kann die Signalintensität und vor allem die Form der Messkurve beeinflusst werden.

Da bei den gezeigten Messungen die Immobilisierung des Detektionsantikörpers durch eine unspezifische Bindung (Adsorption) auf der Elektrodenoberfläche handelt und bei dem eigentlichen Detektionsschritt die Bindung des Antikörpers an das nachzuweisende Antigen vorausgeht, stellen die gezeigten Messungen, was Signalintensität und –form betrifft, nur Anhaltspunkte für den Detektionsschritt dar. Sie dienen dazu, Messfehler durch den Einsatz falscher Konzentrationen oder durch ungünstige Beschichtungsdauer zu vermeiden.

Die günstigste Konstellation ist eine Messkurve mit einer hohen Signalintensität und einer relativ konstanten Steigung, weshalb nachfolgend bei allen Assays der Detektionsantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wird und der Chip 1 Stunde beschichtet wird.

4.2.3 Immobilisierung mittels Cysteamin

Nach der Optimierung des Ausleseschritts wurden erste Versuche zur Immobilisierung des Antikörpers auf der Elektrodenoberfläche mit Hilfe funktionalisierter Thiole durchgeführt.

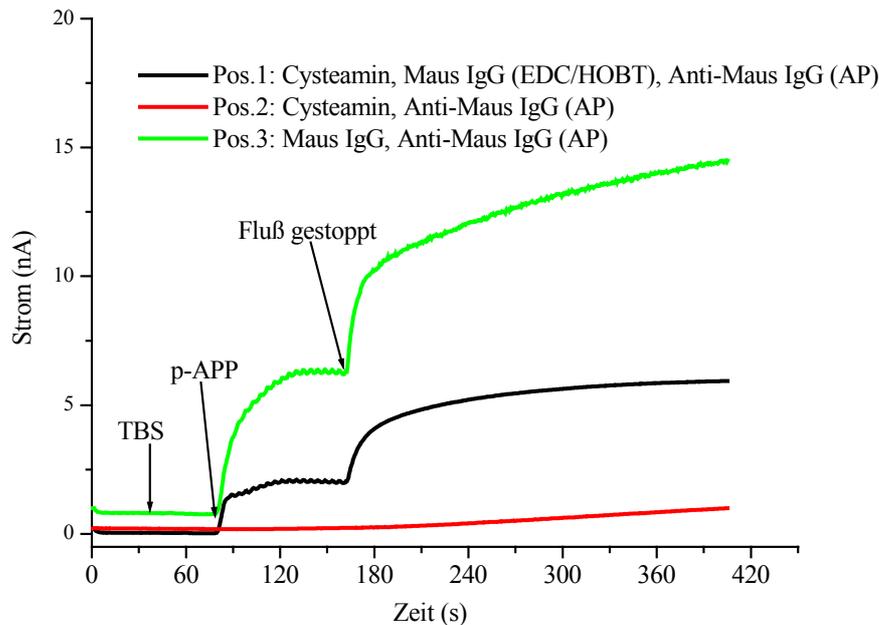
4.2.3.1 on-chip Kopplung von Cysteamin und Maus IgG

Die Immobilisierung des Maus IgG mittels *on-chip* Kopplung an Cysteamin beruht auf der Ausbildung einer selbstorganisierten Monolage des Cysteamins auf der Goldelektrode (Kapitel 2.3.1) und anschließender Peptidkopplung an eine Carboxylgruppe des Antikörpers.

Da die Peptidbindung zwischen der Aminofunktion des Thiols und der Carboxylfunktion des Antikörpers nicht spontan ausgebildet wird, muss die Carboxylfunktion des Antikörpers mit den entsprechenden Kopplungsreagenzien aktiviert werden (Kapitel 2.3.2).

Die *on-chip* Kopplung von Maus IgG an eine selbstorganisierte Monolage von Cysteamin auf Gold mit EDC und HOBt als Kopplungsreagenzien anhand eines 3-Positionen Assays untersucht. Neben der spezifischen Bindung des Antikörpers wurden dabei die unspezifischen Bindungen der Antikörper mit und ohne Cysteamin-Monolage betrachtet.

Abbildung 39 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors mit p-Aminophenylphosphat. Das Messsignal der Position mit *on chip* an Cysteamin gekoppeltem Antikörpers ist schwarz dargestellt (Position 1). Der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung nach Flussstop, die mittlere Steigung 7 Sekunden nach Flussstop und der Strom nach 90 Sekunden zu entnehmen.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,25	0,17	5 (100%)
2 (rot)	0,00	0,00	0,5 (10%)
3 (grün)	0,65	0,36	12 (240%)

Abbildung 39: Summensignal des 3-Positionen-Assays mit Cysteamin, Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) bei Kopplung von Cysteamin und Maus IgG *on chip*. Blindproben ohne Maus IgG (Position 2, rot) und Cysteamin (Position 3, grün)

In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die Positivprobe mit Maus IgG an Cysteamin gekoppelt (schwarz) ein positives Messsignal, also eine positive Steigung bei Flussstop zeigt, während die Negativprobe mit Cysteamin Monolayer aber ohne Maus IgG (rot) keinen Anstieg bei Flussstop aufweist. Eine unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers Anti-Maus IgG (AP) findet also auf der mit Cysteamin belegten Position nicht statt.

Position 3 ohne Cysteamin-Beschichtung (grün) ergibt bei Flussstop sowohl in der Anfangssteigung als auch im Strom nach 90 Sekunden ein Sensorsignal, was etwa 2,4 mal

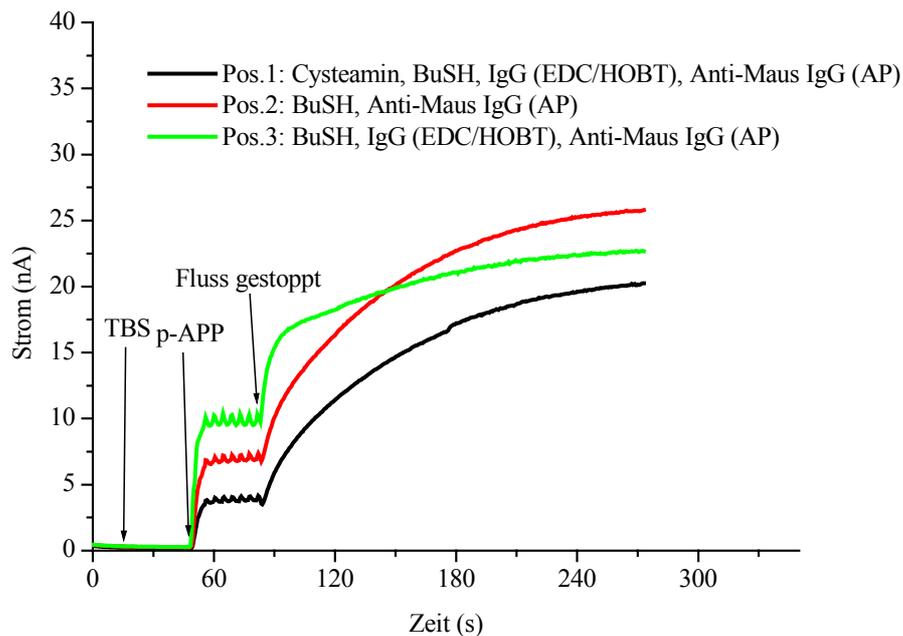
(240% des Signals der Positivposition) so groß ist wie das der Positivprobe (schwarz). Da es sich hier um eine unspezifische Adsorption des Antikörpers an der Oberfläche handelt und nicht um eine gerichtete Bindung des Antikörpers, ist dieses Ergebnis zunächst überraschend. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann wiederum in der Oberflächenbelegung gefunden werden: die Position mit Cysteamin und Maus IgG *on chip* gekoppelt zeigt bei der Untersuchung der Elektrodenbelegung in Kapitel 4.1.1.8 mit nur noch 8% relativem Sensorsignal nach der Beschichtung die größte Elektrodenbelegung aller untersuchten Proben. Da das Sensorsignal wie bereits beschrieben neben der Menge an gebundenem Enzym auch von der Oberflächenbelegung abhängt, kann wie in der oben gezeigten Messung der Fall eintreten, dass bei unspezifischer Antikörperbindung durch die geringere Elektrodenabschirmung ein größeres Signal gemessen wird als bei spezifischer Bindung. Sollen verschiedene Immobilisierungsmethoden bezüglich ihrer Eigenschaften untersucht werden, so können nur bei Positionen mit gleicher oder ähnlicher Elektrodengrundbeschichtung Aussagen hinsichtlich der Spezifität der Antikörperbindung getroffen werden, bei unterschiedlich beschichteten Positionen können nur qualitative Aussagen bezüglich der Signalintensität gemacht werden, die jedoch sowohl von der spezifischen Antikörperbindung als auch von der Oberflächenbelegung abhängen kann.

4.2.3.2 Blockversuch mit Butanthiol

Um eine gleichmäßige Oberflächenbeschichtung und damit auch vergleichbare Messungen zu erhalten, wurde ein unfunktionalisiertes Thiol, Butanthiol, als Blockreagenz verwendet. Durch die Belegung der Oberfläche mit Butanthiol sollte die unspezifische Bindung von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) auf der Elektrode verhindert werden und eine Vergleichbarkeit der einzelnen Positionen erreicht werden.

Folglich wurde eine Positivprobe mit Cysteamin, Butanthiol zur Belegung eventuell verbliebener freier Bindungsstellen, Maus IgG (EDC/HOBT) und Anti-Maus IgG (AP) beschichtet und an zwei Positionen mit Butanthiol die unspezifische Bindung von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) bzw. nur von Anti-Maus IgG (AP) untersucht.

Abbildung 40 zeigt die Messung des beschichteten Sensors mit Butanthiol als Blockreagenz bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,47	0,39	17 (100%)
2 (rot)	0,64	0,50	22 (129%)
3 (grün)	1,47	0,67	21 (123%)

Abbildung 40: Summensignal des 3-Positionen-Assays bei *on chip* Kopplung von Cysteamin und Maus IgG (EDC/HOBT) und Blockschrift mit Butanthiol. Überprüfung der Blockwirkung mit Anti-Maus IgG (AP) (Position 2, rot) und Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) (Position 3, grün)

Die Messung in Abbildung 40 zeigt, dass ein unfunctionalisiertes Thiol (Butanthiol) nicht als Blockreagenz geeignet ist. Besonders der Vergleich mit der Messung in Abbildung 39, wo keine unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers auf der Cysteamin-Beschichtung beobachtet wird, belegt diese Aussage, da die unspezifische Bindung von Anti-Maus IgG (AP) auf der Butanthiol-Monolage sogar ein 29% größeres Signal ergibt als die Positivposition.

Weder die Adsorption des Detektionsantikörpers noch die von Maus IgG kann durch die Beschichtung der Elektrodenoberfläche mit Butanthiol verhindert werden, unspezifisch gebundenes Maus IgG zeigt ein 23% größeres Sensorsignal als an die Cysteamin-Monolage gekoppeltes Maus IgG.

Insgesamt sind die Messsignale der Messung in Abbildung 40 höher als die in Abbildung 39 (17 nA bei der Positivposition mit Butanthiol gegenüber 12 nA ohne Butanthiol), was nicht der Erwartung einer größeren Oberflächenbelegung durch das Thiol entspricht.

Offensichtlich bildet Cysteamin aus wässriger Lösung eine dichtere selbstorganisierte Monolage aus als Butanthiol und die anschließende Beschichtung mit einer wässrigen Butanthiol-Lösung führt zu einer teilweisen Ablösung der Cysteamin-Schicht. Eine mögliche Ursache kann die bessere Löslichkeit von Cysteamin in wässriger Lösung sein. Butanthiol ist schlecht löslich in Wasser, was die Selbstorganisation aus der Lösung erschwert, während ein ständiges Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht zwischen der Cysteamin-Monolage und der überstehenden wässrigen Lösung herrscht [45].

Alternative Lösungsmittel wie Ethanol, in denen Butanthiol gut löslich ist, können aufgrund der geringen Oberflächenspannung für die Beschichtung von kleinen Oberflächen wie 200 µm oder 400 µm Interdigitalstrukturen nicht verwendet werden.

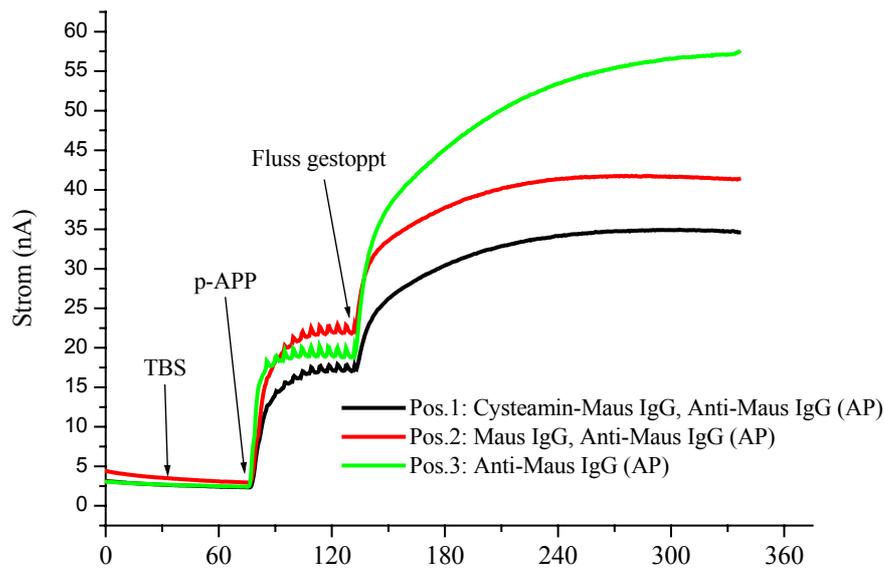
4.2.3.3 Kopplung von Maus IgG und Cysteamin vor der Beschichtung

Eine Möglichkeit, eine definierte Antikörper Beschichtung zu erhalten und dabei die Elektrodenbeschichtung geringer zu halten als bei der Ausbildung einer selbstorganisierten Thiol-Monolage, ist die Kopplung von Cysteamin an Maus IgG vor dem eigentlichen Beschichtungsschritt. Dabei wird Cysteamin mittels Peptidbindung an eine Carboxylfunktion des Antikörpers gekoppelt und dient bei der Beschichtung der Goldoberfläche als eine Art „Anker“. Die Bindung von Maus IgG an Cysteamin erfolgte dabei analog zur *on chip*-Kopplung durch Aktivierung des Antikörpers mit EDC und HOBT und anschließender Zugabe von Cysteamin. Das Kopplungsprodukt wurde mittels einer Sephadex PD-10 Kolonne chromatographisch gereinigt.

Der erhoffte Vorteil dieser Methode gegenüber der *on chip* Kopplung ist wie bereits erwähnt eine geringere Elektrodenbelegung und damit ein höheres Messsignal. Nachteilig ist, dass die Beschichtung weniger definiert ist, als eine selbstorganisierte Monolage.

Anhand eines 3-Positionen-Assays sollte untersucht werden, wie sich ein Cysteamin-gekoppelter Antikörper bei der Beschichtung im Vergleich zur unpezifischen Adsorption von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) verhält.

Abbildung 41 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors mit p-Aminophenylphosphat, in der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung bei Flusstopp, die mittlere Steigung in den ersten 7 Sekunden und der Strom nach 90 Sekunden dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (rot)	1,16	0,74	34 (100%)
2 (grün)	1,89	0,84	41 (120%)
3 (blau)	2,59	0,97	52 (153%)

Abbildung 41: Summensignal des 3-Positionen-Assays mit Cysteamin-Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) bei vorheriger Kopplung von Cysteamin und Maus IgG. Blindproben ohne Maus IgG (Position 2, grün) und Cysteamin (Position 3, blau)

Die Messung in Abbildung 41 zeigt, dass die mit Cysteamin-gekoppeltem Antikörper beschichtete Positivposition, sowohl die Steigung nach Flusstopp betreffend als auch den Strom nach 90 Sekunden, die kleinsten Sensorsignale aufweist. Das größte Messsignal wird durch einfache unspezifische Adsorption des Detektionsantikörpers erreicht und ist 53% höher als das der Positivprobe, gefolgt von der unspezifischen Adsorption von Maus IgG und nachfolgender Reaktion mit Anti-Maus IgG (AP), welches 20% höher ist.

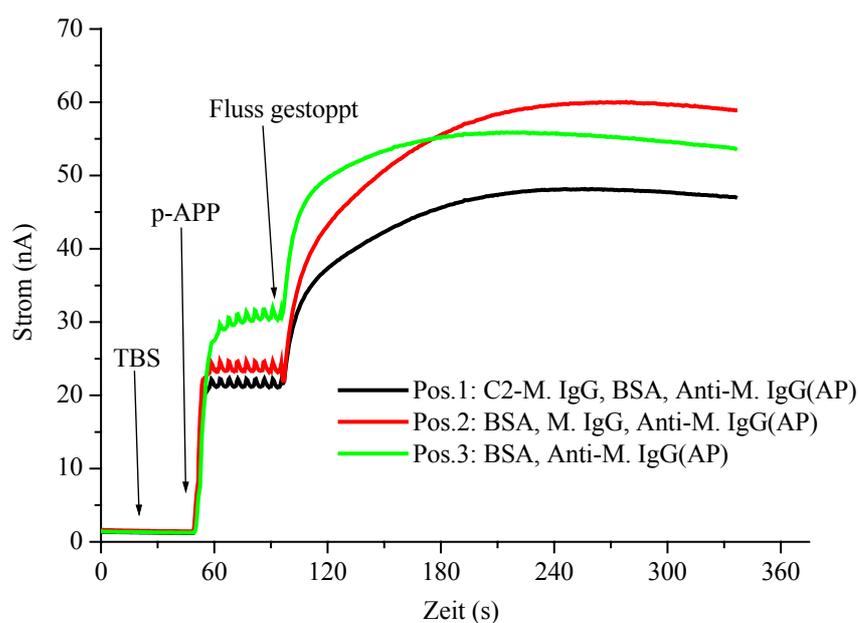
Die Tatsache, dass Maus IgG ohne Kopplung an Cysteamin ein größeres Stromsignal ergibt als die gekoppelte Variante, lässt vermuten, dass durch die chemische Modifizierung des Immunglobulins die Reaktivität gegenüber der unbehandelten Variante herabgesetzt wurde. Die unspezifische Adsorption des Detektionsantikörpers sollte in den nachfolgend beschriebenen Blockversuchen unterdrückt werden.

4.2.3.4 Blockversuche bei der Beschichtung mit Cysteamin-gekoppeltem Maus IgG

BSA:

Zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung des Detektionsantikörpers an der Elektrodenoberfläche wurde BSA als Blockreagenz eingesetzt, welches nach der Bindung von Cysteamin-Maus IgG die freien Bindungsplätze an der Goldoberfläche besetzen und so die Adsorption des Detektionsantikörpers gering halten soll. Zudem wurde überprüft, ob mittels BSA die unspezifische Bindung von Maus IgG an der Elektrode verhindert werden kann.

Die Blockwirkung von BSA zur Unterdrückung der unspezifischen Antikörperbindung wurde anhand eines 3-Positionen-Assays untersucht (Abbildung 42).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (rot)	2,32	1,20	46 (100%)
2 (grün)	3,00	1,60	56 (122%)
3 (blau)	2,54	1,49	55 (120%)

Abbildung 42: Summensignal des 3-Positionen-Assays mit Cysteamin-Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) bei vorheriger Kopplung von Cysteamin und Maus IgG und Blockschrift mit BSA. Blindproben zur Überprüfung der Blockwirkung ohne Maus IgG (Position 2, grün) und Cysteamin (Position 3, blau)

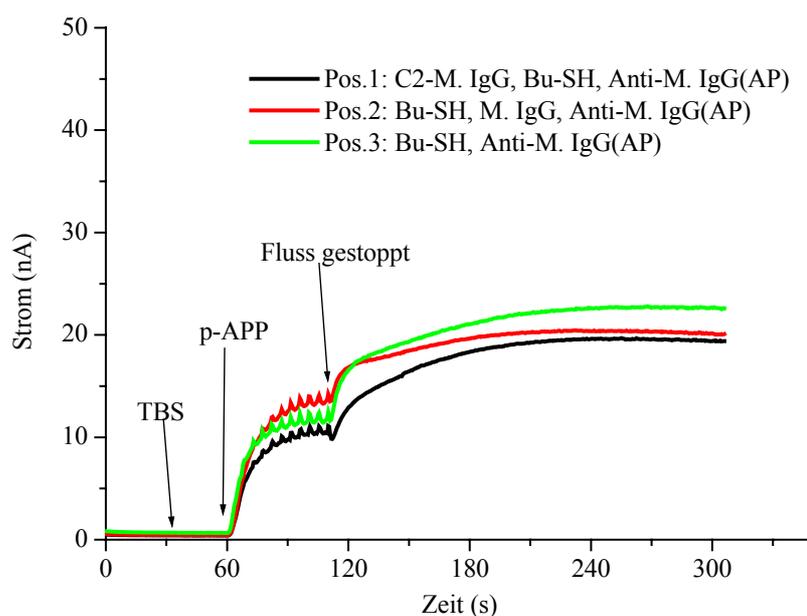
Die Messung in Abbildung 42 zeigt, dass die mit Cysteamin-Maus IgG beschichtete Position trotz Blockschrift mit BSA das kleinste Sensorsignal ergibt, während die Positionen mit unspezifisch gebundenem Maus IgG und Detektionsantikörper bzw. nur Detektionsantikörper um 20-22% größere Messsignale ergeben. Im Vergleich zu der Messung ohne Blockschrift in Abbildung 41 konnte also nur die unspezifische Bindung von Detektionsantikörper geblockt werden, allerdings nur die relativen Messsignale im Vergleich zur Positivprobe betreffend. Insgesamt sind die Sensorsignale wesentlich größer als bei der Messung ohne Blockschrift, was zum einen zeigt, dass die Elektrodenbelegung durch BSA nicht sehr groß sein kann, zum anderen ein weiterer Beleg für die Tatsache ist, dass die Absolutwerte der Stromsignale verschiedener Chips nicht vergleichbar sind.

