

**Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse  
in markierungsfreien Bindungsassays**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

KERSTIN LÄNGE

Tag der mündlichen Prüfung:

20.12.2000

Dekan:

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Heinz Oberhammer

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Außerdem möchte ich ihm für seine stete Unterstützung und für das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, danken.

Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit, das seine freundliche Übernahme des Koreferats ermöglichte.

Herrn Dr. Andreas Brecht möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die mir viele wertvolle Anregungen für diese Arbeit lieferte, danken.

Bei Herrn Dr. Tuan Vo-Dinh und Herrn Dr. Guy de Griffin möchte ich mich für die Bereitstellung der polyklonalen Antikörper gegen Benz(a)pyren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Geis-Gerstorfer, Herrn Dr. Lutz Scheideler, Herrn Dr. Hans-Peter Wendel und Herrn Dipl.-Chem. Martin Herold danke ich für die gute Zusammenarbeit beim von der DFG geförderten Projekt „Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate und deren Wirkung auf humorale, zelluläre und bakterielle Interaktionen in-vitro“.

Herrn Prof. Dr. W. Göpel<sup>†</sup> gilt mein Dank für die Unterstützung dieser Arbeit durch Institutsmittel.

Den Netzwerkbeauftragten, vor allem Herrn Dr. Hans-Martin Haake und Herrn Dipl.-Chem. Alexander Jung, danke ich für ihren ausdauernden Einsatz in der Netzwerkbetreuung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Gauglitz, insbesondere bei denen der Biogruppe, für deren Hilfsbereitschaft und Motivation bedanken. Die angenehme Arbeitsatmosphäre trug erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Motivation der Arbeit.....	1
1.2	Zielsetzung und Gliederung der Arbeit.....	3
2	Theoretische Grundlagen .....	5
2.1	Fließ-Injektions-Analyse (FIA).....	5
2.1.1	Prinzip .....	5
2.1.2	Probentransport: Vorgänge im Trägerstrom .....	5
2.1.2.1	Laminare Strömung.....	5
2.1.2.2	Konvektion.....	6
2.1.2.3	Diffusion .....	7
2.1.2.4	Dispersion .....	8
2.1.2.5	Dispersionskoeffizient .....	10
2.1.3	Durchflußsysteme zur Probenhandhabung: Einige Beispiele.....	13
2.1.3.1	Continuous-Flow-Methoden .....	13
2.1.3.2	Fließ-Injektions-Analyse (FIA) .....	13
2.1.3.3	Sequentielle Injektions-Analyse (SIA) .....	14
2.2	Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIFS) .....	15
2.2.1	Prinzip .....	15
2.2.2	Optische Grundlagen.....	16
2.2.2.1	Mehrfachreflexion an dünnen Schichten .....	16
2.2.2.2	Einschichtsysteme .....	17
2.2.2.3	Multischichtsysteme .....	18
2.2.2.4	Beschreibung von Interferenzspektren .....	20
2.2.3	Bindungsassays mit RIFS .....	20
2.3	Immunoassays mit markierungsfreier Detektion .....	21
2.3.1	Das Antigen/Antikörper-System.....	21