Butanthiol:

Neben Proteinen wie BSA kommen auch unfunktionalisierte Thiole als Blockreagenzien auf Goldoberflächen in Frage, weshalb Butanthiol zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) eingesetzt werden sollte.

Ebenso wie BSA, was mit seiner kompakten Struktur die freien Bindungsstellen zwischen den an der Oberfläche gebundenen Antikörpern belegen sollte, kann auch das kleine Butanthiol-Molekül durch Ausbildung von Schwefel-Gold-Bindungen freie Elektrodenoberfläche belegen. Anhand eines 3-Positionen-Assays wurde überprüft, wie die Blockeigenschaften von Butanthiol gegenüber der unspezifischen Antikörper-Adsorption an der Goldoberfläche sind.

Abbildung 43 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors mit p-Aminophenylphosphat. In der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flussstop dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (rot)	0,53	0,38	19 (100%)
2 (grün)	0,76	0,36	20 (105%)
3 (blau)	1,01	0,53	22 (116%)

Abbildung 43: Summensignal des 3-Positionen-Assays mit Cysteamin-Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) bei vorheriger Kopplung von Cysteamin und Maus IgG und Blockschritt mit Butanthiol. Überprüfung der Blockwirkung mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) (Position 2, grün) und Anti-Maus IgG (AP) (Position 3, blau).

Auffällig bei der Messung in Abbildung 43 sind vor allem die insgesamt kleineren Sensorsignale von rund 20 nA im Vergleich zu 40-50 nA bei den Messungen ohne Blockschritt bzw. mit BSA-Blockschritt, was auf eine stärkere Elektrodenbelegung durch das Thiol im Vergleich zu den Proteinbeschichtungen schließen lässt.

Das Sensorsignal der Positivprobe ist dabei, ebenso wie bei den Messungen zuvor, am geringsten, wobei die unspezifischen Bindungen von Fänger- und Detektionsantikörper nur noch 5% und 16% größere Messsignale ergeben gegenüber bis zu 50% größeren Signalen bei den Messungen zuvor.

Da jedoch keine Differenzierung zwischen Positiv- und Negativprobe in Form eines Positiv- und eines Negativsignals zu erkennen ist und zudem die Elektrodenbelegung durch Butanthiol recht groß ist, stellt diese Beschichtung zur Entwicklung eines Biosensors nicht die Methode der Wahl dar.

4.2.3.5 Diskussion

Die Immobilisierung von Maus IgG mittels Ausbildung einer Cysteamin-Monolage und anschließender *on chip*-Kopplung des Antikörpers an die Aminfunktion des Cysteamins hat den Vorteil, dass unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers auf der Cysteamin Monolage keine Rolle spielen und dadurch eine sehr gute Differenzierbarkeit zwischen Positivsignal und Negativsignal möglich ist, sofern beide Positionen mit Cysteamin beschichtet sind (Abbildung 39 in Kapitel 4.2.3.1 schwarze und rote Kurve). Nachteilig ist jedoch, dass die Elektrodenbelegung recht groß ist und das messbare Sensorsignal im Vergleich zu einer Position mit unspezifisch an der Oberfläche adsorbiertem Antikörper sehr klein ist.

Da ein wesentliches Ziel bei der Entwicklung eines biologischen Testdesigns neben der guten Differenzierbarkeit der Positiv- und Negativsignale die Optimierung der Signalintensität ist, wurde durch vorherige Kopplung von Maus IgG und Cysteamin versucht, größere Messsignale bei gleicher Differenzierbarkeit zu erhalten.

Durch die vorherige Kopplung von Maus IgG und Cysteamin konnten etwa 7 mal größere Stromsignale gemessen werden als durch die *on chip*-Kopplung, eine Differenzierbarkeit der Positivprobe gegenüber den unspezifischen Antikörperbindungen konnte jedoch auch durch den Einsatz von Blockreagenzien nicht erreicht werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die unspezifische Antikörperadsorption auf der Goldelektrode durch die wesentlich geringere Elektrodenbelegung zu deutlich größeren Sensorsignalen führt als mittels Cysteamin-Monolage immobilisierte Antikörper, wenn auch die Differenzierbarkeit schlechter ist. Weiterhin konnte von den untersuchten Beschichtungen nur durch die Ausbildung einer Cysteamin-Monolage die ungewollte Bindung von Detektionsantikörper verhindert werden.

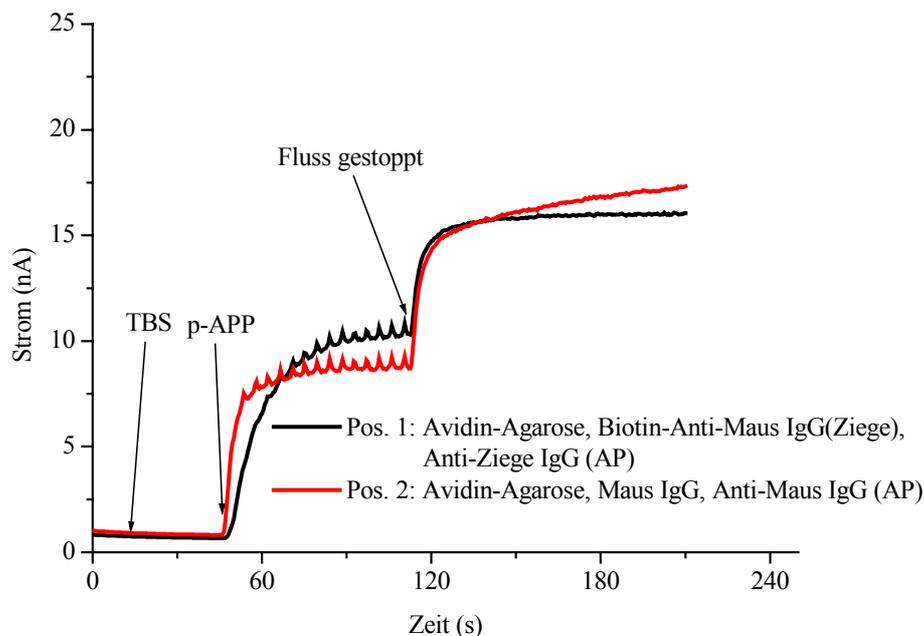
In weiteren Versuchen sollte folglich das Ziel sein, ein System zu finden, bei welchem die unspezifischen Bindungen ebenso gut wie mit einer Cysteamin-Monolage unterdrückt werden können und zudem hohe Sensorsignale gemessen werden können, die Elektrodenbelegung also recht gering ist.

4.2.4 Immobilisierung mittels Avidin-Biotin

Die Immobilisierung von Antikörpern mittels Avidin-Biotin-Technologie beruht auf der Adsorption des Proteins Avidin auf der Goldelektrodenoberfläche und anschließender spezifischer Bindung eines biotinylierten Antikörpers durch Ausbildung eines Avidin-Biotin-Affinitätskomplexes (Kapitel 2.3.3). Durch die Belegung der Oberfläche mit Avidin soll eine definierte Oberfläche geschaffen werden, auf der sich unspezifische Antikörperbindungen blocken lassen und spezifische Bindungen ein hohes Messsignal ergeben.

4.2.4.1 Versuch ohne Blockschritt

Anhand eines 2-Positionen Assays wurde untersucht, wie sich die mit Avidin-Agarose beschichtete Goldoberfläche gegenüber der Bindung von biotinyliertem und nicht modifiziertem Antikörper verhält. Beide Positionen wurden mit Avidin-Agarose belegt, die erste mit biotinyliertem Antikörper und entsprechendem Detektionsantikörper, die zweite mit unbehandeltem Antikörper und Detektionsantikörper (Abbildung 44).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	1,46	0,51	16 (100%)
2 (rot)	1,74	0,66	17 (106%)

Abbildung 44: Summensignal des 2-Positionen-Assays mit Avidin-Agarose, Biotin-Anti-Maus IgG (Ziege) und Anti-Ziege IgG (AP) (Position 1, schwarz) bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Überprüfung der Spezifität der Biotin-Avidin-Bindung mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) (Position 2, rot)

Die Messung in Abbildung 44 zeigt, dass auch bei der Beschichtung des Sensors mit Avidin-Agarose keine Differenzierung zwischen der Positivprobe mit biotinyliertem, d.h. spezifisch gebundenem Antikörper (schwarz, 100%) und der unspezifischen Bindung von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) (rot, 106%) möglich ist. Unabhängig davon, ob der Antikörper durch Biotinylierung einen Affinitätskomplex ausbilden kann oder ob er einfach unspezifisch an der Proteinschicht adsorbiert, ist die Anzahl an gebundenen Antikörpern etwa gleich.

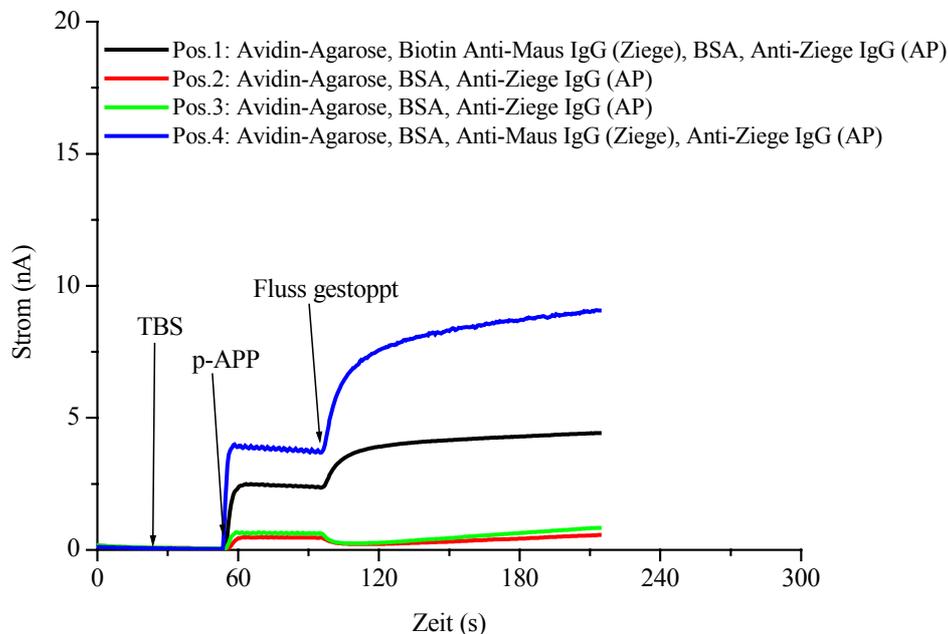
Insgesamt sind die Sensorsignale zudem mit unter 20 nA für eine 400 µm Struktur recht klein, was, ebenso wie die Bildung eines „Plateaus“ in der Messkurve, für eine relativ dichte Elektrodenbelegung durch Avidin-Agarose spricht und bereits in Kapitel 4.1.1.8 beobachtet wurde.

4.2.4.2 Versuch mit BSA Blockschrift

Nachdem bei der Immobilisierung mittels Avidin-Biotin-System ohne Blockschrift keine Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung möglich war, wurde mit einem BSA-Blockschrift versucht, die unspezifische Antikörperbindung auf der Avidin-Agarose-Schicht zu unterdrücken.

Zur Überprüfung der Spezifität einer Avidin-Biotin-Beschichtung mit BSA als Blockreagenz, wurden 4 Positionen beschichtet, wovon die Positivprobe mit Avidin-Agarose, Biotin-gebundenem Antikörper, Blockreagenz und Detektionsantikörper belegt wurde. Die anderen Positionen wurden nach der Grundbeschichtung mit Avidin-Agarose mit Blockreagenz beschichtet und anschliessend mit unbiotinyliertem Antikörper und Detektionsantikörper bzw. sofort mit Detektionsantikörper, um die unspezifische Bindung der Antikörper auf der geblockten Oberfläche zu untersuchen.

Abbildung 45 zeigt die Summensignale des mit Avidin-Biotin-System beschichteten Sensors mit BSA-Blockschritt bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat, der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und der Strom 90 Sekunden nach Flusstopp zu entnehmen.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,20	0,12	4,3 (100%)
2 (rot)	-0,05	-0,02	0,5 (11%)
3 (grün)	-0,09	-0,02	0,7 (16%)
4 (blau)	0,47	0,28	8,8 (205%)

Abbildung 45: Summensignal des 4-Positionen-Assays mit Avidin-Biotin-System und BSA mit 200 μ m Strukturen bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) stellt die Positivprobe dar, Position 2 und 3 zeigen die Blockwirkung von BSA gegenüber Anti-Ziege IgG (AP) und Position 4 die Blockwirkung gegenüber Anti-Maus IgG (Ziege)

Die Messung in Abbildung 45 zeigt, dass die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers Anti-Ziege IgG (AP) auf einer Avidin-Agarose-beschichteten Elektrode sehr gut mittels BSA geblockt werden kann (grüne und rote Kurve). Dagegen wird eine starke unspezifische Adsorption des unbiotinylierten Anti-Maus IgG beobachtet (blaue Kurve), was ein mehr als doppelt so großes Sensorsignal ergibt als die Positivprobe mit biotinyliertem Antikörper (schwarze Kurve).

Die absolute Signalintensität kann mit den vorherigen Messungen schwer verglichen werden, da es sich bei den verwendeten Interdigitalstrukturen nicht wie zuvor um 400 μ m Strukturen

sondern um 200µm Strukturen handelt. Unter Berücksichtigung des Ergebnisses aus Kapitel 4.1.1.1, wo gezeigt wurde, dass die Verdopplung des Durchmessers der Interdigitalstruktur zu einer Vervierfachung des Sensorsignals führt, ergibt sich für die Positivprobe mit $4 \cdot 4,3 \text{ nA} = 17,2 \text{ nA}$ eine Signalintensität, deren Größenordnung sehr gut mit dem Messsignal der vorher gezeigten Messung ohne Blockschrift vergleichbar ist.

4.2.4.3 Diskussion

Die Immobilisierung des Fängerantikörpers mittels Avidin-Biotin-Technologie ermöglicht bei Einsatz von BSA als Blockreagenz eine gute Differenzierbarkeit zwischen Positivprobe und unspezifischer Bindung von Detektionsantikörper, welche fast vollständig unterdrückt werden kann.

Dagegen wird eine starke unspezifische Wechselwirkung zwischen der Avidin-Agarose-beschichteten Oberfläche und nicht-biotinyliertem Antikörper beobachtet, welche auch durch den Einsatz von Blockreagenz nicht verhindert werden kann. Diese unspezifischen Bindungen, deren Signalintensität die der Positivprobe mit biotinyliertem Antikörper um mehr als das Doppelte übersteigen, sowie die starke Elektrodenbelegung durch Avidin-Agarose (Kapitel 4.1.1.8) zeigen, dass diese Beschichtungstechnologie für die gewählte Auslesemethode nicht das Optimum darstellt.

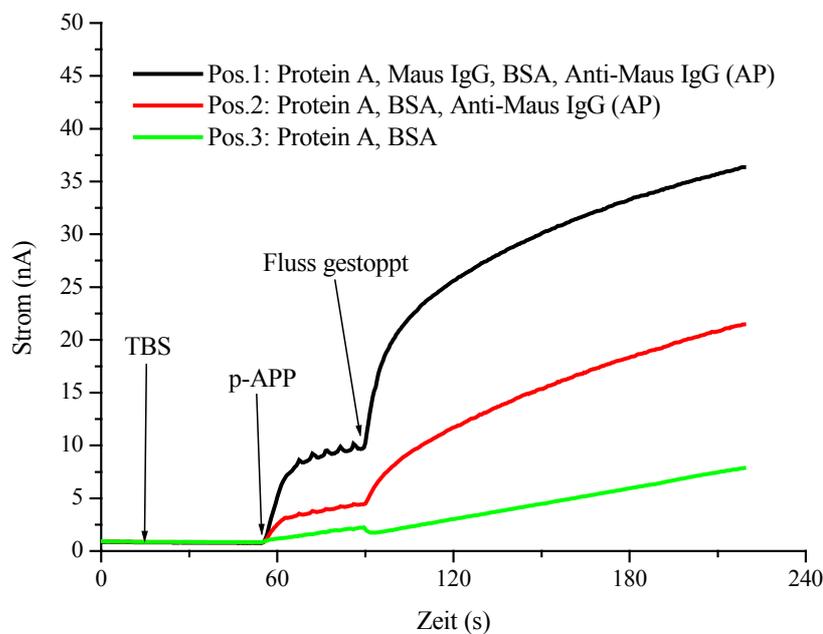
4.2.5 Versuche zur Immobilisierung mittels Protein A, G und G'

Ähnlich wie die Immobilisierung des Antikörpers mittels Avidin-Biotin-Technologie beruht auch die Immobilisierung des Fängerantikörpers mit Protein A, G oder G' zunächst auf der Adsorption des jeweiligen Proteins auf der Elektrodenoberfläche und anschließender Antikörperbindung. Da diese Proteine eine besondere Spezifität für die Fc-Region der Immunglobuline aufweisen, erfolgt die Bindung der Antikörper auf der Proteinschicht spezifisch, gerichtet und ohne jegliche Modifizierung des zu immobilisierenden Antikörpers (Kapitel 2.3.4). Da nicht nur Fängerantikörper durch die Proteinschicht gebunden werden sondern in gleicher Weise auch Detektionsantikörper, ist bei dieser Beschichtungstechnologie ein Blockschrift zur Vermeidung der direkten Bindung des Detektionsantikörpers auf dem Protein zwingend notwendig.

4.2.5.1 Protein A mit BSA als Blockreagenz

Anhand eines 3-Positionen-Assays wurden zunächst die Eigenschaften von Protein A zur Immobilisierung des Fängerantikörpers unter Verwendung von BSA als Blockreagenz untersucht.

Die Positivprobe wurde mit Protein A, Maus IgG, BSA und Anti-Maus IgG (AP) beschichtet. Zur Überprüfung der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP) wurde eine Position nach der Protein A-Beschichtung mit BSA und anschließend mit Detektionsantikörper belegt, die dritte Position wurde nur mit Protein A und BSA beschichtet (Abbildung 46).

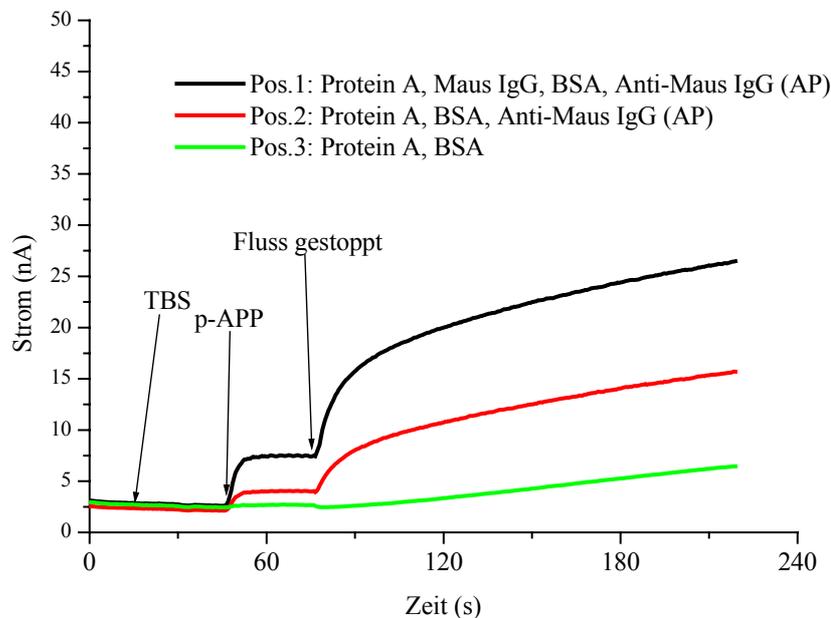


Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	1,89	1,23	33 (100%)
2 (rot)	0,55	0,40	18 (55%)
3 (grün)	-0,31	0,04	6 (18%)

Abbildung 46: Summensignal des 3-Positionen Assays mit Protein A und BSA bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt die Positivprobe mit Maus IgG und Anit-Maus IgG (AP), Position 2 zeigt die Blockwirkung von BSA gegenüber der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP). Position 3 ist nur mit Protein A und BSA belegt

Die Messung in Abbildung 46 zeigt, dass das Sensorsignal der Positivposition (schwarz) 90 Sekunden nach Flussstop nahezu doppelt so hoch ist wie das von Position 2 mit Blockreagenz und unspezifisch gebundenem Detektionsantikörper (rot). An Position 3 ist zu erkennen, dass 18% des Positivsignal bereits durch den Transport von freigesetztem p-Aminophenol innerhalb der Messzelle gemessen werden können.

Da die Messsignale neben der guten Differenzierbarkeit von Positiv- und Negativprobe zudem mit 33 nA des Positivsignals recht hohe Intensitäten aufweisen, wurden in weiteren Versuchen die Eigenschaften der Protein A-Immobilisierung sehr ausführlich charakterisiert. Zunächst wurde ein erster Test zur Reproduzierbarkeit der Messung gemacht und derselbe 3-Positionen-Assay nochmals getestet (Abbildung 47).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	1,51	0,86	24 (100%)
2 (rot)	0,56	0,40	13 (54%)
3 (grün)	-0,13	-0,01	5 (21%)

Abbildung 47: Summensignal der zweiten Messung eines 3-Positionen-Assays mit Protein A und BSA bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt die Positivprobe mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP), Position 2 zeigt die Blockwirkung von BSA gegenüber der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP). Position 3 ist nur mit Protein A und BSA belegt

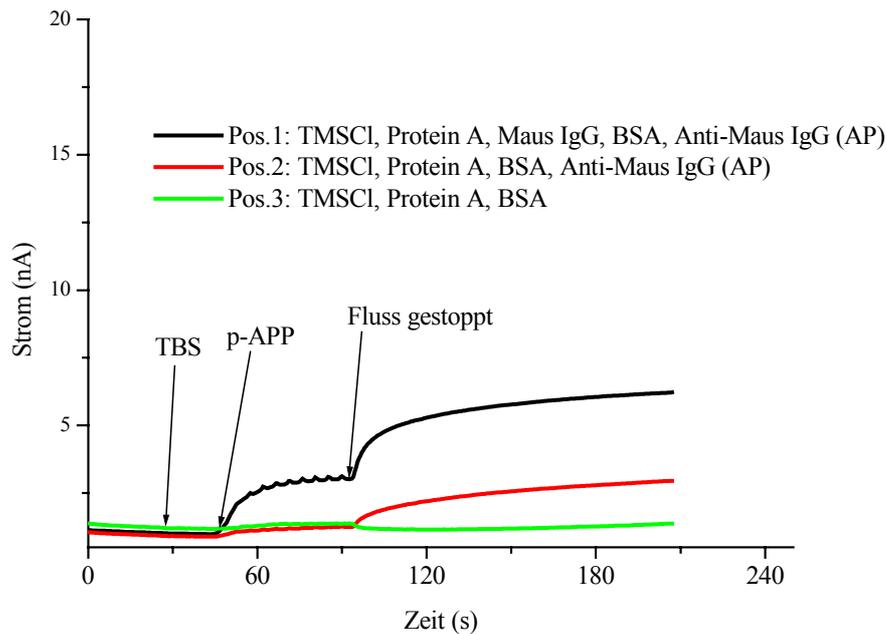
In Abbildung 47 ist zunächst zu erkennen, dass die Signalintensitäten bei der zweiten Messung geringer sind als bei der ersten Messung, die Positivposition ergibt ein Signal 90 Sekunden nach Flusstopp von 24 nA gegenüber 33 nA bei der ersten Messung. Die Kurvenform bei beiden Messungen ist ähnlich, der Anstieg in den ersten 7 Sekunden nach Flusstopp entspricht bei Positivprobe und unspezifischer Bindung zwischen 50 und 70% des Maximalwertes. Das Auftreten eines Plateaus wird also nicht beobachtet.

Zudem zeigt der Vergleich beider Messungen, dass die prozentuale Beurteilung der Stromsignale eine recht gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht, während die Absolutwerte recht unterschiedlich sind. So ergeben beide Sensorchips bei einem festgelegten Wert von 100% für die Positivprobe noch 54% und 55% der Intensität an den Negativpositionen und 18% und 21% an den Blindpositionen. Der im Rahmen der p-Aminophenol-Messungen ermittelte Messfehler liegt bei etwa 5%-10%, so dass dieses Ergebnis eine sehr gute Übereinstimmung beider Messungen dokumentiert.

4.2.5.2 Protein A mit BSA als Blockreagenz, Chip vorher silanisiert

Da es sich bei den verwendeten Chips um Siliziumchips mit aufgedampften Goldelektroden handelt, sollte überprüft werden, ob eventuell auch unspezifische Bindungen des Antikörpers zwischen den Goldelektroden auf der Silizium- bzw. Siliziumoxidschicht zu beobachten sind. Die Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Siliziumoxid Oberfläche sind vor allem polarer Natur, deshalb wurde durch Einsatz von TMSCl als Silanisierungsreagenz versucht, eine unpolare Oberflächenbeschichtung zwischen den Elektrodenfingern zu schaffen.

Abbildung 48 zeigt die Summensignale des beschichteten silanisierten Sensors bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat, in der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flusstopp dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,36	0,18	6,1 (100%)
2 (rot)	0,12	0,06	2,8 (46%)
3 (grün)	-0,06	-0,02	1,3 (21%)

Abbildung 48: Summensignal des 3-Positionen-Assays mit TMSCl, Protein A und BSA bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt die Positivprobe mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP), Position 2 zeigt die Blockwirkung von BSA gegenüber der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP). Position 3 ist nur mit Protein A und BSA belegt

In Abbildung 48 fällt zunächst auf, dass durch die Silanisierung des Chips vor der Beschichtung die Signalintensität stark zurückgegangen ist. Gegenüber 33nA und 24nA der Positivproben ohne Silanisierung des Chips ist das Signal um fast 80% auf 6nA gesunken.

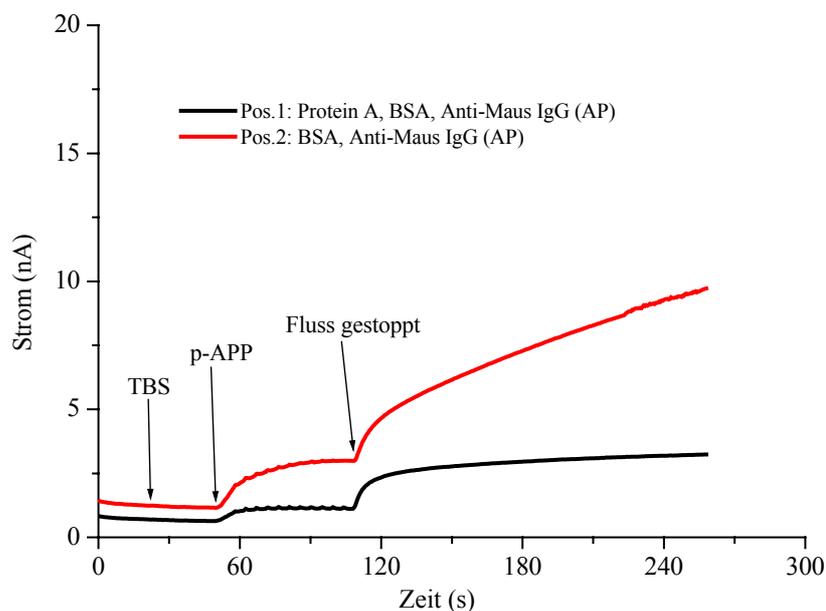
Die Negativposition zeigt mit 46% der Signalintensität des Positivsignals einen etwas geringeren Wert als bei den Messungen zuvor, was ein Hinweis auf eine Blockwirkung von TMSCl zwischen den Elektroden sein kann, jedoch möglicherweise auch in dem „normalen“ Messfehler begründet sein kann.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Silanisierung des Chips vor der Beschichtung eine starke Verringerung des Sensorsignals verursacht, sei es aufgrund einer Blockwirkung zwischen den Elektrodenfingern oder aufgrund einer geringeren Elektrodenaktivität der Goldelektroden nach der Beschichtung. Die Differenzierbarkeit zwischen Positiv- und Negativposition verbessert sich nicht entscheidend, also scheint eine eventuelle Beschichtung

zwischen den Elektrodenfingern in gleichem Maße durch Protein A, Fängerantikörper und Detektionsantikörper stattzufinden. Da der erwünschte Effekt einer gezielten Unterdrückung unspezifischer Antikörperbindung ausblieb und das Sensorsignal zudem sehr stark abgenommen hat, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

4.2.5.3 Vergleich der Blockwirkung von BSA gegenüber dem Detektionsantikörper mit und ohne Protein A

Bei den zuvor gezeigten Immobilisierungsversuchen mit Cysteamin und Avidin-Agarose haben Blockversuche gegenüber Anti-Maus IgG (AP) mit BSA meist nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt. Aus diesem Grund sollte mittels eines 2-Positionen-Assays untersucht werden, ob BSA auch ohne Protein A-Layer direkt die Goldoberfläche blocken kann und so die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers auf der Elektrodenoberfläche verhindern kann oder die Blockwirkung von der Existenz einer Protein A-Schicht abhängig ist (Abbildung 49).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,26	0,12	3,1 (40%)
2 (rot)	0,25	0,20	7,9 (100%)

Abbildung 49: Summensignale des 2-Positionen-Assays bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt die Blockwirkung von BSA mit Protein A-Beschichtung im Gegensatz zu Position 2 (rot) ohne Protein A-Schicht

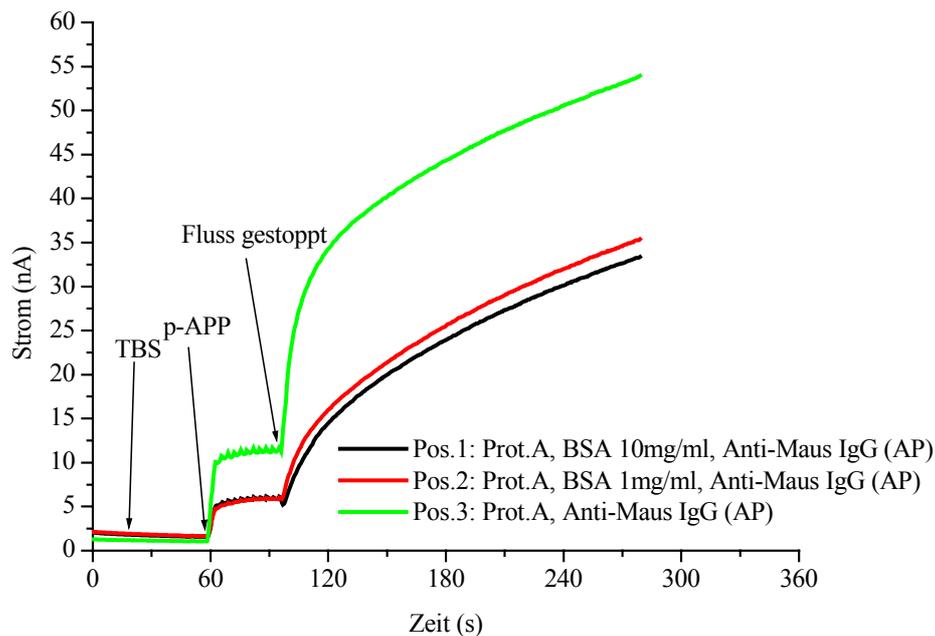
In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass das Sensorsignal mit Protein A-Layer, BSA und Detektionsantikörper nur 40% des Signals ohne Protein A-Beschichtung beträgt. Da Protein A, wie in Kapitel 4.1.1.8 gezeigt, durch eine relativ geringe Elektrodenbelegung das Sensorsignal nur um 25% gegenüber dem unbeschichteten Sensor verringert, kann die größere Elektrodenbelegung nicht der Grund für das wesentlich geringere Sensorsignal mit Protein A-Grundbeschichtung sein. Offensichtlich ist die Blockwirkung von BSA auf der polaren Protein A-Schicht besser als auf der unpolaren Goldoberfläche. Das Ergebnis überrascht, sollte BSA eigentlich mit seinem größeren S-Gehalt als Protein A und der größeren Elektrodenbelegung gegenüber Protein A (Kapitel 4.1.1.8) eigentlich die Goldoberfläche gegen unspezifische Bindungen nicht wesentlich schlechter schützen als Protein A und BSA zusammen. Anscheinend ist die Blockeigenschaft von BSA jedoch nur in Kombination mit der Protein A-Beschichtung gegenüber Anti-Maus IgG (AP) wirksam. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass BSA an die Albumin-spezifischen Bindungsstellen des Protein A besser bindet als direkt an die Goldoberfläche und so auch die Bindung von Detektionsantikörper auf einer Protein A-Oberfläche besser blocken kann.

4.2.5.4 Konzentrationsabhängigkeit des BSA-Blockschritts

Als nächster Schritt sollte überprüft werden, wie stark die Bindung des Detektionsantikörpers auf der Protein A-Beschichtung ohne BSA-Blockschritt ist und ob die Änderung der Konzentration von BSA einen Unterschied im Sensorsignal bewirkt.

Anhand eines 3-Positionen-Assays wurde der Unterschied zwischen zwei Konzentrationen an BSA und einer Position ohne BSA-Blockschritt untersucht.

Abbildung 50 zeigt die Summensignale des beschichteten Sensors bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flusstop zu entnehmen.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,66	0,54	25 (54%)
2 (rot)	0,90	0,68	26 (57%)
3 (grün)	3,17	1,81	45 (100%)

Abbildung 50: Summensignale des 3-Positionen-Assays bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Positionen 1 (schwarz) und 2 (rot) sind mit Protein A, unterschiedlichen Konzentrationen an BSA und Detektionsantikörper belegt, Position 3 (grün) trägt nur Protein A und Detektionsantikörper

Die Messung in Abbildung 50 zeigt, dass durch den Einsatz von BSA als Blockreagenz nur noch 54%-57% des Sensorsignals gemessen werden können, also etwa die Hälfte der Antikörperbindungen auf der Protein A-Schicht durch BSA unterdrückt wird.

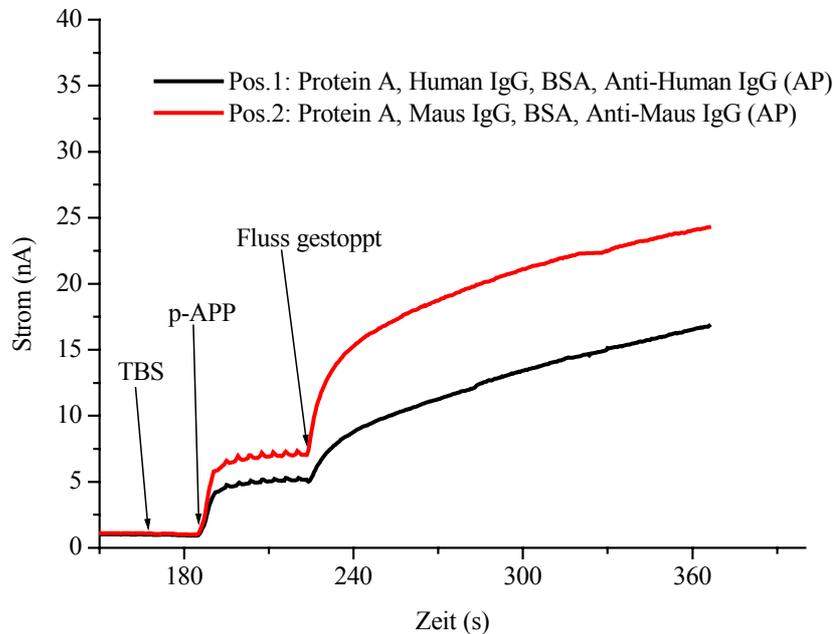
Dabei beträgt der Unterschied im Sensorsignal zwischen einer Konzentration von 1mg/ml BSA und 10 mg/ml nur 3 nA und ist im Rahmen der Messungenauigkeit zu vernachlässigen.

Nachfolgend wurde für die Blockschritte mit BSA meist weiterhin eine Konzentration von 1mg/ml eingesetzt.

4.2.5.5 Abhängigkeit des Sensorsignals von der antikörperproduzierenden Spezies

Anhand von Human IgG und Anti-Human IgG (AP) sollte untersucht werden, ob die Variation der antikörperproduzierenden Spezies zu denselben Messergebnissen führt wie Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP).

Ein 2-Positionen-Assay mit beiden Antikörper-Pärchen wurde durchgeführt und überprüft, inwiefern sich die Sensorsignale beider Positionen unterscheiden (Abbildung 51).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,44	0,33	14 (64%)
2 (rot)	1,32	0,72	22 (100%)

Abbildung 51: Summensignale des 2-Positionen-Assays bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt das Signal bei Beschichtung mit Human IgG und Anti-Human IgG (AP), Position 2 (rot) ist mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) belegt.

Die Sensorsignale in Abbildung 51 zeigen, dass Human IgG und Anti-Human IgG (AP) bei der Immobilisierung mit Protein A im Vergleich zu Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) ein um ein Drittel geringeres Messsignal ergeben.

Die Ursache für diese Beobachtung ist wahrscheinlich die unterschiedliche Bindungsfähigkeit von Protein A gegenüber den verschiedenen Immunglobulin-Unterklassen der antikörperproduzierenden Spezies.

Human Immunglobulin G setzt sich aus IgG1 - IgG4 zusammen, wobei IgG1, IgG2 und IgG4 von Protein A sehr gut gebunden werden und IgG3 schlecht.

Maus Immunglobulin G besteht aus den Unterklassen IgG1, IgG2a und IgG2b, sowie IgG3. IgG1 bindet schlecht an Protein A, IgG2a sehr gut, IgG2b gut und IgG3 mäßig [57-60].

Die prozentuale Zusammensetzung der im Rahmen der Untersuchung verwendeten, kommerziell erworbenen Seren ist nicht genau bekannt.

Eine mögliche Erklärung für das deutlich geringere Messsignal von Human IgG könnte sein, dass die Maus IgG Subklassen mit hoher Bindungsfähigkeit gegenüber Protein A in großem Maße im Serum vorhanden sind, während das Human IgG größere Anteile an wenig bindendem Human IgG3 enthält.

Das Messergebnis macht deutlich, dass Protein A bei der Verwendung verschiedener Antikörper deutliche Unterschiede in den Immobilisierungseigenschaften aufweist. Selbst bei Einsatz von „Maus IgG“ oder „Human IgG“ kann die Vergleichbarkeit zweier Messungen nur gewährleistet sein, wenn dasselbe Serum verwendet wurde, da die polyklonalen Antikörper sonst durch unterschiedliche Verteilung der Subklassen unterschiedliche Bindungseigenschaften an Protein A zeigen können. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind also nur mit den verwendeten Antikörpern reproduzierbar, für jeden anderen Fängerantikörper als das eingesetzte Maus IgG müssen neue Tests durchgeführt werden.

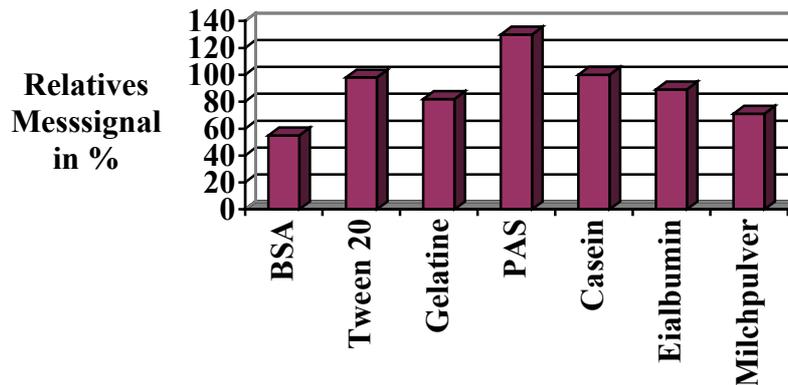
4.2.5.6 Protein A mit verschiedenen Blockreagenzien

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob andere Blockreagenzien eine bessere Blockwirkung gegenüber dem Detektionsantikörper auf der Protein A-Schicht aufweisen als BSA.

Dabei wurden Reagenzien verschiedener Substanzklassen und Strukturen eingesetzt: Globuläre Proteine wie BSA, Eialbumin, Casein und Milchpulver, das stäbchenförmige Skleroprotein Gelatine sowie das Tensid Tween 20 und die polare Polyacrylsäure.

Zunächst wurden 3-Positionen-Assays mit Tween 20, Gelatine und Polyacrylsäure analog zu dem mit BSA in Kapitel 4.2.5.1 beschriebenen Test durchgeführt, anschließend wurden Casein, Eialbumin und Milchpulver auf einem Chip im Vergleich zu BSA untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 zusammengefasst, die Grafik gibt die prozentualen Messsignale der mit den angegebenen Reagenzien geblockten Negativpositionen (Protein A, Blockreagenz, Detektionsantikörper) im Vergleich zu der jeweiligen Positivposition (Protein A, Fängerantikörper, Blockreagenz, Detektionsantikörper) auf dem Chip wieder.



BSA (bovine serum albumin): Rinderserumprotein, schwefelhaltig, wasserlöslich

Tween 20: Tensid auf Polyoxyethylen-Basis

Gelatine: Skleroprotein, kolloide Substanz, wasserunlöslich

PAS (Polyacrylsäure): synthetisches, polares Polymer

Casein: Milcheiweiß

Eialbumin: Protein aus dem Hühnerei

Milchpulver: Trockenbestandteil der Milch aus Proteinen und Lactose

Abbildung 52: Übersicht der prozentualen Messsignale der mit Protein A, Blockreagenz und Detektionsantikörper beschichteten Negativpositionen im Vergleich zu den jeweiligen Positivpositionen

Auffällig in Abbildung 52 ist, dass der mit Polyacrylsäure geblockte Chip an der Negativposition sogar ein größeres Sensorsignal aufweist als an der Positivposition, es scheint, als würde die Antikörperbindungsstelle des Fängerantikörpers geblockt anstelle der Protein A-Bindungsstellen. Tween 20 und Casein zeigen nahezu keine Blockwirkung, das Negativsignal beträgt fast 100% des Positivsignals. Eialbumin, Gelatine und Milchpulver zeigen eine mäßige Blockwirkung mit Sensorsignalen, die 90-70% des Positivsignals betragen.

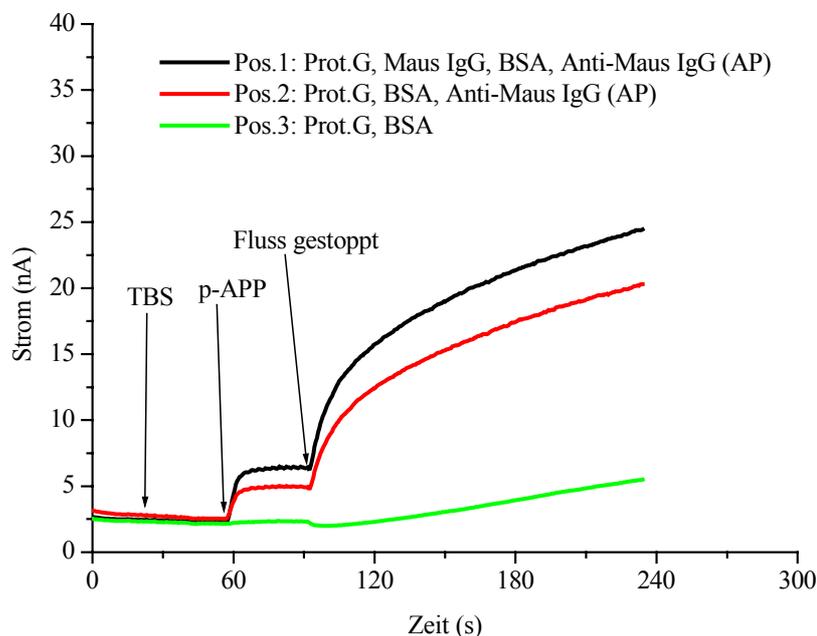
Nach den in Abbildung 52 gezeigten Erkenntnissen ist BSA von den untersuchten Reagenzien das Blockreagenz der Wahl, da es etwa die Hälfte der Bindungen des Detektionsantikörpers an Protein A unterdrückt (Negativsignal entspricht etwa 55% des Positivsignals), also von den getesteten Substanzen die beste Differenzierung zwischen Positiv- und Negativprobe ermöglicht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Kapitel 4.1.1.8 zeigt sich zudem, dass BSA von den schwefelhaltigen Protein-Blockreagenzien mit 47% relativem Messsignal nach der Beschichtung die geringste Elektrodenbelegung aufweist und dadurch bei guter Blockwirkung auch hohe Signalintensitäten ermöglicht.