---

2.3.1.1	Herstellung der Antikörper .....	21
2.3.1.2	Eigenschaften der Antikörper .....	21
2.3.1.3	Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes .....	22
2.3.2	Kinetik und Thermodynamik der Wechselwirkungsprozesse während eines Immunoassays mit markierungsfreier Detektion....	23
2.3.2.1	Wechselwirkungsprozesse im Überblick.....	23
2.3.2.2	Kinetische Betrachtungen .....	24
2.3.2.3	Thermodynamische Betrachtungen .....	29
2.3.3	Immunoassay mit FIA und markierungsfreier Detektion am Beispiel des Bindungshemmtests.....	33
2.3.3.1	Bindungshemmtest für die Affinitätstitration .....	33
2.3.3.2	Bindungshemmtest mit Gradientenansatz .....	35
2.4	Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate.....	36
2.4.1	Anforderungen an Implantate .....	36
2.4.2	Dentale Titan-Implantate .....	37
2.4.3	Biofunktionalisierung und Kontrolle der Modifizierung.....	38
3	Materialien und Methoden .....	40
3.1	Materialien .....	40
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	40
3.1.2	Lösungen.....	41
3.1.2.1	Lösungen für die Bindungsassays (Abschnitt 3.2.3.4) .....	41
3.1.2.2	Lösungen für die Affinitätschromatographie (Abschnitt 3.2.2.1) .....	41
3.1.3	Geräte .....	42
3.2	Methoden.....	43
3.2.1	Modifikation der Glastypoberflächen.....	43
3.2.1.1	Reinigung .....	43
3.2.1.2	Silanisierung.....	43

---

3.2.1.3	Umsetzung mit einem Spacermolekül .....	43
3.2.1.4	Immobilisierung von Liganden.....	44
3.2.1.5	Charakterisierung der modifizierten Glastypoberflächen.....	45
3.2.2	Vorbereiten der Antikörper.....	46
3.2.2.1	Anreicherung der Immunglobulin G-Fraktion (IgG) aus rohem Kaninchenserum mittels Affinitätschromatographie.....	46
3.2.2.2	Konzentrationsbestimmung .....	46
3.2.3	Probenhandhabung mit dem FIA-System.....	47
3.2.3.1	FIA bei Verfahren mit geringer Dispersion ( $D = 1$ ).....	47
3.2.3.2	FIA bei Verfahren mit hoher Dispersion ( $D > 1$ ).....	48
3.2.3.3	Überprüfung der Förderraten .....	49
3.2.3.4	Probenvorbereitung und Meßprotokolle.....	49
3.2.4	Markierungsfreie Detektion mit RIfS (Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie).....	51
3.2.4.1	Durchflußdetektor .....	51
3.2.4.2	Messung und Auswertung.....	51
3.2.5	Auswertung mit Neuronalen Netzen.....	52
4	Ergebnisse und Diskussion .....	54
4.1	Bestimmung der Förderraten im eingesetzten FIA-System.....	54
4.1.1	Variopumpe zum Antreiben des Trägerstroms .....	54
4.1.1.1	Pumpschlauch mit kleinem Innendurchmesser.....	54
4.1.1.2	Pumpschlauch mit großem Innendurchmesser .....	56
4.1.2	Fix-Pumpe zur Befüllung der Probenschleife.....	57
4.2	Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse (FIA) zur Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Konstanten.....	58
4.2.1	Charakterisierung des eingesetzten Flußsystems.....	58
4.2.2	Bindungsassays am Atrazin/K4E7-System .....	60

---

4.2.2.1	Affinität .....	61
4.2.2.2	Konzentrationsbestimmung .....	62
4.2.2.3	Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der Bindung an die Oberfläche .....	63
4.2.3	Bindungsassays am Benz(a)pyren/anti-Benz(a)pyren-System.....	67
4.2.3.1	Affinität .....	68
4.2.3.2	Konzentrationsbestimmung und Flußzellenkalibrierung.....	70
4.2.3.3	Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der Bindung an die Oberfläche .....	72
4.2.3.4	Kreuzreaktivität und Eignung für Immunoassays .....	79
4.2.4	Vergleich der Antigen/Antikörper-Systeme aus den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 .....	81
4.3	Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse zur Erweiterung des Konzentrationsbereichs bei der Affinitätstitration.....	83
4.3.1	Wahl des Antigen/Antikörper-Systems .....	83
4.3.2	Der Gradientenansatz: Unterschied zurAffinitätstitration.....	83
4.3.3	Erstellung von Konzentrationsprofilen.....	85
4.3.3.1	Konzentrationsprofile aus Farbstoffmessungen .....	85
4.3.3.2	Vergleich des Konzentrationsprofils der Farbstofflösung mit dem der Antikörperlösung.....	87
4.3.3.3	Simulation von Bindungskurven.....	90
4.3.4	Auswertung der Bindungskurven aus dem Gradientenansatz .....	92
4.3.4.1	Wahl der Auswerteparameter .....	93
4.3.5	Das System Desethylatrazin/K4E7 .....	104
4.3.5.1	Affinitätskonstante und Konzentrationsbestimmung .....	104
4.3.5.2	Gradientenansatz.....	105
4.4	Quantifizierung der Adsorption von Proteinen auf TiO <sub>2</sub> -Oberflächen ohne und mit kovalent gebundenen Proteinen .....	114
4.4.1	Flußprofil und Auswertung der Bindungskurve .....	114