4.2.5.7 Protein G und Protein G' mit BSA als Blockreagenz

Nachdem die Immobilisierung von Maus IgG mit Protein A und verschiedenen Blockreagenzien untersucht wurde und zudem festgestellt wurde, dass die Messsignale auch von der Wahl des Antikörpers abhängig sind, sollte geprüft werden, wie die Eigenschaften der Proteine G und G' bei der Immobilisierung von Maus IgG sind (Kapitel 2.3.4). Im Vergleich zu Protein A sollten Protein G und G' Maus IgG laut Literatur [61-64] noch besser binden, da diese auch die Subklassen Maus IgG1 sehr gut und Maus IgG3 gut binden, welche von Protein A schlecht bzw. mäßig gebunden werden.

Ein 3-Positionen-Assay mit BSA als Blockreagenz, sollte zeigen, wie sich die Sensorsignale des mit Protein G beschichteten Sensors im Vergleich zu den zuvor gezeigten Versuchen mit Protein A verhält.

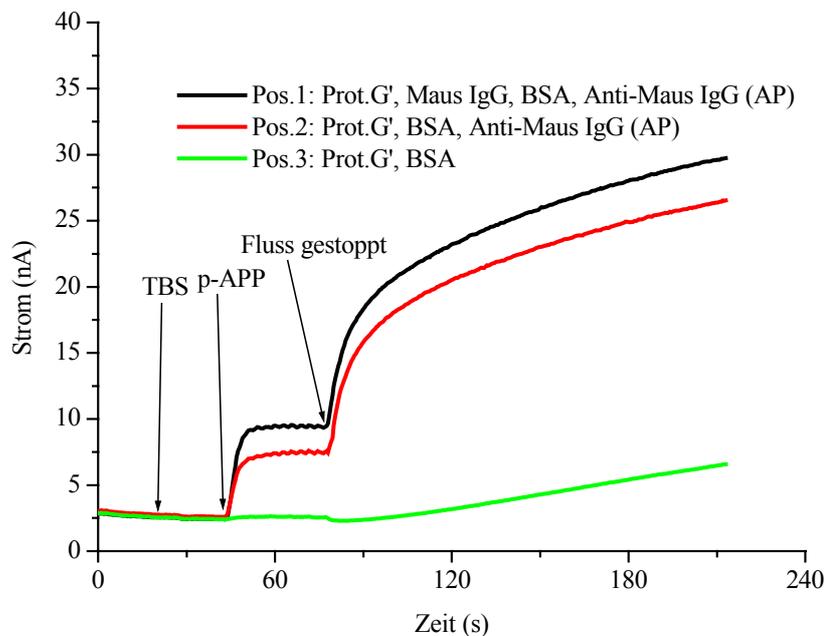
Nachfolgende Abbildung zeigt die Messsignale des mit Protein G beschichteten und mit BSA geblockten Sensors bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. In der Tabelle sind die Messwerte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flussstop dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,89	0,67	22 (100%)
2 (rot)	0,69	0,51	18 (82%)
3 (grün)	-0,14	-0,03	4 (18%)

Abbildung 53: Summensignale des 3-Positionen-Assays mit Protein G, Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) und BSA als Blockreagenz bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) ist mit Protein G, Maus IgG, BSA und Anti-Maus IgG (AP) belegt, Position 2 (rot) zeigt die Blockwirkung von BSA gegenüber der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP) auf Protein G. Position 3 (grün) trägt nur Protein G und BSA

Analog zu den durchgeführten Tests mit Protein A und Protein G wurde auch ein 3-Positionen-Assay mit Protein G' als Immobilisierungsprotein durchgeführt (Abbildung 53).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	1,49	0,97	27 (100%)
2 (rot)	1,69	0,91	24 (89%)
3 (grün)	-0,13	-0,03	5 (19%)

Abbildung 54: Summensignale des 3-Positionen-Assays mit Protein G', Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) und BSA als Blockreagenz bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) ist mit Protein G', Maus IgG, BSA und Anti-Maus IgG (AP) belegt, Position 2 (rot) zeigt die Blockwirkung von BSA gegenüber der unspezifischen Bindung von Anti-Maus IgG (AP) auf Protein G'. Position 3 (grün) trägt nur Protein G' und BSA

Die Messung in Abbildung 53 zeigt, dass die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers auf der Protein G-beschichteten Elektrodenoberfläche durch BSA schlechter geblockt werden kann als auf einer Protein A-beschichteten Goldoberfläche. Das Sensorsignal der Negativposition beträgt bei Protein G und BSA 82% des Positivsignals, während es bei Protein A wie vorher gezeigt bei nur 55% lag.

Ähnliche Beobachtungen können bei der Messung in Abbildung 54 gemacht werden. Das Negativsignal des 3-Positionen-Assays mit Protein G' als Immobilisierungsprotein liegt bei 89% des Positivsignals.

Auf der Suche nach einer Erklärung für diese Beobachtungen stellte sich heraus, dass es sich bei dem verwendeten Protein G der Firma Sigma um eine rekombinante Form handelt, bei der die in der natürlichen Form vorhandene Albumin-Affinität reduziert wurde, um die in den meisten Anwendungen ungewünschte Bindung von Albumin zu verhindern [64]. Dasselbe gilt für Protein G', welches eine gentechnisch veränderte Weiterentwicklung von Protein G darstellt, bei der die Albumin-Bindungsstellen weiter vermindert wurden [65].

Ein Vergleich der Messungen mit dem nicht rekombinanten Protein A mit natürlichen Bindungsstellen für BSA (Kapitel 4.2.5.1), mit rekombinanten Protein G und Protein G' zeigt, dass alle drei Messungen ähnliche Signalintensitäten (Positivproben 22-33 nA) und vergleichbare Kurvenformen ($m(7\text{sek})/m(\text{max})=0,65-0,75$) aufweisen, d.h. die drei Proteine ähnliche Elektrodenbelegungen (s.h. Kapitel 4.1.1.8) ergeben, und auch ähnliche Bindungseigenschaften für das verwendete Maus IgG haben. Die bereits beschriebenen Unterschiede der Blockwirkung von BSA auf den unterschiedlichen Proteinbeschichtungen korrelieren sehr gut mit den Albumin-Bindungseigenschaften der Proteine, die von Protein A über Protein G bis hin zu Protein G' abnehmen, zu erkennen an zunehmenden Negativsignalen von 55%, 82% und 89%.

Für das Testdesign mit Maus IgG als Fängerantikörper und Anti-Maus IgG (AP) als Detektionsantikörper ist Protein A mit BSA als Blockreagenz von den getesteten Varianten also am besten geeignet.

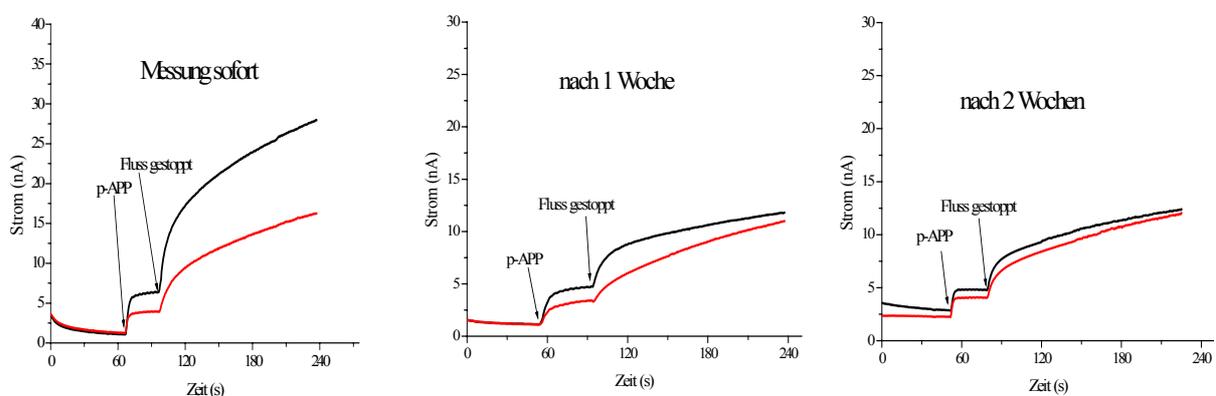
4.2.5.8 Untersuchung der Langzeitstabilität des Protein A-BSA-Systems

Nachdem sich gezeigt hatte, dass mit Protein A zur Immobilisierung des Fängerantikörpers und BSA als Blockreagenz die besten Ergebnisse in Bezug auf Signalintensität und

Differenzierbarkeit erreicht werden konnten, wurden weitere Eigenschaften wie die Langzeitstabilität des Systems untersucht.

Drei Sensoren wurden entsprechend dem in Kapitel 4.2.5.1 beschriebenen Test mit jeweils Positiv- und Negativprobe beschichtet. Ein Chip wurde sofort nach der Beschichtung ausgelesen, die beiden anderen nach der Beschichtung mit Protein A und Maus IgG im Kühlschrank aufbewahrt und im Abstand einer Woche mit BSA und Anti-Maus IgG (AP) beschichtet und anschließend gemessen.

Abbildung 55 zeigt den Vergleich der Messungen der drei beschichteten Chips mit p-Aminophenylphosphat.



Schwarz: Pos.1 (positiv): Prot.A, Maus IgG, BSA, Anti-Maus IgG (AP)

Rot: Pos.2 (negativ): Prot.A, BSA, Anti-Maus IgG (AP))

Pos.	Steigung /(nA/s) (m(max)/m(7sek))			Strom /nA		
	<u>Sofort</u>	<u>1Wo.</u>	<u>2Wo.</u>	<u>Sofort</u>	<u>1Wo.</u>	<u>2Wo.</u>
1	1,64/0,88	0,47/0,32	0,63/0,35	25 (100%)	11 (100%)	11 (100%)
2	0,53/0,40	0,20/0,15	0,48/0,29	14 (56%)	9 (82%)	10 (91%)

Abbildung 55: Messungen zur Langzeitstabilität von Protein A-beschichteten Sensoren

Die sofortige Messung des beschichteten Sensors in Abbildung 55 (links) zeigt das erwartete Messergebnis mit einem Negativsignal, was 56% des Positivsignals entspricht und eine Signalintensität des Positivsignals von 25 nA, ist also ein weiterer Beleg für die gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse des Protein A-BSA-Systems.

Nach einwöchiger Aufbewahrung des Chips im Kühlschrank ist in Abbildung 55 (mitte) eine starke Abnahme der Signalintensität zu erkennen, das Positivsignal liegt nur noch bei 11 nA. Auch die Differenzierbarkeit der beiden Positionen geht stark zurück, das Negativsignal liegt bei 82% des Positivsignals.

Eine weitere Woche später ändert sich, wie in Abbildung 55 (rechts) gezeigt, die Signalintensität im Rahmen der Messgenauigkeit nicht mehr, die Differenzierbarkeit verschlechtert sich weiter auf ein Negativsignal von 91%.

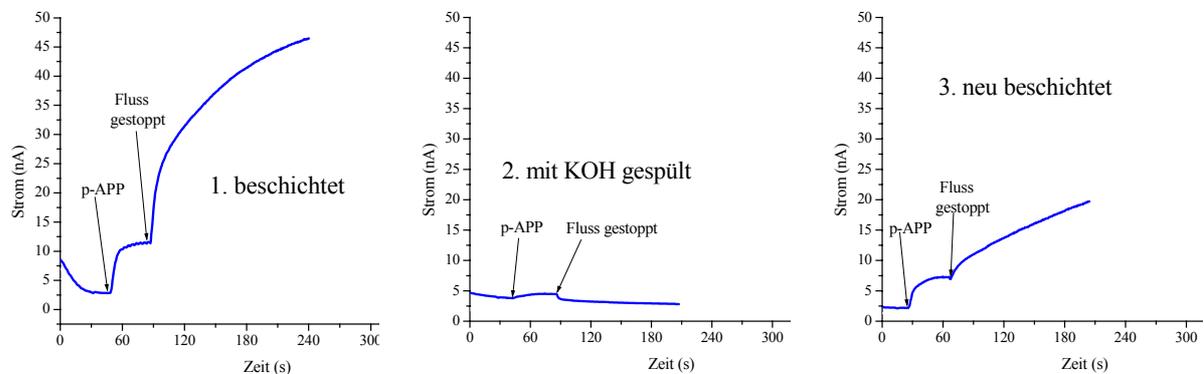
Die Untersuchungen zeigen, dass die Beschichtung des Sensors mit Protein A und Maus IgG nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind, d.h. keine konstanten Messergebnisse erzielt werden können. Die Signalintensität nimmt bereits innerhalb einer Woche auf weniger als 50% des ursprünglich gemessenen Signals ab und die Differenzierbarkeit von Positiv- und Negativsignal verringert sich ebenfalls. Anscheinend verliert der an Protein A gebundene Antikörper bei der Lagerung seine Bindungsfähigkeit und die Sensorsignale werden nur noch durch unspezifische Bindung von Detektionsantikörper verursacht.

4.2.5.9 Untersuchung zur Regenerierbarkeit der Protein A-Maus IgG-Bindung

Eine weitere zu untersuchende Eigenschaft ist die reversible Spaltung der Protein A-Antikörper-Bindung, die eine Regenerierbarkeit der Sensoren mit sich bringen würde. Da die Bindung nur im neutralen Bereich stabil ist, kann durch Spülen mit verdünnter KOH (0,1 mol/l) der Affinitätskomplex gespalten werden. Um zu überprüfen, ob die Spaltung reversibel ist, d.h. eine neue Antikörperschicht auf dem selben Protein A-Layer die selben Messergebnisse liefert, wurde ein Sensor mit einer Positivprobe beschichtet, gemessen, mit KOH gespült, wieder gemessen und dann wieder mit Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) beschichtet und mit p-Aminophenylphosphat gemessen.

In Abbildung 56 sind die Summensignale der verschiedenen Messungen mit p-Aminophenylphosphat dargestellt. Abbildung 56 (links) zeigt die erste Messung des beschichteten Chips, Abbildung 56 (mitte) die Messung nach Abspaltung der Antikörper-Beschichtung mittels KOH und Abbildung 56 (rechts) die Messung nach erneuter Beschichtung des Protein A-Layers mit Maus IgG, BSA und Anti-Maus IgG. Den Tabellen

sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flussstopp zu entnehmen.



Steigung /(nA/s) (m(max)/m(7sek))			Strom /nA		
<u>1.</u>	<u>2.</u>	<u>3.</u>	<u>1.</u>	<u>2.</u>	<u>3.</u>
2,54/1,54	-0,36/-0,11	0,37/0,28	41 (100%)	3 (7%)	17 (40%)

Abbildung 56: Messungen zur Regenerierbarkeit der Protein A-Maus IgG-Bindung

In Abbildung 56 ist zu erkennen, dass die Spaltung der Protein A-Maus IgG-Bindung mit KOH quantitativ verläuft, da in der mittleren Grafik eine negative Steigung und kein Stromsignal (7%) mehr messbar ist. Die erneute Beschichtung mit Maus IgG, BSA und Anti-Maus IgG (AP) (rechter Graph) führt zu einem Sensorsignal, was nur 40% des ursprünglichen Stromsignals beträgt, was bedeutet, dass der Protein A-Layer durch KOH teilweise abgelöst wird bzw. die Bindungsstellen durch die starke Base degeneriert werden. Eine Regenerierbarkeit der Protein A-Maus IgG-Bindung mit KOH unter Beibehaltung desselben Messergebnisses wie bei der Erstbeschichtung konnte also nicht erreicht werden.

4.2.5.10 Diskussion

Erste Messungen mit Protein A zur Immobilisierung des Fängerantikörpers Maus IgG auf der Elektrodenoberfläche und BSA als Blockreagenz hatten gezeigt, dass diese Beschichtungstechnologie, sowohl die Signalintensität als auch die Differenzierbarkeit der Sensorsignale betreffend, zu sehr guten Ergebnissen führt. Durch die Betrachtung der

relativen Messsignale, d.h. Zuordnung eines Wertes von 100% zu dem Stromsignal der Positivprobe 90 Sekunden nach Flussstop, konnten sehr gut reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden, wobei das Sensorsignal der Negativprobe jeweils bei ~55% (Fehler<5%) der Positivposition lag und in allen durchgeführten Messungen mit dem Protein A-BSA-System beobachtet werden konnte. Diese Methode der Auswertung ist, wie bereits zuvor beschrieben, sinnvoll, da die direkte Vergleichbarkeit der gemessenen Ströme aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren auf das absolute Stromsignal unmöglich ist.

Weitere Versuche mit verschiedenen Blockreagenzien und den Proteinen G und G' als Grundbeschichtung ergaben, dass die besten Messergebnisse in Bezug auf die Differenzierbarkeit der Positiv- und Negativsignale mit Protein A und BSA erreicht werden. Verantwortlich dafür sind vermutlich natürlich vorhandene Albumin-Bindungsstellen bei Protein A, welche bei dem verwendeten rekombinanten Protein G und Protein G' gentechnisch reduziert wurden. Die Messungen mit Protein G und G' sowie die Verwendung von Human IgG und Anti-Human IgG (AP) anstelle von Maus IgG und Anti-Maus IgG (AP) haben zudem gezeigt, dass das verwendete Messsystem sehr empfindlich gegenüber einer Veränderung der biologischen Beschichtung ist. Unterschiedliche Affinitäten der verwendeten Antikörper-Klassen und der Blockreagenzien auf den verschiedenen Protein-Beschichtungen machen sich in der Differenzierbarkeit und Intensität der Sensorsignale deutlich bemerkbar.

Untersuchungen zur Langzeitstabilität und Regenerierbarkeit der beschichteten Chips haben zu der Erkenntnis geführt, dass nur durch die Messung unmittelbar nach der Beschichtung vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können, da der Fängerantikörper anscheinend an die Oberfläche gebunden nach wenigen Tagen deutlich an Aktivität einbüßt. Der Grund hierfür könnte sein, dass der Antikörper trotz der Aufbewahrung des Chips in einer feuchten Kammer eintrocknet und dadurch seine dreidimensionale Struktur, die Voraussetzung zur Antigen-Bindung ist, einbüßt. Die reversible Spaltung der Protein A-Antikörper-Bindung kann ebenfalls nicht ohne Veränderung des Sensorsignals erreicht werden, was ein weiteres Indiz für die Empfindlichkeit der verwendeten Technologie darstellt. Wenige degenerierte Antikörperbindungsstellen wirken sich bereits auf das Messsignal aus.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Immobilisierung von Maus IgG auf der Goldelektrode mit Hilfe einer Protein A-Grundbeschichtung, BSA als Blockreagenz und Anti-Maus IgG (AP) als Detektionsantikörper zu sehr guten Ergebnissen führt. Wird jedoch eine Komponente im biologischen Aufbau (z.B. anderer Fängerantikörper) geändert, können

diese Ergebnisse nicht übertragen werden und das System muss für die veränderten Bedingungen neu optimiert werden.

4.3 Entwicklung eines in vitro Allergietests – Nachweis von Der p2-spezifischem IgE

Nachdem verschiedene Methoden zur Beschichtung der Interdigitalstrukturen und zur Immobilisierung eines Fängerantikörpers im Rahmen der Entwicklung eines biologischen Testdesigns (Kapitel 4.2) untersucht und optimiert wurden, sollten die Ergebnisse auf ein System mit praktischer Relevanz übertragen werden. Von den zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten fiel die Wahl auf die Entwicklung eines *in vitro* Allergietests, da sich die Messmethode nach entsprechender Anpassung der Sensoren und des Auslesegeräts eignet, um zahlreiche Allergien und Allergene gleichzeitig nachzuweisen und so auch technologisch interessant ist. Vergleichbare immunologische Tests, die nach optischen Auslesemethoden funktionieren, sind bereits von den Firmen Pharmacia (Uni-CAP InvitroSight, Nachweis von Fluoreszenz) und Mediwiss Analytik (Allergyscreen, Nachweis einer Farbreaktion) auf dem Markt.

Da sich das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Messsystem auf Basis von Mikrochips durch seine sehr gute Empfindlichkeit (Nachweisgrenze für p-Aminophenol in Lösung $<10^{-6}$ mol/l) bei geringen Analytmengen (benötigte Flüssigkeitsmenge etwa 1-10 nl für die Beschichtung einer Interdigitalstruktur) auszeichnet und die Technologie gleichzeitig das Auslesen mehrerer Positionen ermöglicht, wurde mit der *in vitro* Allergiediagnostik eine Anwendung gewählt, die exakt diese Eigenschaften verlangt. Zur Entwicklung eines Allergietests ist es ideal, mit einer möglichst kleinen Menge Serum geringe Konzentrationen an IgE verschiedener Spezifitäten nachzuweisen.

Am Beispiel der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides*), welche eine der bedeutendsten Allergenquelle im Haushalt darstellt und mit allergischen Asthmaerkrankungen in Verbindung gebracht wird, sollen erste Untersuchungen durchgeführt werden und die Funktionsfähigkeit des Messsystems für eine solche Anwendung getestet werden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten mehr als 10 Allergene der verschiedenen Milbenspezies identifiziert werden, welche über ein sehr hohes Allergenpotential verfügen und nach Molekulargewicht in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Zu Gruppe 1 zählen alle 24 kDa Proteine, die Allergene der Gruppe 2 haben ein spezifisches Gewicht von 14 Da [92, 93]. Da die Allergene der Gruppe 2 besser charakterisiert sind und einige monoklonale Antikörper für diese Antigene zur Verfügung stehen, wurde für die Verifizierung des Tests das

Milbenallergen Der p2 (*Dermatophagoides pteronyssinus* = Milbenspezies, Gruppe 2-Allergen) ausgewählt.

4.3.1 Aufbau des Tests

Der Aufbau eines Immunoassays zum Nachweis von Der p2 spezifischem IgE erfordert einen komplizierteren immunologischen Aufbau als das in Kapitel 4.2 untersuchte Testdesign. Während bei dem entwickelten Testdesign Fängerantikörper und Analyt identisch waren, wird dieser eine Antikörper für den Aufbau des Allergietests durch Fängerantikörper, Allergen und Analyt ersetzt. Der schematische Aufbau des Tests ist in Abbildung 57 gezeigt.

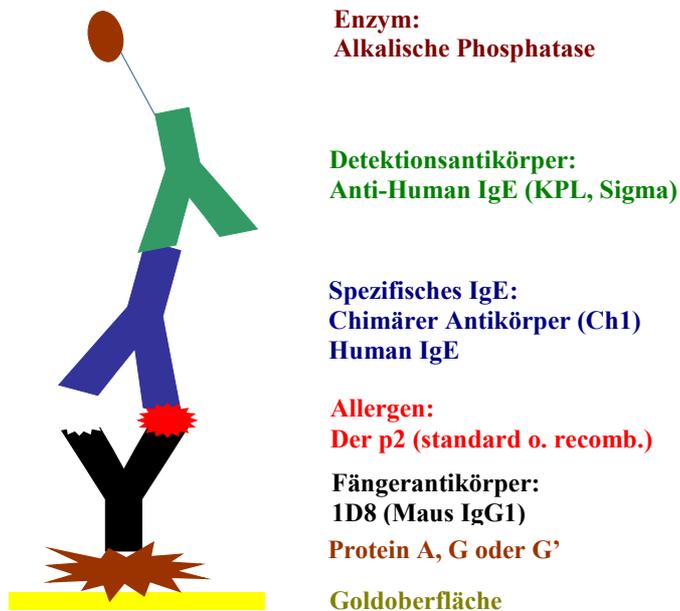


Abbildung 57: Aufbau des Allergietests gegen das Hausstaubmilbenallergen Der p2

Der *in vitro* Nachweis der Hausstaubmilbenallergie funktioniert nach folgendem Prinzip: Mittels des monoklonalen Fängerantikörpers 1D8, der auf der Goldoberfläche immobilisiert wird, kann das Hausstaubmilbenallergen Der p2 an der Oberfläche fixiert werden. Bei Existenz von Der p2-spezifischem IgE im Human-Testserum (für die Entwicklung des Tests ersatzweise der chimäre Antikörper Ch1 aus Maus Anti-Der p2 IgG und Human IgE), also bei Allergikern, bindet dieses an das Allergen und kann mit Anti-Human IgE (AP) detektiert werden. Die Menge an gebundenem Anti-Human IgE sollte gleich der Menge an p-APP-

spaltendem Enzym sein, so dass das durch p-AP-Redoxrecycling gemessene Stromsignal proportional zu der Menge an gebundenem IgE ist und deshalb Auskunft über die Stärke der allergischen Reaktion gibt.

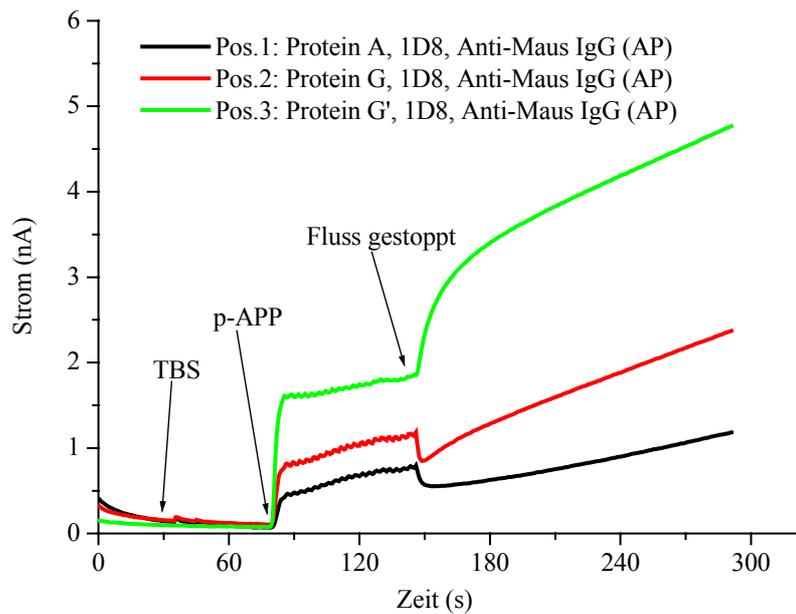
Wie in Abbildung 57 gezeigt, unterteilt sich der Aufbau des *in vitro* Allergietests in zahlreiche immunologische Einzelschritte. Um die Funktion der Teilreaktionen zu untersuchen und die Versuchsbedingungen zu optimieren, wurden zunächst Immunoassays zur Untersuchung der Immobilisierung des Fängerantikörpers und zum Nachweis von Human IgE durchgeführt und anschließend die Teilergebnisse kombiniert.

4.3.2 Immobilisierung des Fängerantikörpers 1D8

Wie die Erkenntnisse in Kapitel 4.2 gezeigt haben, ist die Immobilisierung des Fängerantikörpers mit Hilfe einer Grundbeschichtung von Protein A, Protein G oder Protein G' für die verwendete Auslesemethode in Bezug auf Signalintensität und Differenzierbarkeit der Sensorsignale am geeignetsten. Wie sich weiterhin gezeigt hatte, reagieren die Messergebnisse sehr empfindlich auf die Variation der Einzelkomponenten, je nach Affinität des verwendeten Antikörpers zum jeweiligen Protein, weshalb erste Tests darüber Auskunft geben sollten, welches Protein mit dem Fängerantikörper 1D8 die größten Sensorsignale ergibt.

Ein 3-Positionen-Assay mit den drei verschiedenen Proteinen als Immobilisierungsreagenz, Fängerantikörper 1D8 (Maus IgG1) und Detektionsantikörper (Anti-Maus IgG (AP)) sollte zeigen, welches der Proteine für den Aufbau des Allergietests weiterhin eingesetzt werden sollte.

Abbildung 58 zeigt die Summensignale des beschichteten Chips bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. In der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flusstop dargestellt. Die Klammerwerte in der Tabelle geben den Extremwert der Steigung unter Berücksichtigung des „Knicks“ wieder.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	(-0,10) 0,00	-0,01	0,9 (21%)
2 (rot)	(-0,22) 0,02	0,01	1,9 (45%)
3 (grün)	0,15	0,09	4,2 (100%)

Abbildung 58: Summensignale des 3-Positionen-Assays mit den verschiedenen Immobilisierungspoteinen Protein A, G und G' bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Position 1 (schwarz) zeigt das Sensorsignal bei der Immobilisierung von 1D8 mit Protein A, Position 2 (rot) mit Protein G und Position 3 (grün) mit Protein G'

In Abbildung 58 ist die Messung des 3-Positionen-Assays (200 μ m Strukturen) mit den verschiedenen Immobilisierungspoteinen dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass Protein G' mit Abstand das höchste Sensorsignal ergibt, während Protein G nur 45% des Signals der Protein G'-beschichteten Position erreicht und Protein A sogar nur 21%. Da es sich bei 1D8 um ein Maus Immunglobulin der Subklasse IgG1 handelt, welches bekanntermaßen schlecht an Protein A bindet [58], ist dieses Messergebnis für Protein A nicht überraschend. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde Protein G' zur Immobilisierung des Fängerantikörpers verwendet.

4.3.3 Versuche zur Detektion von Human IgE bzw. Ch1 mittels Anti-Human IgE (AP)

Der oben gezeigte Testaufbau zum Nachweis von spezifischem IgE erfordert den Einsatz eines anderen Detektionsantikörpers als bei dem biologischen Testdesign: da Human IgE als Analyt nachgewiesen werden soll, erfolgt die Detektion mit Anti-Human IgE (AP) anstelle von Anti-Maus IgG (AP).

Zur Untersuchung des Ausleseschritts wurde analog zu dem in Kapitel 4.2 untersuchten Testdesigns der Analyt Human IgE auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert und mittels Anti-Human IgE (AP) ausgelesen. Dabei musste berücksichtigt werden, dass Anti-Human IgE (AP) Fc-spezifisch an Human IgE bindet, was unter Betrachtung des Testaufbaus sinnvoll ist, da im Test IgE Fab-spezifisch an das Allergen bindet. Eine Fc-spezifische Immobilisierung wie mit Maus IgG in Kapitel 4.2 gezeigt ist aus diesem Grund nicht geeignet, folglich auch nicht die Verwendung von Protein A, Protein G oder Protein G' als Immobilisierungsreagenz. Analog zur Fc-spezifischen Antikörperbindung mit Protein A, G oder G' wurde also eine Fab-spezifische Immobilisierung mit Protein L gewählt, welches relativ unabhängig von der antikörperproduzierenden Spezies und von der Antikörperklasse Immunglobuline Fab-spezifisch bindet (Abbildung 59).

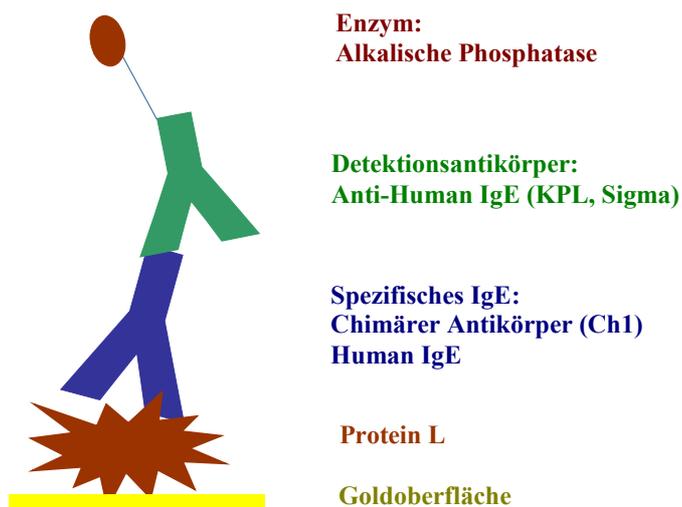
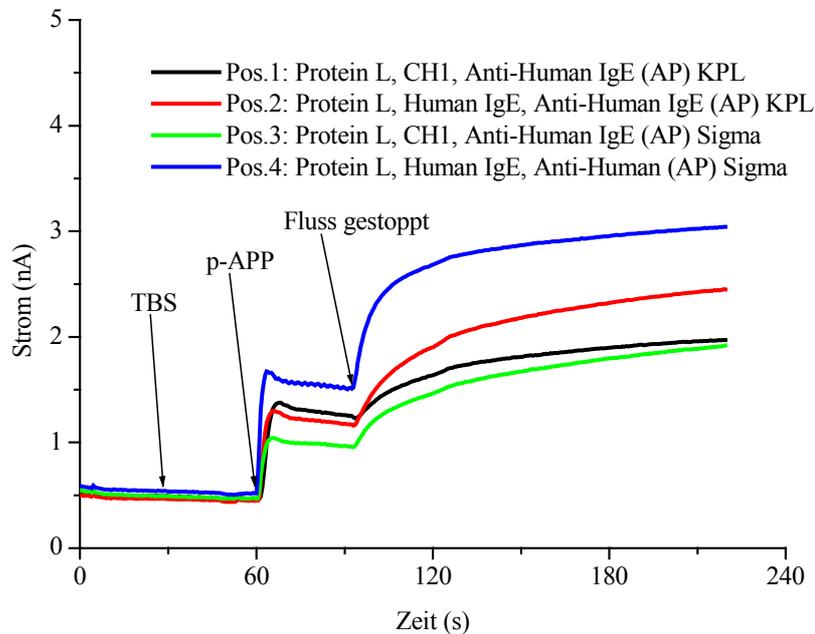


Abbildung 59: Schematische Darstellung des zur Detektion von Human IgE verwendeten Testaufbaus

Für die Entwicklung des Tests stand ein Human IgE unbekannter Spezifität der Firma ICN zur Verfügung sowie der chimäre Antikörper Ch1 der Firma Indoor Biotechnologies, der eine Kombination aus dem Fab-Fragment von Der p2 spezifischem Maus IgG und dem Fc-Fragment von Human IgE darstellt.

Anhand eines 4-Positionen-Assays mit Protein L als Grundbeschichtung zur Immobilisierung von Ch1 und Human IgE wurde der Detektionsschritt mit zwei verschiedenen Anti-Human IgE (AP) (Sigma, KPL) getestet.

Abbildung 60 zeigt die Summensignale des beschichteten Sensors bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat, in der Tabelle sind die Messwerte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flusstopp dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,03	0,02	1,9 (63%)
2 (rot)	0,06	0,05	2,3 (77%)
3 (grün)	0,05	0,04	1,8 (60%)
4 (blau)	0,16	0,11	3,0 (100%)

Abbildung 60: Summensignale des 4-Positionen-Assays zur Untersuchung des Detektionsschrittes für Human IgE bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat. Positionen 1 (schwarz) und 3 (grün) zeigen die Detektion von Ch1 mittels Anti-Human IgE (AP) von KPL bzw. Sigma, Positionen 2 (rot) und 4 (blau) zeigen die Detektion von Human IgE mittels Anti-Human IgE (AP) von KPL bzw. Sigma

Abbildung 60 zeigt, dass die Fab-spezifische Immobilisierung von Human IgE bzw. Ch1 und anschließende Detektion mittels Anti-Human IgE (AP) erfolgreich durchgeführt werden konnte. Das höchste Sensorsignal ergibt Human IgE mit Anti-Human IgE (AP) der Firma Sigma. Generell kann festgehalten werden, dass die mit Human IgE beschichteten Positionen mit 100% und 77% größere Signale zeigen als die Positionen mit dem chimären Antikörper Ch1 (60% und 63%). Im Falle des chimären Antikörpers Ch1 ist zudem der Unterschied zwischen beiden Detektionsantikörpern mit 3% Unterschied im Sensorsignal nach 90 Sekunden geringer als bei Human IgE (23% Differenz), er ist im Rahmen des Messfehlers zu vernachlässigen.

Für die nachfolgenden Tests wurde der Detektionsantikörper Anti-Human IgE (AP) von Sigma verwendet, da es in Kombination mit Human IgE das höchste Sensorsignal zeigte und wie bereits erwähnt bei der Entwicklung des Tests zunächst die Optimierung der Signalintensität im Vordergrund steht.

4.3.4 Untersuchungen zum Nachweis von Der p2-spezifischem IgE - Entwicklung eines Aufbaus für *in vitro* Allergietests

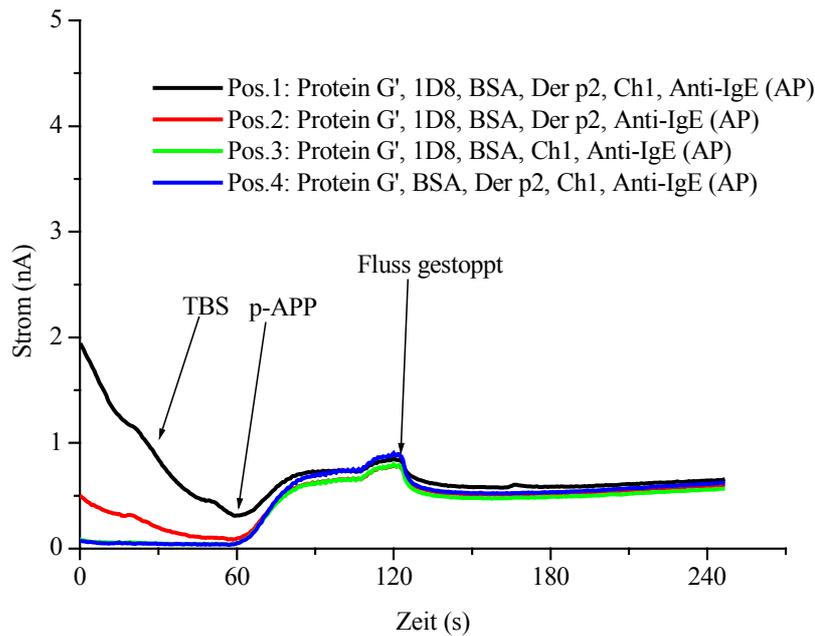
4.3.4.1 Testaufbau mit Der p2 standard als Allergen

Nachdem vorausgehende Untersuchungen der Teilreaktionen des Testaufbaus ergeben hatten, dass Protein G' als Immobilisierungsprotein für den verwendeten Fängerantikörper die höchsten Sensorsignale zeigt, ebenso wie Anti-Human IgE (AP) von Sigma mit Human IgE, wurden beide Erkenntnisse für den Aufbau des Tests übernommen.

Der kritische Schritt bei der Kombination beider Teilschritte ist die Wahl eines geeigneten Allergens, welches durch den Fängerantikörper, sowie durch das verwendete Human IgE, bzw. durch Ch1 gebunden werden muss.

Ein erster Test wurde mit einem Der p2 standard der Firma Indoor Biotechnologies durchgeführt, welcher an den Der p2 spezifischen monoklonalen Antikörper 1D8 sowie an den ebenfalls Der p2 spezifischen chimären Antikörper Ch1 binden sollte.

Ein 4-Positionen-Assay mit BSA als Blockreagenz sollte zeigen, ob mit diesem Allergen ein erfolgreicher Nachweis von Der p2-spezifischen IgE (in diesem Test ersetzt durch Ch1) möglich ist und Auskunft über unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers geben (Abbildung 61).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	-0,06	-0,02	0,6
2 (rot)	-0,06	-0,02	0,6
3 (grün)	-0,06	-0,02	0,6
4 (blau)	-0,06	-0,02	0,6

Abbildung 61: Summensignale des 4-Positionen-Assays mit Der p2 standard als Allergen. Die Signale der unterschiedlich beschichteten Positionen sind im Rahmen der Messgenauigkeit nicht differenzierbar

Die Messung des beschichteten Sensors in Abbildung 61 zeigt an allen 4 Positionen nicht differenzierbare Negativsignale, zu erkennen an einer deutlich negativen Steigung bei Flusstopp ohne anschließenden Anstieg der Signale.

Positiv an diesem Messergebnis ist die Tatsache, dass offensichtlich keine unspezifischen Bindungen von Ch1 und Anti-Human IgE (AP) beobachtet werden, die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse bei diesem Testaufbau also gering ist.

Allerdings ist die geplante Kombination der bereits untersuchten Einzelschritte mittels Der p2 standard fehlgeschlagen, da anscheinend kein Allergen gebunden wurde.

Auf der Suche nach der Ursache für das Scheitern des Testaufbaus konnte in der Literatur [94, 95] gefunden werden, dass das Allergen Der p2 in 3 verschiedene Isoforme, Der p2.0101, Der p2.0102 und Der p2.0103, unterteilt werden kann, welche sich in 3 bis 4 der 129 Aminosäuren unterscheiden. Der signifikante Unterschied, welcher für die Funktionsfähigkeit des gezeigten Tests von Bedeutung ist, ist an Aminosäureposition 114 zu erkennen, welche

bei Der p2.0101 durch Asparaginsäure und bei Der p2.0102 und Der p2.0103 durch Asparagin besetzt ist. Untersuchungen der Bindungseigenschaften des monoklonalen Antikörpers 1D8 haben ergeben, dass Position 114 für die Bindung des Allergens an 1D8 verantwortlich ist und Asparaginsäure an Position 114 die Ausbildung eines Affinitätskomplexes zwischen Allergen und Antikörper verhindert. Erst eine Substitution der Asparaginsäure durch Asparagin an Position 114 von Der p2.0101 ermöglicht eine Bindung dieser Allergen-Isoform an 1D8 [94].

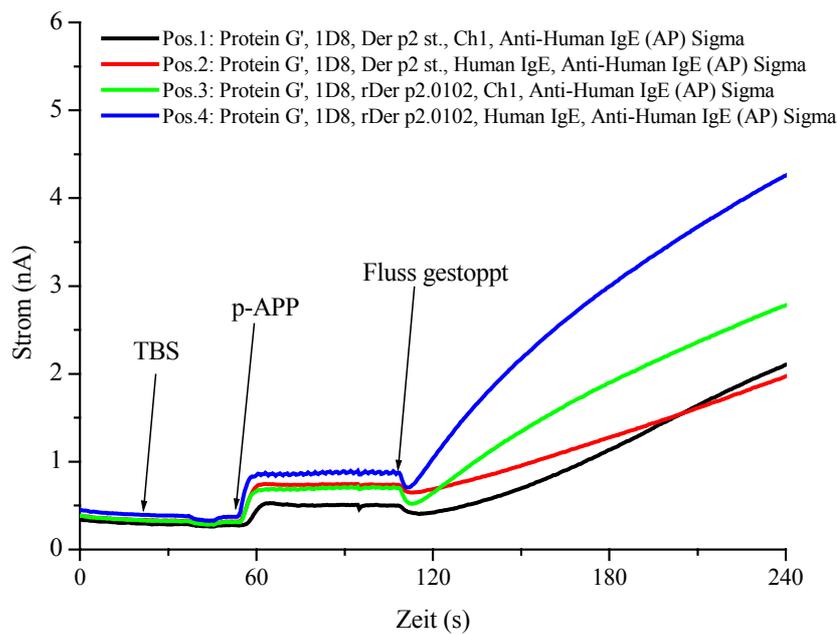
Folglich kann ein hoher Anteil an Der p2.0101 in dem verwendeten Der p2 standard, dessen isoforme Zusammensetzung nicht bekannt ist, dazu geführt haben, dass in dem gezeigten Test kein Allergen an dem immobilisierten Fängerantikörper gebunden hat.

4.3.4.2 Testaufbau mit rekombinantem Der p2.0102 als Allergen

Nach der Erkenntnis, dass Der p2 standard wohl aufgrund zu hoher Anteile an Der p2.0101 nicht an 1D8 bindet, wurde ein rekombinantes Der p2.0102 als Allergen eingesetzt und neben Ch1 auch Human IgE getestet. Auf einen BSA-Blockschritt wurde zunächst verzichtet, um möglichst hohe Signalintensitäten zu bekommen, die unspezifischen Bindungen werden zu einem späteren Zeitpunkt untersucht.