---

4.4.2	Kontrolle und Regeneration der Oberflächen.....	116
4.4.3	BSA auf TiO <sub>2</sub> und modifizierten TiO <sub>2</sub> -Schichten .....	116
4.4.4	Speichel auf TiO <sub>2</sub> und modifizierten TiO <sub>2</sub> -Schichten .....	118
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	123
6	Literatur .....	128
7	Anhang .....	138
7.1	Abkürzungen .....	138
7.2	Veröffentlichungen .....	139
7.2.1	Publikationen.....	139
7.2.2	Poster.....	139
7.2.3	Vorträge.....	139
7.3	Akademische Lehrer .....	140
7.4	Lebenslauf.....	141



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation der Arbeit

Eine Analysenmethode besteht aus den drei Schritten Probenvorbereitung, Messung und Auswertung. Zur Probenvorbereitung gehört u. a. der Transport der Probe zum Ort der Messung, dem Detektor. Geschieht der Probentransport von Hand, wird er zu einer Schwachstelle der Methode, da unterschiedliche Probenhandhabung durch den Anwender das Analyseergebnis entscheidend beeinflussen kann. Außerdem wäre das bei einer großen Probenzahl mit hohem Zeitaufwand sowie hohen Personalkosten verbunden. Deshalb haben sich automatische Probenhandhabungssysteme durchgesetzt, die zum einen reproduzierbar arbeiten, d. h. unabhängig vom Anwender, und zum anderen zusätzlich noch die Analyse mehrerer Proben hintereinander ermöglichen, ohne daß Personal anwesend sein muß, um jeweils neue Proben für den Transport bereitzustellen (Schwedt 1995).

Als gebräuchliche Technik in der automatisierten Handhabung flüssiger Proben hat sich die Fließ-Injektions-Analyse (FIA) durchgesetzt. Sie wurde 1975 von Růžicka und Hansen eingeführt (Růžicka und Hansen 1975) und baut auf der kontinuierlichen Durchflußanalyse nach Skeggs (Skeggs 1966) auf. Im FIA-System werden vorgegebene Probenvolumina in einen permanenten Trägerstrom injiziert und zu einem Durchflußdetektor transportiert. Da unter laminaren Strömungsbedingungen gearbeitet wird und alle Vorgänge zeitlich exakt gesteuert werden, können gut reproduzierbare Analyseergebnisse erzielt werden (Schwedt 1995). Dabei wird die FIA nicht nur als Transportmittel der Probe zum Detektor eingesetzt (Kuban *et al.* 1997), auch Gradiententechniken, bei denen während des Transports zum Detektor Durchmischung und Reaktion stattfinden, werden erfolgreich angewandt (Saurina *et al.* 2000).

Ausgehend von der FIA sind weitere Verfahren zur automatisierten Handhabung wäßriger Proben entwickelt worden (Cerdà *et al.* 1999). Neben der FIA am bekanntesten ist die Sequentielle Injektions-Analyse (SIA), die 1990 ebenfalls von Růžicka und Mitarbeitern vorgestellt wurde (Růžicka und Marshall 1990). Hier wird im Unterschied zur FIA der Flüssigkeitsstrom teilweise unterbrochen.