Ein 4-Positionen Assay mit Der p2 standard, sowie rekombinantem Der p2.0102 als Allergene und Ch1 und Human IgE als Analyten, sollte zeigen, ob tatsächlich Der p2 standard mit einem hohen Anteil an nichtbindendem Der p2.0101 die Ursache für die Negativsignale in dem zuvor gezeigten Test war.

Abbildung 62 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors mit p-Aminophenylphosphat, in der Tabelle sind die Werte für die maximale Steigung, die mittlere Steigung in 7 Sekunden und den Strom 90 Sekunden nach Flusstopp dargestellt.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,01	0,00	1,49 (43%)
2 (rot)	0,01	0,00	1,50 (43%)
3 (grün)	0,03	0,01	2,23 (64%)
4 (blau)	0,05	0,03	3,48 (100%)

Abbildung 62: Summensignale des 4-Positionen-Assays zum Nachweis von Der p2-spezifischem IgE bei der Verwendung von zwei verschiedenen Allergenen und zwei verschiedenen Der p2-spezifischen Antikörpern. Positionen 3 (grün) und 4 (blau) zeigen die Proben mit rekombinantem Der p2.0102, welche im Gegensatz zu den Positionen 1 und 2 ein positives Messsignal ergeben

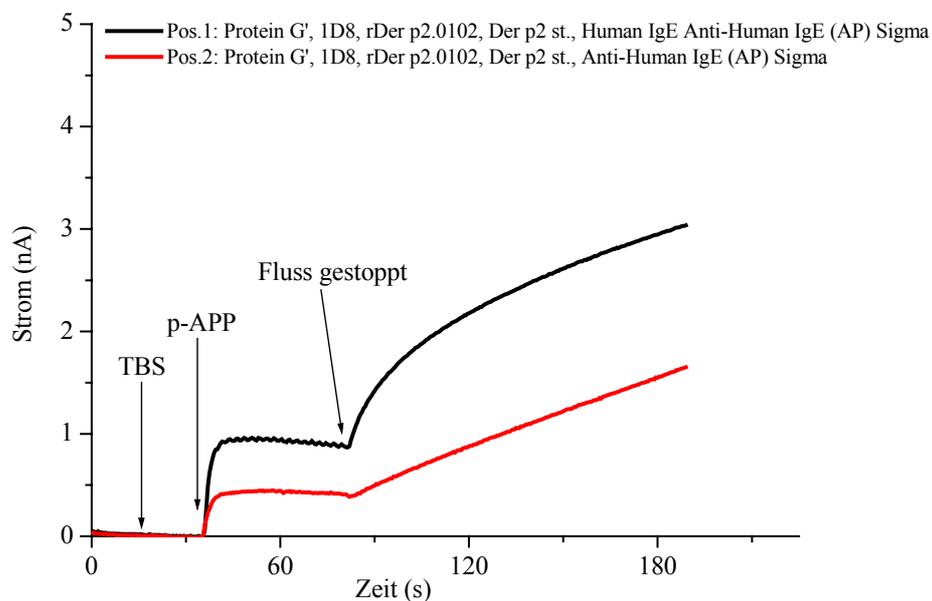
Die Messung in Abbildung 62 zeigt ein deutliches Positivsignal bei der Position mit rekombinantem Allergen und Human IgE. Da gleichzeitig kein Positivsignal an der Position mit Allergenstandard und Human IgE zu erkennen ist, die Steigung bei Flusstopp an dieser Position ist 0 nA/s und das Sensorsignal des Positivsignals an Position 4 33% beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine unspezifische Bindung von Human IgE oder Anti-Human IgE (AP) handelt, sondern eine spezifische Bindung von Human IgE an rDer p2.0102 stattfindet. Weiterhin belegt die Tatsache, dass beide mit Der p2 standard beschichteten Positionen ein Negativsignal aufweisen (rot, schwarz) und die mit rDer p2.0102 belegten Positionen jeweils ein Positivsignal, die Vermutung, dass Der p2 standard nicht an 1D8 bindet.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass der Testaufbau mit rekombinantem Allergen Der p2.0102 erfolgreich war und das verwendete Human IgE offensichtlich Der p2-spezifisches IgE enthält, welches ebenso wie der chimäre Antikörper Ch1 mit rDer p2.0102 ein positives Sensorsignal zeigt, während die Verwendung von Der p2 standard mit beiden Antikörpern zu negativen Messsignalen führt, was auch unspezifische Bindungen von Human IgE, Ch1 und Anti-Human IgE (AP) ausschließt.

4.3.4.3 Untersuchung zur unspezifischen Bindung des Detektionsantikörpers

Anhand eines weiteren Tests sollte explizit untersucht werden, wie stark die unspezifischen Wechselwirkungen des Detektionsantikörpers auf dem Allergen bei dem zuvor gezeigten Testaufbau sind und ob der Einsatz eines Blockschrittes notwendig ist. Um eine möglichst vollständige Belegung der Antigenbindungsstellen von 1D8 zu gewährleisten, wurden sowohl rekombinantes Der p2.0102 als auch Der p2 standard als Allergene eingesetzt.

Ein 2-Positionen-Assay mit Positiv- (mit Human IgE) und Negativposition (ohne Human IgE) gibt Auskunft über die Differenzierbarkeit beider Proben (Abbildung 63).



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,11	0,07	2,9 (100%)
2 (rot)	0,02	0,01	1,5 (52%)

Abbildung 63: Summensignale des 3-Positionen-Assays zur Untersuchung der unspezifischen Bindung von Detektionsantikörper. Position 1 (schwarz) zeigt die Positivprobe mit Human IgE, Position 2 (rot) die Negativprobe ohne Human IgE

In Abbildung 63 ist zu erkennen, dass die Negativposition ohne Human IgE ein Sensorsignal ergibt, welches 52% des Positivsignals entspricht. Unter Berücksichtigung des Erkenntnis beim Aufbau des Testdesigns, wo das Negativsignal im besten Fall (Protein A, BSA als Blockreagenz) etwa 55% des Positivsignals betrug, ist dieses Ergebnis sehr gut.

Im Vergleich zu dem vorherigen Test in Kapitel 4.3.4.2 fällt auf, dass in beiden Messungen die Negativpositionen, deren Anfangssteigungen bei Flussstop nahe bei 0 nA/s lagen und damit deutlich unter denen der Positivpositionen lagen, im Verlauf der Messung noch auf etwa 50% des Positivsignals ansteigen.

Die Ursache dafür kann sein, dass bei den kleinen Sensorsignalen, die durch den Einsatz der 200µm Strukturen und die starke Elektrodenbelegung durch fünf Beschichtungsschritte pro Test gemessen werden, die Diffusion des abgespaltenen p-Aminophenol zwischen den einzelnen Positionen prozentual stärker ins Gewicht fällt als bei den in Kapitel 4.2 meist verwendeten 400µm Strukturen, die zudem einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Positionen haben.

4.3.4.4 Diskussion

Die Untersuchungen zum Aufbau eines Tests zum Nachweis von Der p2-spezifischem IgE haben zu der Erkenntnis geführt, dass mittels des monoklonalen Fängerantikörpers 1D8 nicht alle Allergenisoforme von Der p2 immobilisiert werden können. Da Der p2.0101 aufgrund einer einzigen Aminosäure in der Proteinsequenz nicht an 1D8 bindet, erfordert der Testaufbau mit 1D8 den Einsatz des rekombinanten Allergens Der p2.0102 anstelle eines Der p2 standards unbekannter Zusammensetzung.

Bei Verwendung des rekombinanten Allergens konnten sehr gute Ergebnisse in Bezug auf die Differenzierbarkeit der Positiv- und Negativsignale erzielt werden. Auffällig ist, dass die

Signalintensität bei den gezeigten Messungen im Vergleich zu den in Kapitel 4.2 vorgestellten Messergebnissen sehr gering ist. Zu beachten ist jedoch, dass für die Entwicklung des Allergietests im Gegensatz zu Kapitel 4.2, wo Chips mit 400µm Interdigitalstrukturen verwendet wurden, 200 µm Strukturen ausgelesen wurden. Zudem ist die Elektrodenbelegung nach 5 Beschichtungsschritten mit zumeist voluminösen Proteinen recht groß.

Bei zahlreichen Messungen, die nicht alle ausführlich beschrieben wurden, konnte weiterhin festgestellt werden, dass bei dem gezeigten Testaufbau unspezifische Bindungen und dadurch bedingte falsch-positive Messergebnisse eine untergeordnete Rolle spielen. Ein Beispiel ist der Testaufbau mit Der p2 standard als Allergen (Kapitel 4.3.4.1), wo an keiner Position ein positives Sensorsignal gemessen werden konnte, was bei einer unspezifischen Bindung von Detektionsantikörper der Fall gewesen wäre.

Die Tatsache, dass falsch-positive Messergebnisse durch unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers bei diesem Testaufbau nicht gemessen wurden, lässt zudem darauf schließen, dass das verwendete Human IgE tatsächlich Der p2-spezifisches IgE enthält. Es erwies sich bei den Tests als besser geeignet als der chimäre Antikörper Ch1, welcher in jeder Messung kleinere Sensorsignale zeigte als Human IgE und nach 3 Monaten Aufbewahrung bei 4°C keine Reaktion mehr aufwies.

Weitere Tests mit realen Blutproben mit bekanntem Gehalt an Der p2-spezifischem IgE sollten nachfolgend die Funktionsfähigkeit des Testaufbaus in einer Anwendung zeigen.

4.4 Untersuchungen mit Blutproben

4.4.1 Verwendete Blutproben

Nachdem in Kapitel 4.3 mit Hilfe des chimären Antikörpers Ch1 und Human IgE der Firma ICN ein funktionsfähiger Testaufbau entwickelt werden konnte, sollte durch den Einsatz von Blutproben das Verhalten des Tests in einer realen Anwendung untersucht werden. Die Blutproben wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Ollert der Klinik und Polyklinik für Allergologie und Dermatologie am Biederstein zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um 5 Proben mit jeweils 200 µl Serum, welches Patienten zur *in vitro*

Diagnostik verschiedener allergischer Erkrankungen abgenommen wurde und im Allergielabor der Klinik bereits analysiert worden war:

Zwei Patienten zeigten keinerlei allergische Reaktion auf Hausstaubmilbenallergene, entsprechend enthielten die Proben kein Der p2 spezifisches IgE. Drei Proben stammten von Patienten mit Hausstaubmilbenallergie, sie enthielten spezifisches IgE.

Die Untersuchung der Proben im Allergielabor der Klinik wurden mittels des CAP-Systems der Firma Pharmacia durchgeführt. Der CAP-Test, ein Sandwich-Immunoassay, stellt die derzeitige Standardmethode zur *in vitro* Allergiediagnostik dar und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Mit Hilfe eines Trägerpolymers (CNBr-aktiviertes Cellulosederivat) werden verschiedene Allergene adsorptiv immobilisiert, im Serum vorhandenes spezifisches IgE bindet an der Position mit dem entsprechenden Allergen und wird mittels Anti-Human IgE detektiert. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit entwickelten Test ist Anti-Human IgE an β -Galactosidase oder ^{125}I gebunden und der Nachweis von gebundenem IgE erfolgt im Falle des Enzymimmunoassay photometrisch oder anhand des radioaktiven Isotopenzerfalls von ^{125}I .

Je nach Konzentration an spezifischem IgE wird eine Einteilung in sogenannte CAP-Klassen durchgeführt:

CAP-Klasse 0:	< 0,35	kU/l
CAP-Klasse 1:	0,35- 0,70	kU/l
CAP-Klasse 2:	0,70- 3,50	kU/l
CAP-Klasse 3:	3,50- 17,50	kU/l
CAP-Klasse 4:	17,50- 50,00	kU/l
CAP-Klasse 5:	50,00- 100,00	kU/l
CAP-Klasse 6:	> 100,00	kU/l

Die Einheit kU (kilo Unit) entspricht dabei 2,4 mg

1 kU/l steht also für eine Konzentration von 2,4 mg/l bzw. 2,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Von CAP-Klasse 0 bis CAP-Klasse 6 weisen die Patienten also zunehmende Konzentrationen an allergenspezifischem IgE auf und zeigen entsprechend eine zunehmend starke allergische Reaktionen.

Die hier verwendeten Blutproben wurden im Allergielabor 5K25 von Frau J. Grosch auf spezifisches IgE der Milbenspezies *Dermatophagoides pteronissimus* (Der p) und *Dermatophagoides farinae* (Der f) untersucht, mit folgenden Ergebnissen:

Blutprobe	Konzentration an spez. IgE (Der p)	Konzentration an spez. IgE (Der f)
+1	48,4 kU/l	49,5 kU/l
+2	46,8 kU/l	50,1 kU/l
+3	67,7 kU/l	75,1 kU/l
-1	<0,35 kU/l	<0,35 kU/l
-2	<0,35 kU/l	<0,35 kU/l

4.4.2 Messergebnisse

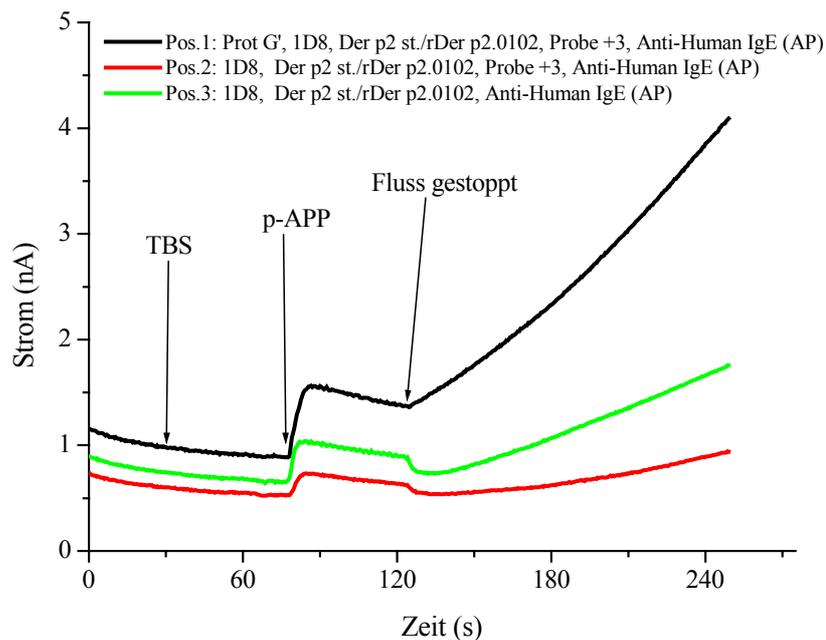
Um erfolgreiche Messungen mit den Blutproben durchführen zu können, sollte zunächst ein Konzentrationsbereich ermittelt werden, in dem bei dem entwickelten Messsystem mit einem positiven Messsignal gerechnet werden konnte und die richtige Verdünnung des Serums gewählt werden.

Eine Umrechnung der bei der Entwicklung des Tests verwendeten Konzentrationen an IgE bzw. Ch1 in kU/l ergibt mit den verwendeten 10µg/ml einen Wert von 4 kU/l. Die IgE-positiven Blutproben enthielten in Bezug auf Der p mit CAP-Klassen 4 und 5 und Konzentrationen von 46,8 bis 67,7 kU/l wesentlich höhere Konzentrationen an spezifischem IgE, welche jedoch Spezifitäten für alle Allergene der *Dermatophagoides pteronissimus* Spezies (Der p1 und Der p2 mit allen Isoformen) beinhalten.

Im Verdünnungsbereich von maximal 1:100 bis unverdünnt sollte also Der p2 spezifisches IgE im Serum mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Immunoassays nachweisbar sein. Im praktischen Einsatz hat sich jedoch gezeigt, dass eine Beschichtung des Chips mit unverdünntem Serum nicht möglich ist, da dieses die Kanüle der Spritze verstopft.

Aufgrund der besten Handhabbarkeit der großen Verdünnung von 1:100 bei der Beschichtung wurde also ein 3-Positionen Assay mit Blutprobe +3 in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt und geprüft, ob die Empfindlichkeit des Tests für diesen Konzentrationsbereich ausreicht. Des weiteren sollte die Messung über die Spezifität der Protein G'-Beschichtung Auskunft geben.

Abbildung 64 zeigt die Summensignale der Messung des beschichteten Sensors bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat.



Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
1 (schwarz)	0,02	0,015	3,17 (100%)
2 (rot)	-0,03	-0,01	0,76 (24%)
3 (grün)	-0,06	-0,02	1,41 (44%)

Abbildung 64: 3-Positionen-Assay zur Untersuchung der Spezifität der Protein G'-Beschichtung bei der Verwendung von Realproben. Position 1 (schwarz) zeigt die Positivprobe mit Protein G'-Layer und Blutprobe +3, Position 2 (rot) denselben Testaufbau ohne Protein G', Position 3 (grün) die Negativprobe ohne Protein G' und ohne Blutprobe

Aus der Messung in Abbildung 64 konnten folgende Erkenntnisse gezogen werden:

- Die Blutprobe +3 zeigt in einer Verdünnung von 1:100 in TBS ein positives Sensorsignal, sehr gut an der positiven Steigung bei Flussstop zu erkennen, dessen Signalintensität mit 3,17 nA im Bereich der mit Human IgE gemessenen Signalintensitäten liegt. Die Empfindlichkeit des Messsystems ist also groß genug, um Konzentrationen im Bereich von weniger als 1,6 µg/ml nachzuweisen. Mit einem Tropfenvolumen von etwa 1,5 nl bei der 200 µm Struktur (Kapitel 3.4) ergibt sich eine Analytmenge im Pikogrammbereich.
- Wie die negativen Messsignale der Positionen ohne Protein G' deutlich machen, kann nur durch die Fc-spezifische Immobilisierung des Fängerantikörpers 1D8 eine gerichtete Antikörperbeschichtung erreicht werden, mit der ein positiver Nachweis von Der p2-spezifischem IgE möglich ist. Durch unspezifische Bindung der Antikörper,

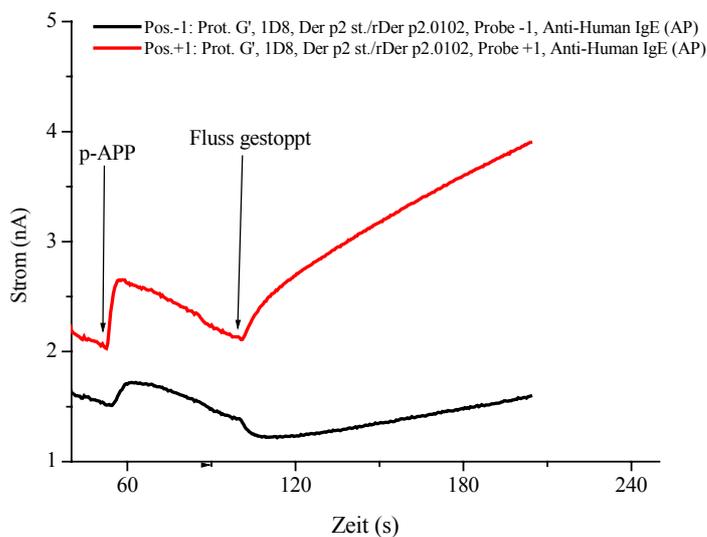
Antigene und des Analyten auf der Elektrodenoberfläche kann kein positives Sensorsignal gemessen werden.

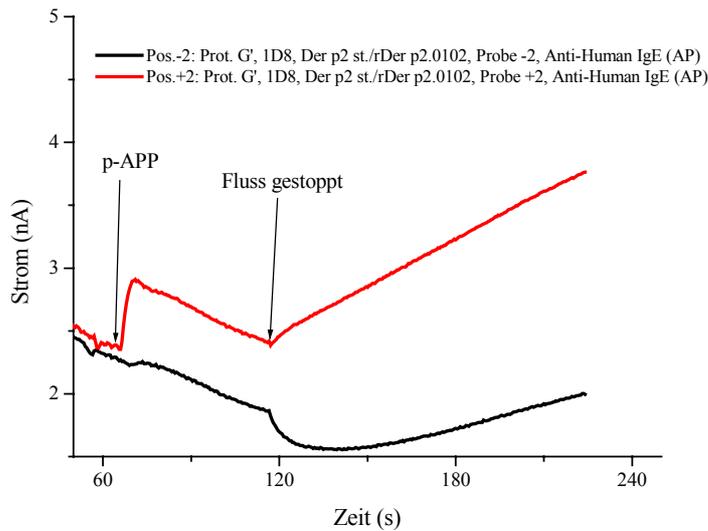
- Der Vergleich zwischen beiden Positionen ohne Protein G' zeigt, dass keine unspezifische Bindung von spezifischem IgE der Blutprobe +3 stattfindet sondern andere Serumbestandteile zusätzlich die unspezifische Bindung von Detektionsantikörper unterdrücken, bzw. eine hohe Elektrodenbelegung und dadurch ein geringeres Sensorsignal zeigen.

Nachdem oben gezeigte Messung die Erfahrung bei der Entwicklung des Allergietests bestätigt hatte, wonach unspezifische Bindungen bei dem eingesetzten Aufbau kaum stattfinden und falsch-positive Messsignale, d.h. ein positiver Anstieg bei Flussstop, obwohl kein spezifisches IgE gebunden ist, nicht auftreten, sollten vergleichende Messungen mit positiven und negativen Blutproben durchgeführt werden. Der Vorteil bei dieser vergleichenden Messung ist, dass beide Positionen die selbe Elektrodenbelegung aufweisen und der Unterschied im Sensorsignal ausschließlich durch die spezifische IgE-Bindung verursacht wird. Der Einfluß der Elektrodenbelegung auf das Messsignal ist bei beiden Positionen gleich.

Mit den Blutproben +1 und -1 sowie +2 und -2 wurden zwei 2-Positionen-Assays durchgeführt, um die Differenzierbarkeit zwischen positiven und negativen Blutproben zu untersuchen.

Abbildung 65 zeigt die Messungen der beschichteten Sensoren bei der Messung mit p-Aminophenylphosphat.





Position	m (max) /(nA/s)	m (7sek) /(nA/s)	I (90sek) /nA
+1 (rot)	0,06	0,04	3,75 (100%)
-1 (schwarz)	-0,04	-0,02	1,53 (41%)
+2 (rot)	0,03	0,02	3,57 (100%)
-2 (schwarz)	-0,07	-0,03	1,90 (53%)

Abbildung 65: Vergleich beider 2-Positionen-Assays mit jeweils einer positiven (rot) und einer negativen (schwarz) Blutprobe und dem bekannten Testaufbau

Die Messungen zur Differenzierbarkeit zwischen positiver und negativer Serumprobe in Abbildung 65 zeigen bei beiden Chips im Falle der Positivprobe einen deutlichen Anstieg bei Flusstopp und bei der Negativprobe einen Einbruch des Signals. Die Signalintensitäten der Positivproben liegen mit 3,75 nA und 3,57 nA im Bereich der zuvor gezeigten Messung mit Blutprobe +3 (3,17 nA), sowie der Messungen mit Human IgE (3,48 bzw. 2,90 nA) in Kapitel 4.3. Die Negativproben zeigen Sensorsignale, die 41% bzw. 53% der Positivsignale betragen, auch in Bezug auf die relative Signalintensität sind Positiv- und Negativpositionen also sehr gut differenzierbar.

Auffällig ist bei beiden Messungen ein „Driften“ des Sensorsignals bei der Messung im Fluss mit TBS und auch nach Zugabe von p-APP, so dass der Nullpunkt bei der Messung verschoben ist und bei der Messung im Fluss das Signal eine leicht negative Steigung aufweist. Diese Beobachtung konnte schon bei früheren Messungen gemacht werden (siehe z.B. Abbildungen 56 und 61), vorzugsweise bei Chips derselben Lieferung und bei frisch mit Schwefelsäure gespülten Chips mehr als bei beschichteten Chips. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass dieses „Driften“ auf die Differenzierbarkeit der Sensorsignale nach Flusstopp

keinen Einfluss hat (Abbildung 61). Bei oben gezeigten Messungen ist diese Abweichung auffällig aufgrund der insgesamt geringen Signalintensität und dem dadurch bedingten großen Maßstab.

Da die Auswertung des Sensorsignals erst nach Flussstop erfolgt, muss diese Unregelmäßigkeit des Messsignals, deren Ursache wohl in der Chipfertigung zu suchen ist, nicht berücksichtigt werden. Der Vergleich der Messungen in Abbildung 65 untereinander, sowie mit der Messung in Abbildung 64, belegt diese Aussage, nachdem alle Sensorsignale in Bezug auf die Steigung bei Stoppen des Flusses und die Signalintensität nach 90 Sekunden sehr gut vergleichbar sind.

Weiterhin zeigen beide Messungen in Abbildung 65, dass zum derzeitigen Zeitpunkt mit dem entwickelten Sensorsystem nur eine qualitative Aussage über das Bestehen einer Allergie getroffen werden kann. Eine quantitative Aussage über die Konzentration an spezifischem IgE im Serum kann nicht gemacht werden, die Differenzen der Sensorsignale liegen im Bereich des Messfehlers.

4.4.3 Diskussion

Die Messergebnisse in Kapitel 4.3 haben gezeigt, dass der entwickelte Testaufbau zum Nachweis von Allergen-spezifischem IgE in Serum mit Protein G', Fängerantikörper, Allergen, Analyt und Detektionsantikörper die Erwartungen eines sehr spezifischen und empfindlichen Immunosensors erfüllt. Es konnte eine sehr gute Differenzierbarkeit zwischen Positiv- und Negativproben bei einer Analytmenge im Pikogrammbereich erreicht werden, wobei die verschiedenen Chips zudem sehr gut vergleichbare Signalintensitäten aufwiesen.

Da die Signalintensitäten der Positivproben zudem sehr gut mit denen des in Kapitel 4.3 gezeigten Testaufbaus mit Human IgE übereinstimmen, ist es wahrscheinlich, dass selbst bei einer Serumverdünnung von 1:100 noch die Sättigung des Systems erreicht wird, d.h. alle Antikörperbindungsplätze auf der Elektrodenoberfläche durch den Analyten belegt sind. Um eine quantitative Aussage über die Konzentration an spezifischem IgE in verschiedenen Proben treffen zu können, müsste also eine noch größere Verdünnung gewählt werden.

Im Vergleich mit dem derzeit standardmäßig eingesetzten CAP-Test der Firma Pharmacia können zusammenfassend folgende Aussagen getroffen werden:

Ein *Vorteil* des in dieser Arbeit entwickelten Testsystems ist die große Empfindlichkeit bei geringer Serummenge. Während die Nachweisgrenze des CAP-Tests bei 0,35 kU/l (0,84

µg/ml) liegt, befindet sich der hier entwickelte Test im Bereich von 1,6 µg/ml noch in der Sättigung, es können also auch geringere Konzentrationen nachgewiesen werden. Dabei werden nur sehr geringe Analytmengen (1-10 nl) benötigt. Im Rahmen der hier gezeigten Tests wurde IgE im Pikogramm-Bereich detektiert.

Ein *Nachteil* des vorgestellten Ausleseverfahrens ist, dass zwar bis in sehr niedrige Konzentrationsbereiche die Existenz von spezifischem IgE qualitativ gezeigt werden konnte, jedoch keine quantitative Einteilung je nach Stärke der allergischen Reaktion, entsprechend den CAP-Klassen erreicht werden konnte. Da die verwendeten Blutproben nur bezüglich Der p- und nicht speziell Der p2-spezifisches IgE untersucht waren, konnte auch kein Kalibrierungsversuch durchgeführt werden.

Für die Weiterentwicklung des hier gezeigten *in vitro* Allergietests, die quantitative Konzentrationsmessungen zum Ziel haben soll, müssen genaue Untersuchungen zur Nachweisgrenze des Testaufbaus folgen, sowie eine Kalibrierung mit den entsprechenden Konzentrationsbereichen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt den systematischen Aufbau eines amperometrischen Immunosensors auf Basis von Gold-Interdigitalelektroden zur *in vitro* Diagnostik von allergischen Erkrankungen. Die einzelnen Schritte zur Entwicklung des Tests umfassten den Aufbau des Messplatzes und die Charakterisierung des amperometrischen Ausleseschritts, gefolgt von der Untersuchung eines Modellsystems und der abschließenden Übertragung der erlangten Kenntnisse auf ein System von praktischer Relevanz, den *in vitro* Allergietest.

Erste Entwicklungsschritte beinhalteten den Aufbau eines geeigneten Messplatzes (Kapitel 3), sowie eines Systems zur selektiven Beschichtung der 200 und 400 μm großen Interdigitalstrukturen (Kapitel 3.4). Der Messaufbau (Abbildung 11) basiert auf dem mikroprozessor-gesteuerten Multipotentiostaten CIPO (Abbildung 12), welcher von der Firma eBiochip Systems GmbH bezogen wurde und den dazugehörigen Sensorchips (Abbildung 13) des Fraunhofer Instituts ISIT. Durch die mitgelieferte Software ist die direkte Einlesung der Sensorsignale in Microcal Origin™ und damit eine direkte graphische Darstellung der Messsignale möglich. Der Sensorchip wird von einem Flusssystem umschlossen, welches aus einer Flusszelle, einem Zu- und Ablaufschlauch, einer externen Referenzelektrode und einer Peristaltikpumpe besteht, und den Transport des jeweiligen Substrats zum Sensorchip gewährleistet.

Zur Beschichtung der Sensoren wurde ein Mikroskop mit 100facher Vergrößerung mit einem in drei Dimensionen millimetergenau beweglichen Tisch und einer Kaltlichtquelle ausgestattet. Eine Spritze mit einem Kanülenaußendurchmesser von 300 μm wurde an dem Arm eines Mikromanipulators befestigt, der mit Hilfe eines Joysticks die mikrometergenaue Positionierung des Tropfens auf dem Sensorchip ermöglicht (Abbildung 16).

Nach Aufbau des Messsystems erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des amperometrischen Ausleseschritts mittels Redoxrecycling von p-Aminophenol (Kapitel 4.1). In einer Reihe unterschiedlicher Versuche mit unbeschichteten Sensoren wurden die Einflüsse verschiedener Faktoren auf das Sensorsignal untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dienen der Optimierung der Messbedingungen, sowie der Erkenntnis, dass das gemessene Sensorsignal neben der Konzentrationsabhängigkeit von p-Aminophenol

durch die Größe der Interdigitalstrukturen, die Reinigung der Sensoren, den pH-Wert und vor allem auch durch die Elektrodenbeschichtung beeinflusst wird.

Bei der anschließenden Entwicklung eines biologischen Testdesigns mit Maus IgG als Fängerantikörper und gleichzeitig Analyt und Anti-Maus IgG (AP) als Detektionsantikörper wurden verschiedene Methoden zur Fc-spezifischen Immobilisierung des Fängerantikörpers getestet (Kapitel 4.2).

Dabei wurden zunächst die Ergebnisse aus der Charakterisierung des Ausleseschritts berücksichtigt, die ergeben haben, dass die absoluten Stromsignale von sehr vielen Faktoren abhängen und eine Methode entwickelt, die eine aussagekräftige, vergleichbare Beurteilung der Sensorsignale ermöglicht.

Die Betrachtung der Sensorsignale bei Flussstop ermöglicht eine Einordnung in Positiv- und Negativsignale. Während das Negativsignal ohne enzymmarkierten Detektionsantikörper ebenso wie eine unbeschichtete Position bei Flussstop einbricht, zeigt das Positivsignal an dieser Stelle einen steilen Anstieg. Um eine reproduzierbare Auswertung der Sensorsignale zu ermöglichen, wurden die Signale nach Flussstop nach einer relativen Methode bewertet, bei der der Signalintensität des Positivsignals 90 Sekunden nach Flussstop der Wert von 100% zugeordnet wird und die Negativsignale relativ dazu beurteilt werden. Mit dieser Methode konnten sehr gut reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden, deren geschätzter Fehler bei etwa 5%-10% lag.

Zielsetzung bei der Untersuchung der verschiedenen Immobilisierungsmethoden war, eine sehr gute Differenzierbarkeit zwischen Positiv- und Negativsignal (=unspezifische Bindungen) bei einer möglichst hohen Signalintensität zu bekommen.

Zunächst wurde die Immobilisierung von Maus IgG mittels einer selbstorganisierten Cysteamin-Monolage und anschließender Peptidkopplung getestet (Kapitel 4.2.3.1). Die Unterdrückung der unspezifischen Bindung des Detektionsantikörpers durch die Cysteamin-Beschichtung erwies sich dabei als sehr erfolgreich, durch die dichte Oberflächenbelegung der Elektrode konnten jedoch nur sehr geringe Signalintensitäten ausgelesen werden. Vergleichsweise gemessene unspezifische Antikörperbindungen auf Gold ergaben bis zu dreimal größere Messsignale.

In der Hoffnung dieselbe Spezifität der Bindung bei einer höheren Signalintensität erreichen zu können, wurde Cysteamin vor der Beschichtung als eine Art „Anker“ an Maus IgG gekoppelt (Kapitel 4.2.3.3). Mit dieser Methode konnte jedoch keine Differenzierbarkeit zwischen Positiv- und Negativsignal erreicht werden, auch Blockversuche mit einem unfunktionalisierten Thiol und BSA blieben diesbezüglich ohne Ergebnis.

Alternativ wurde die Immobilisierung des Fängerantikörpers mittels Avidin-Biotin-Technologie untersucht (Kapitel 4.2.4). Diese Methode beruht auf der adsorptiven Bindung von Avidin an der Elektrodenoberfläche und anschließender spezifischer Bindung eines biotinylierten Antikörpers. Da die durchgeführten Messungen jedoch zum einen eine recht hohe Oberflächenbelegung, also geringe Signalintensitäten gezeigt haben, zum anderen das Sensorsignal der Positivprobe mit biotinyliertem Fängerantikörper geringer war als das der unspezifischen Bindung von nicht-biotinyliertem Antikörper, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Ebenfalls auf einer unspezifischen Adsorption an der Oberfläche und anschließender spezifischer Antikörperbindung beruht die Immobilisierung mittels Protein A, G oder G'. In diesem Fall bildet der Antikörper ohne weitere Modifizierung mit dem Fc-Fragment einen Affinitätskomplex mit dem Protein aus und kann so sehr spezifisch immobilisiert werden. Entsprechend konnten mit dem Protein A-System auch die besten Ergebnisse beim Aufbau eines biologischen Testdesigns erzielt werden. Die Signalintensität nach der Protein-Beschichtung war in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Elektrodenbelegung sehr hoch und die Differenzierbarkeit war mit einem Negativsignal von ~55% bei Verwendung von BSA als Blockreagenz sehr gut. Weiterhin konnte mit dem Protein A-BSA-System und der oben beschriebenen relativen Auswertemethode eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erzielt werden. Weiterführende Untersuchungen mit Protein A und anderen Blockreagenzien bzw. anderen Antikörpern, sowie mit Protein G und G' und zur Langzeitstabilität und Regenerierbarkeit der beschichteten Chips haben zu dem Ergebnis geführt, dass jede der Veränderungen am biologischen Aufbau eine erhebliche Abweichung im Sensorsignal mit sich bringt. Soll ein anderes Immunglobulin als Maus IgG an die Elektrodenoberfläche gebunden werden, muss der Testaufbau also neu optimiert werden.

Diese Erkenntnis wurde bei der Entwicklung eines Testaufbaus zum Nachweis von Der p2-spezifischem IgE (*in vitro* Hausstaubmilben-Allergietest) umgesetzt (Kapitel 4.3), indem zunächst die Einzelreaktionen optimiert wurden und erst anschließend in einem kompletten Testaufbau kombiniert wurden. Während im Testdesign Maus IgG Fängerantikörper und Analyt in einem darstellte, wurde dieser eine Schritt für den Aufbau des Allergietests durch drei ersetzt: der Fängerantikörper dient zur Immobilisierung des Allergens, welches wiederum den Analyten bindet. Versuche zur Immobilisierung des Fängerantikörpers ergaben die besten Ergebnisse für die Immobilisierung mittels Protein G'. Für den erfolgreichen Aufbau des Allergietests erwies sich zudem der Einsatz eines rekombinanten Allergens als unumgänglich, mit dem schließlich der selektive Nachweis von Der p2-spezifischem IgE möglich war.

Bei der Entwicklung des Testaufbaus zum *in vitro* Nachweis von Hausstaubmilbenallergie sowie beim Einsatz von Patientenserum als Analyt (Kapitel 4.4) konnte weiterhin festgestellt werden, dass falsch-positive Messergebnisse nicht erzielt wurden. Besonders bei der Untersuchung der Blutproben war die Differenzierbarkeit zwischen Positiv- und Negativprobe sehr gut, ohne dass der Einsatz von Blockreagenzien erforderlich war.

Es konnte also gezeigt werden, dass trotz des komplizierten biologischen Aufbaus des Tests der *in vitro* Nachweis einer Hausstaubmilbenallergie mit dem in dieser Arbeit entwickelten Messsystem möglich ist und sich durch eine sehr gute Empfindlichkeit und Selektivität auszeichnet. Leider konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen mit Patientenserum bislang nur eine qualitative Aussage über das Bestehen einer allergischen Erkrankung getroffen werden. Weiterführende Messungen, die eine genaue Bestimmung des messbaren Konzentrationsbereiches, sowie eine Kalibrierung mit bekannten Konzentrationen an spezifischem IgE beinhalten sollten, müssen zeigen, ob mit dem entwickelten Testaufbau auch eine quantitative Einordnung analog den kommerziell gebräuchlichen Tests vollzogen werden kann.

Anhang

A.1 Durchführung von Messungen mit dem Mikropotentiostaten CIPO

Die beschriebenen Messungen mit dem Mikropotentiostaten CIPO der Firma eBiochip GmbH Itzehoe wurden nach folgendem Messprotokoll durchgeführt:

- Potentiostaten einschalten, Rechner starten.
- Einbauen des Chips in die Flusszelle, Schläuche anstecken, Referenzelektrode anschließen, Zulaufschlauch in ein Vorratsgefäß mit der gewünschten Lösung eintauchen, ein Sammelgefäß unter den Ablaufschlauch stellen.
- Fluss starten, mit NaCl-Lösung oder Puffer spülen, dabei Luftblasen aus dem Flusssystem entfernen.
- Chip mit dem Potentiostaten kontaktieren.
- MCDDE.exe starten, gewünschtes Messprogramm („file“, z.B. „Sibanat.prm“) aufrufen.
- ORIGIN starten, „Messvorlage.opj“ öffnen.
- In MCDDE Dialogbox „Elektrodes“ im Menü „Mikrocontroller“-„Parameter“ öffnen, die angelegten Potentiale an den einzelnen Elektroden überprüfen, Kanäle auswählen, Messintervall einstellen (z.B. 500 ms), „ok“ drücken.
- „send“ drücken, um die Einstellungen an den Potentiostaten zu übermitteln.
- Im Display des Potentiostaten erscheint zunächst „ACF device zero adjustment“, dann „initialisation successful“.
- Im Fenster des MCDDE-Programms erscheint „INITIALIZED“.
- Drücken des grünen Startpfeils im MCDDE zum Starten der Messung, die Messpunkte werden aufgenommen, in das Origin Worksheet eingetragen und die Messwerte in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.
- Um während der Messung die Lösung zu wechseln, zunächst die Pumpe abstellen, dann das Gefäß wechseln und die Pumpe wieder anstellen.
- Um die Messung zu stoppen, den roten Stopknopf in MCDDE drücken, wird anschließend wieder Start gedrückt, fährt die Messung am selben Punkt fort, wie sie abgebrochen wurde.

- Um eine neue Messung zu starten, muss der obige Initialisierungsprozess wiederholt werden.

A.2 Durchführung von Messungen mit dem Mikropotentiostaten MCP-2

Einige Messungen zur den Eigenschaften des Redoxrecycling von p-AP wurden mit dem Mikropotentiostaten MCP-2 der Firma Bank Elektronik Clausthal-Zellerfeld durchgeführt. Da dieser nur über zwei Messkanäle verfügt, wurde in diesem Fall nur eine Interdigitalstruktur ausgelesen. Die Kontaktierung des ISIT-Siliziumchips mit dem Potentiostaten erfolgte über eine passende Steckerleiste, die Ausgang A des Mikropotentiostaten mit Arbeitselektrode 2 (schwarzer Stecker), Referenzelektrode (grüner Stecker) und Gegenelektrode (gelber Stecker) verknüpft und Ausgang B mit Arbeitselektrode 1 (Abbildung von dem Stecker).

Der Mikropotentiostat ist an einen Frequenzmodulator, ein Multimeter und einen Rechner angeschlossen, so dass die Spannungsvorschubgeschwindigkeit sowohl manuell eingestellt, als auch von außen eingepreßt werden kann und die Messwerte direkt in Origin eingelesen werden können (Abbildung 66).

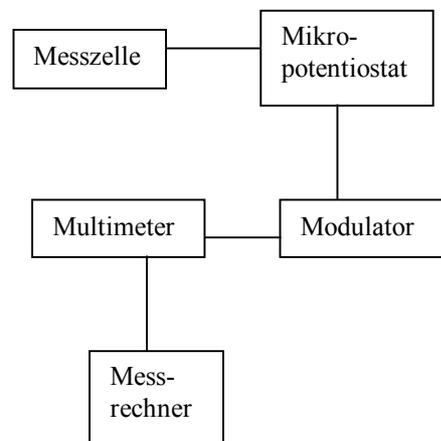


Abbildung 66: Schema des Messaufbaus für die Messung mit dem Mikropotentiostaten MCP-2 der Firma Bank Elektronik.

Zur Durchführung der Messungen wurde der kontaktierte Chip senkrecht in die zu messende p-AP-Lösung getaucht, bis die Interdigitalstrukturen vollständig benetzt waren. Die Messungen erfolgten in nicht gerührter Lösung.

1. Messung mit konstanter Spannung (interne Spannungsvorgabe)

Die Messung des Redoxrecycling einer p-AP-Lösung mit konstanter Spannung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Einschalten des Mikropotentiostaten über „Line On“.
- Kippschalter „CI“ auf „int“ einstellen.
- Kippschalter „Select“ auf A bzw. B einstellen und manuell die gewünschte Spannung bei „Control Voltage A bzw. B“ einstellen.
- Multimeter einschalten.
- Programm „Bio_top“ starten, Kanäle 1 (Potentialausgang AE1), 2 (Stromausgang AE1), 3 (Potentialausgang AE2) und 4 (Stromausgang AE2) auswählen, die gewünschte Anzahl an Meßpunkten eintragen und Messung starten.
- Origin startet automatisch, die Tabellenwerte in Spalte C und E entsprechen den gemessenen Strömen an den Elektroden 1 und 2. Zur Auswertung werden die Beträge beider Spalten addiert, um den Gesamtstrom zu erhalten.

2. Messung mit veränderlichen Spannungen (cycl. Voltammetrie):

Mit Hilfe des Frequenzmodulators ist es auch möglich, die Spannungsvorschubgeschwindigkeit automatisch festzulegen und Messungen zur cyclischen Voltammetrie durchzuführen:

- Einschalten des Mikropotentiostaten über „Line On“.
- Kippschalter „CI“ auf „ext“ einstellen.
- Frequenzmodulator einschalten, die eingestellte Frequenz von 1,428 mHz entspricht einer Spannungsvorschubgeschwindigkeit von 1 mV/s. Die Frequenz kann durch die Pfeiltasten am Modulator bei Bedarf verändert werden.
- Multimeter einschalten.
- Programm „Bio_top“ starten, Kanäle 1 (Potentialausgang AE1), 2 (Stromausgang AE1), 3 (Potentialausgang AE2) und 4 (Stromausgang AE2) auswählen, die gewünschte Anzahl an Meßpunkten eintragen und Messung starten.
- Origin startet automatisch, die Tabellenwerte in Spalte C und E entsprechen den gemessenen Strömen an den Elektroden 1 und 2. Zur Auswertung werden die Beträge beider Spalten addiert, um den Gesamtstrom zu erhalten.

A.3 Bestimmung von Gesamtschwefel in Proteinen

Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst, falls Puffersalze enthalten waren, mittels Sephadex PD10-Kolonnen entsalzt (e) und bei 60°C im Trockenschrank getrocknet.

Die Bestimmung des Schwefelgehalts der als Blockreagenzien bzw. als Proteinlayer oder Antikörper verwendeten Proteine wurde von der Firma Infracor in Marl mit nachfolgend beschriebenen Messaufbau durchgeführt.

Gerätebeschreibung:

Mit dem Analysensystem Antek, 9000NS lassen sich Gesamtschwefel und Gesamtstickstoff in chemisch gebundener Form einfach und schnell analysieren. Das System ist rechnergesteuert, somit lassen sich die meisten Analysen automatisieren. Die im Modell 9000NS angewandte Analysenmethode entspricht der ASTM D 4629 und ASTM D 6069 (Pyro-Chemiluminiszenz für Stickstoff) und der ASTM D 5453 (Pyro-Fluoreszenz für Schwefel). Die Dosierung der flüssigen Proben erfolgt mit dem vollständig rechnergesteuerten Autosampler Modell 738 gemäß Bedienungsanleitung.

Verbrennungseinheit:

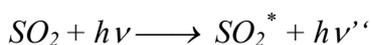
Die Proben werden im Sauerstoffstrom in einem Quarzrohr verbrannt. Argon oder Helium dienen als Trägergas. Die Temperatur des Ofens ist dabei konstant und bis zu 1100°C einstellbar. Das Verbrennungsgas gelangt anschließend über einen Membrantrockner zum Detektor. Sämtliche Gasflüsse werden über elektronische Massenflusskontroller per Rechner gesteuert.

Fluoreszenz Schwefel-Detektor:

Im Pyrolyse-Ofen werden alle Schwefelverbindungen zu SO₂ oxidiert:



Der Gasstrom passiert zur Trocknung einen Membrantrockner und wird in der Reaktionskammer mit UV-Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt.



Das angeregte SO_2^* fluoresziert in einem anderen Wellenlängenbereich. Die Fluoreszenz ist der Konzentration von Schwefel in der Probe direkt proportional und wird von einem Photomultiplier gemessen.

Ergebnisse:

Probe 1(e): "Maus IgG" und Probe 2(e): "Maus IgG - Cysteamin"

Beide Proben konnten nur qualitativ untersucht werden. In beiden Proben wurde Schwefel nachgewiesen.

Probe 3: "Protein A"

Einwaage 0,176 mg, Befund 0,12 % S, gesch. Fehler 20-30%

Probe 4: "Protein G"

Einwaage 0,239 mg, Befund 0,24 % S, gesch. Fehler 20-30%

Probe 5(e): "Protein G"

Einwaage 0,077 mg, Befund <0,1 % S

Probe 6(e): "Avidin - Agarose"

Einwaage 2,291 mg und 1,498 mg, Befund <0,1 % S

Probe 7: "BSA"

Einwaage 1,915 mg und 1,737 mg, Befund 1,71 und 1,72 % S, gesch. Fehler 5%

Probe 8(e): "Casein"

Einwaage 2,163 mg, 2,150 mg, 2,337 mg, Befund 0,73, 0,76 und 0,79 % S, gesch. Fehler 5%

Probe 9: "Eialbumin"

Einwaage 0,813 mg, Befund 1,65 % S, gesch. Fehler: 10%

Probe 10: "Gelatine"

Einwaage 1,377 mg und 1,913 mg, Befund 0,73 und 0,75 % S, gesch. Fehler 5%

A.4 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovine Serum Albumin
C2-IgG	Maus IgG vor der Beschichtung an Cysteamin gekoppelt
C2+IgG	Cysteamin-Monolayer mit anschließender Kopplung an Maus IgG
Ch1	Chimärer Antikörper aus Maus IgG und Human IgE
1D8	Monoklonaler Antikörper gegen Der p2
Der p2	Hausstaubmilbenallergen
rDer p2.0102	Rekombinante Form des Allergens
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDC	N-Ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EIA	Enzymimmunoassay
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
Ig	Immunglobulin
IDS	Interdigitalstruktur
kDa	Kilo Dalton
MES	Mercaptoethansulfonsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAS	Polyacrylsäure
p-AP	p-Aminophenol
p-APP	p-Aminophenylphosphat
RIA	Radioimmunoassay
SAM	Self assembled monolayer
TBS	Tris buffered saline

A.5 Verwendete Reagenzien

Anti-Maus IgG (AP) (Ziege) monoklonal	Sigma
Anti-Ziege IgG (AP) (Maus) monoklonal	Sigma
Anti-Human IgE (AP) monoklonal	Sigma
Anti-Human IgE (AP) monoklonal	KPL
Avidin-Agarose	Sigma
BSA	Sigma
Butanthiol	Fluka
Ch1	Indoor biotechnologies
Cysteamin	Fluka
Cysteamin-Hydrochlorid	Fluka
Casein	Fluka
1D8	Indoor biotechnologies
Der p2 standard	Indoor biotechnologies
rDer p2.0102	Indoor biotechnologies
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
EDC	Fluka
Eialbumin	Fluka
Gelatine	Fluka
HOBT	Fluka
Human IgE (Serum) polyklonal	ICN
Maus IgG (Serum) polyklonal	Sigma
Mercaptoethansulfonsäure	Fluka
Milchpulver	Fluka
NaCl	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
p-Aminophenol	Sigma
p-Aminophenylphosphat	ICN
Polyacrylsäure	Fluka
Protein A	Sigma
Protein G (rekombinant)	Sigma
Protein G' (rekombinant)	Sigma
Schwefelsäure 99%	Sigma
TBS-Puffertabletten (pH 7,6)	Sigma
Tween 20 (Ampullen)	Fluka
Wasser (HPLC)	Sigma

Phosphatpuffer:

- Phosphat-Puffer, pH=6,0, c=2mmol/l (2,14mg Na₂HPO₄, 29,2mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)
- Phosphat-Puffer, pH=6,3, c=2mmol/l (4,3mg Na₂HPO₄, 27,5mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)
- Phosphat-Puffer, pH=6,6, c=2mmol/l (7,12mg Na₂HPO₄, 24,8mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)
- Phosphat-Puffer, pH=7,0, c=2mmol/l (13,9mg Na₂HPO₄, 19,0mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)
- Phosphat-Puffer, pH=7,3, c=2mmol/l (19,9mg Na₂HPO₄, 13,7mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)
- Phosphat-Puffer, pH=7,6, c=2mmol/l (25,6mg Na₂HPO₄, 8,7mg NaH₂PO₄ in 100ml H₂O)

A.6 Beschichtung der Sensorchips

Sofern nicht anders beschrieben wurden die Sensorchips zur Vorbereitung einer Messung zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure dann mit destilliertem Wasser gespült und ihre Funktionsfähigkeit mit einer 10^{-4} molaren p-Aminophenollösung in 0,1 molarer NaCl getestet. Anschließend wurden sie erneut mit destilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Beschichtung der Interdigitalstrukturen erfolgte mit der in Kapitel 3.4 beschriebenen Vorrichtung, die Reagenzien wurden in einer Konzentration von 1mg/ml eingesetzt, wie angegeben verdünnt und jeweils 1 Tropfen pro Position aufgetragen. Während der Beschichtungszeit, die wenn nicht anders angegeben 1 Stunde betrug, wurde der Sensorchip in einem verschlossenen Wägegläschen mit einem puffergetränkten Vlies aufbewahrt, um ein Austrocknen des Tropfens zu verhindern. Zwischen den einzelnen Beschichtungsschritten wurde dreimal mit 1 ml destilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet, um einen weiteren selektiven Beschichtungsschritt zu ermöglichen. Nach der Belegung des Chips mit Detektionsantikörper wurde mit TBS-Puffer gespült und der Sensor in die Flusszelle eingebaut.

Literatur

1. *Kräftige Expansion im Markt für Biosensoren.* Sensor magazin, 1999. **2/99**: p. 40.
2. van Emon, J.M. and V. Lopez-Avila, *Immunochemical methods for environmental analysis.* Anal. Chem., 1992. **64**: p. 79A-89A.
3. Kronkvist, K., et al., *Determination of Drugs in Biosamples at Picomolar Concentrations using Competitive ELISA with Electrochemical Detection: Application to Steroids.* Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1993. **11**(6): p. 459-467.
4. Märtlbauer, E., G. Terplan, and B. Lang, *Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch.* Arch. Lebensmittelhyg., 1992. **43**: p. 77-79.
5. Brecht, A. and G. Gauglitz, *Label free optical immunoprobes for pesticide detection.* Analytica Chemica Acta, 1997. **347**: p. 219-233.
6. Barzen, C., et al. *TIRF-Immunoassay zum simultanen Nachweis verschiedener Umweltschadstoffe.* 1998.
7. Hintsche, R., et al., *Microbiosensors using electrodes made in Si-technology,* in *Frontiers in Biosensorics I - Fundamental Aspects.* 1997. p. 267 - 283.
8. Jäger, L., *Klinische Immunologie und Allergologie.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1989.
9. Howard, J., E. Rothenberg, and J. Streilein, *Grundbegriffe der Immunologie.* Immunologie (Hrsg. Janeway, C. & Travers, P.), 1995(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg): p. 1-43.
10. Liebers, V. and e. al., *Overview on denominated allergens.* Clinical and Experimental Allergy, 1996. **26**: p. 494-516.
11. Bieber, T., *Fc epsilon RI on antigen-presenting cells.* Curr. Opin. Immunol., 1996. **8**(6): p. 773-777.
12. Geha, R. and e. al., *Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion.* Immunologie (Hrsg. Janeway, C. & Travers, P.), 1995(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg): p. 489-538.
13. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**: p. 495-497.
14. Roitt, I.M., J. Brostoff, and D.K. Male, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie.* 1995. **3. Aufl.**(Thieme Verlag, Stuttgart, New York).
15. <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/migg2a.html>.

16. Harris, L.J., S.B. Larsson, and K.W. Hasel, *The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma*. Nature, 1992. **360**: p. 369.
17. Harris, L.J., S.B. Larsson, and K.W. Hasel, *Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody*. Biochemistry, 1997. **36**: p. 1581.
18. Coombs, R. and P. Gell, *Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity and disease*. Clin. Aspects Immunology (Hrsg. Gell, P., Coombs, R. & Lachmann, P.), 1975(Blackwell Scientific Oxford): p. 761-781.
19. Buisseret, P.D., *Allergie: Wenn die Immunantwort Fehler macht*. Spektrum der Wissenschaft: Immunsystem, 1988(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg): p. 140-150.
20. Lehninger, A., D. Nelson, and M. Cox, *Die dreidimensionale Struktur von Proteinen*. Prinzipien der Biochemie, 1994(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg): p. 177-223.
21. Aalberse, R., *Structural biology of allergens*. J. Allergy Clin. Immunol., 2000. **106**: p. 228-238.
22. van Oss, C.J., *Antigen-Antibody-Reactions*. Structure of antigens (van Regenmortel, M.H.V.), 1992(CRC Press, Boca Raton): p. 99-125.
23. Alberts, B., D. Bray, and J. Lewis, *Molekularbiologie der Zelle*. 1990. **2.Auflage**(VCH Weinheim).
24. Neri, D., S. Montigiani, and P.M. Kirkham, *Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities*. TIBTECH. **14**: p. 465-470.
25. Steward, W.M. and J. Steensgaard, *Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance*. CRC Press, Florida, 1983.
26. Niessner, R. and e. al., *Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides*. Fresenius J.Anal. Chem., 1997. **358**: p. 614-622.
27. Thévenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications*. IUPAC Recommendations, 1999.
28. Skladal, P., *Advances in Electrochemical Immunosensors*. Electroanalysis, 1997. **9**(10): p. 737-745.
29. Scheller, F. and F. Schubert, *Biosensoren*. 1989(Birkhäuser Verlag, Basel).
30. Uttenthaler, E., C. Köblinger, and S. Drost. *Quartz crystal biosensor for the detection of the African Swine Fever disease*. 1998.
31. Krapf, R., *Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen*. Dissertation, 2001(Tübingen).

32. Marco, M.-P. and D. Barcelo, *Environmental applications of analytical biosensors*. Meas. Sci. Techn., 1996. **7**: p. 1547-1562.
33. Paeschke, M., et al., *Voltammetric Multichannel Measurements Using Silicon Fabricated Microelectrode Arrays*. Electroanalysis, 1996. **8**(10): p. 891 - 898.
34. Schindler, F., *Real-Time BIA*. BioTec 1, 1992: p. 36-43.
35. Lyon, L.A., et al., *Surface plasmon resonance of colloidal Au-modified gold films*. Sensors and Actuators B, 1999. **54**: p. 118 - 124.
36. Weller, M.G., *Immunoassays für die Umweltanalytik*. Nachr. Chem. Techn. Lab., 1997. **45**: p. 1090-1094.
37. Tijssen, P., *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Hrsg. Burdon R.H. & van Knippenberg, P.H.), 1985. **15**(Elsevier, Amsterdam).
38. Bier, F.F., E. Ehrentreich-Förster, and e. al., *Ultrasensitive Biosensors*. Sensors and Actuators, 1996. **B33**: p. 5-12.
39. Gregorius, K., S. Mouritsen, and H.I. Elsner, *Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid phases*. Journal of immunological methods, 1995. **181**: p. 65-73.
40. Millot, M.-C., et al., *Immobilization of antibodies onto gold and titanium oxide surfaces*. The international Society for optical, 1995. **2508**: p. 160-7.
41. Duschl, C., A. Sevin-Landais, and H. Vogel, *Surface Engineering: Optimization of Antigen Presentation in Self-Assembled Monolayers*. Biophysical Journal, 1996. **70**: p. 1985-1995.
42. Nuzzo, R.G., L.H. Dubois, and D.L. Allara, J. Am. Chem. Soc., 1990. **112**: p. 558-569.
43. Whitesides, G. and P.E. Laibinis, Langmuir, 1990. **6**: p. 87-96.
44. Weisshaar, D.E., B.D. Lamp, and M.D. Porter, J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**: p. 5860-5862.
45. Schlenoff, J., M. Li, and H. Ly, *Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers*. J. Am. Chem. Soc., 1995(117): p. 12528-12536.
46. Hähner, G., et al., Langmuir, 1993. **9**(1955-1958).
47. Rong, H., et al., *On the Importance of Headgroup Substrate Bond in Thiol Monolayers: A Study of Biphenyl-Based Thiols on Gold and Silver*. Langmuir, 2000.
48. van Velzen, E.U.T., *Dissertation*. Universität Twente, 1994.
49. Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc., 1963. **85**: p. 2149-2154.

50. Sheehan, J.C. and G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955. **77**: p. 1067-1068.
51. König, W. and R. Geiger, *Chem. Ber.*, 1970. **103**: p. 788-789.
52. Meienhofer, J., *The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptid Synthesis*. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology (Hrsg.: Gross, E., Meierhofer, J.), 1975-1987. **1-9**(Academic Press, New York): p. Ch. 6.
53. <http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html>.
54. Finn, F. and K. Hofmann, *Synthesis of Biotinyl Derivates of Peptide Hormones and Other Biological Materials*. *Methods in Enzymology*, 1985. **109**: p. 418-445.
55. Wilchek, M. and E. Bayer, *Introduction to Avidin-Biotin Technology*. *Methods in Enzymology*, 1990. **185**: p. 5-13.
56. Cooper, *Biochemische Arbeitsmethoden*. 1981(De Gruiter Verlag, Berlin).
57. Kronvall, G. and et.al, *J. Immunol.*, 1970. **104**: p. 140-147.
58. Richman, D.D. and et.al, *J. Immunol.*, 1982. **128**: p. 2300-2305.
59. Langone, J.J., *J. Immunol. Meth.*, 1978. **24**: p. 269-285.
60. Ey, P.L. and et.al, *Immunochemistry*, 1978. **15**: p. 429-436.
61. Kronvall, G., *J. Immunol.*, 1973. **111**: p. 1401-1406.
62. Kerstrom, B. and L. Bjork, *J. Biol. Chem.*, 1986. **261**: p. 10240-10247.
63. Kerstrom, B., *J. Immunol.*, 1985. **135**: p. 2589-2592.
64. Bjork, L. and B. Kerstrom, *J. Immunol.*, 1984. **133**: p. 969-974.
65. Goward, C.R. and et.al, *Biochem. J.*, 1990. **267**: p. 171.
66. De Chateau, M. and et.al, *Scand. J. Immunol.*, 1993. **37(4)**: p. 399-405.
67. Horisberger, M. and M.F. Clere, *Labelling of Colloidal Gold with Protein A*. *Histochemistry*, 1985. **82**: p. 219-223.
68. König, B. and M. Grätzel, *A Piezoelectric Immunosensor for Hepatitis Viruses*. *Anal. Chim. Acta*, 1995. **309**: p. 19-25.
69. Davis, K.A. and T.R. Leary, *Continuous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for Kinetic Immunoassays*. *Anal. Chem.*, 1989. **61**: p. 1227-1230.
70. Hintsche, R. and M. Paeschke, *Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen*, in *Patentschrift DE 19610115C2*. 2000: Deutschland.
71. Styryer, L., *Lehrbuch der Biochemie*, ed. K.-D.E.E. Einführung. 1990, Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH.
72. McComb, R.B., G.N. Bowers, and S. Posen, *Alkaline Phosphatase*. Plenum Press New York, 1979.
73. Moss, D.W., *Alkaline Phosphatase isoenzymes*. *Clin. Chem.*, 1982. **28**: p. 2007-2016.

74. Atkins, P.W., *Physikalische Chemie*, ed. H.A. Höpfner. Vol. Zweite Auflage: VCH Verlag Weinheim.
75. Wedler, G., *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*: VCH Verlag Weinheim.
76. Heinze, J., *Cyclovoltammetrie, die "Spektroskopie des Elektrochemikers"*. *Angewandte Chemie*, 1984. **96**: p. 823-840.
77. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*. John Wiley & sons, 1980.
78. Elias, H.G., *Makromoleküle*. Vol. 6. Auflage. 1999: VCH Weinheim. 341.
79. Hamann, C.H. and W. Vielstich, *Elektrochemie II, "Elektrodenprozesse, Angewandte Elektrochemie"*. Verlag Chemie, 1981(Weinheim).
80. Brett, C.M.A. and A.M.O. Brett, *Electrochemistry: principles, methods and applications*. 1993: Oxford University Press.
81. Kakiuchi, T., et al., *Miscibility of Adsorbed 1-Undecanethiol and 11-Mercaptodecanoic Acid Species in Binary Self-Assembled Monolayers on Au(111)*. *Langmuir*, 2001. **17**: p. 1599-1603.
82. Abad, J.M., et al., *Anal. Chim. Acta*, 1998. **368**: p. 183-189.
83. Uttenthaler, E., C. Kößlinger, and S. Drost, *Biosensors & Bioelectronics*, 1998. **13**: p. 1279-1286.
84. König, B. and M. Grätzel, *Anal. Chim. Acta*, 1993. **276**: p. 329-333.
85. König, B. and M. Grätzel, *Anal. Lett.*, 1993. **26(8)**: p. 1567-1585.
86. Kößlinger, C., et al., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994. **349**: p. 349-354.
87. Pei, R.J., et al., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998. **73**: p. 59-63.
88. Tessier, L., et al., *Anal. Chim. Acta*, 1997. **347**: p. 207-217.
89. Prime, K.L. and G. Whitesides, *Science*, 1991. **252**: p. 1164-1166.
90. Delamarche, E., et al., *Langmuir*, 1996. **12**: p. 1997-2006.
91. Dong, S. and J. Li, *Bioelectr. and Bioenerg.*, 1997. **42**: p. 7-13.
92. Platts-Mills, T.A.E., D. Vervloet, and W. Thomas, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997. **100**: p. 1-24.
93. Thomas, W. and W. Smith, *Allergy*, 1998. **53**: p. 821-832.
94. Smith, A., D. Benjamin, and U. Derewenda, *Sequence Polymorphisms and Antibody Binding to the Group 2 Dust Mite Allergens*. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 2001. **124**: p. 61-63.
95. Smith, A., D. Benjamin, and N. Hozic, *The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001: p. 977-984.

Danke...

...möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Hiller und Prof. Dr. Erich Sackmann sagen, die die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit übernommen haben und mir damit die Promotion an der Technischen Universität München ermöglichen. Jeder Doktorand kann sich eine solch unkomplizierte und herzliche Betreuung nur wünschen. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Oskar Nuyken für die Übernahme des Drittgutachtens und Prof. Dr. Peter Schieberle für den Vorsitz in der Prüfungskommission.

...Prof. Dr. Hans Meixner für die Möglichkeit diese Arbeit mit Unterstützung der Firma Siemens und speziell der CT PS 8 anfertigen zu können.

...Fr. Dr. Elfriede Simon für die interessante Aufgabenstellung und das von ihr entgegengebrachte Interesse. Ihr und Dr. habil. Max Fleischer möchte ich zudem für die Korrektur der Arbeit und einige sinnvolle Anregungen danken.

...sage ich auch Dr. Roland Pohle, Reinhard Freitag, Dr. Tom Weh, Dr. Remigiusz Pastusiak, Fr. Dr. Jian Gong, (cand. Dr.) Ralf Schneider, Fr. Dr. Kerstin Wiesner und den vergessenen Kollegen der CT PS 8 für nette Unterhaltungen jenseits von fachlichen Fragestellungen, sowie Ingo Finck für die bevorzugte Behandlung nicht nur bei diversen Bestellungen.

...Jörg Albers und Dr. Eric Nebling vom Fraunhofer Institut ISIT Itzehoe für die Versorgung mit Sensorchips und einige hilfreiche Tipps.

...Prof. Dr. Markus Ollert und Fr. Johanna Grosch für die Bereitstellung der Serumproben.

...vor allem meinen Eltern für ihr Vertrauen, dass jahrelange Unterstützung irgendwann zum Erfolg führt, meinen Freunden für die Ablenkung und Vanja für alles, was das Leben sonst noch lebenswert macht.