In den letzten Jahren hat sich die Bioanalytik zu einer eigenständigen Wissenschaft entwickelt. Sie hat sich u. a. zum Ziel gesetzt, komplexe Funktionszusammenhänge von Biomolekülen bis hin zu Vorgängen in Zellen aufzuklären (Lottspeich und Zorbas 1998). Darauf aufbauend wurde der Einsatz von Biomolekülen für die quantitative Analyse etabliert (Scheller und Schubert 1989). Das führte dazu, daß die FIA nicht nur mit naßchemischen Nachweismethoden (Silva *et al.* 1996) sondern auch mit Methoden, die auf biomolekularen Wechselwirkungen beruhen, wie enzymatische oder immunologische Reaktionen (Schmid 1991), kombiniert wird. Speziell für die Verbindung der FIA mit Immunoassays wurden die Begriffe immuno-FIA oder Fließ-Injektions-Immunanalyse (FIIA) geprägt (Fintschenko und Wilson 1998). Letztere, eine Kombination aus ELISA und FIA, hat sich für den automatisierten, selektiven und empfindlichen Nachweis niedermolekularer Verbindungen in wäßrigen Proben bewährt (Krämer und Schmid 1991). Der große Vorteil der immunologischen gegenüber den konventionellen Verfahren, bei denen die Probe erst durch Extraktion aufkonzentriert, durch chromatographische Verfahren getrennt und schließlich mit Massen- oder UV/VIS-Spektroskopie verarbeitet werden muß, ist die Zeitersparnis, da gerade das aufwendige Vorkonzentrieren der Probe wegfällt. Daneben sind Immunoassays noch spezifisch und preisgünstig.

Desweiteren kann der Immunoassay mit FIA mit markierungsfreien Detektionsverfahren, wie massensensitive (Rickert *et al.* 1997) oder optische Methoden (Brecht und Gauglitz 1997), kombiniert werden. Damit können zum einen wiederum niedermolekulare Verbindungen nachgewiesen werden, wobei die dabei erreichten Nachweisgrenzen unter Berücksichtigung der Tatsache, daß markierungsfrei beobachtet wird, beachtlich sind: Je nach Modell und untersuchtem System reichen sie von  $\text{ng/mm}^2$  bis hin zu  $\text{fg/mm}^2$ . Zum anderen erlauben diese Techniken die zeitaufgelöste Beobachtung biomolekularer Wechselwirkungen und daraus Ermittlung thermodynamischer und kinetischer Konstanten dieser Reaktion, ohne daß die Reaktion durch Markierung von Bindungspartnern beeinflusst wird (Piehler *et al.* 1997a).

In der Arbeitsgruppe Gauglitz wird die Kombination aus Fließ-Injektions-Analyse (FIA) als erprobtes Mittel zum Proben transport und Reflektometrischer Interferenz-Spektroskopie (RIFS) für die bewährte markierungsfreie optische Detektion zur Untersuchung und Anwendung biomolekularer Wechselwirkungen erfolgreich eingesetzt. Sie wird u. a. angewandt zur Charakterisierung von

Ligand/Rezeptor-Systemen mittels thermodynamischer und kinetischer Größen (Piehler *et al.* 1997a) um diese Systeme anschließend für analytische Fragestellungen anzuwenden (Mouvet *et al.* 1996) oder auch um Informationen für die Wirkstoffsuche im pharmazeutischen Bereich zu erhalten (Rothmund *et al.* 1997).

## 1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Die Vielseitigkeit der FIA ermöglichte im Rahmen dieser Arbeit mehrere Einsatzmöglichkeiten. Sie wurde in Kombination mit RIfS für markierungsfreie Bindungsassays eingesetzt.

Zunächst wurden von zwei Antigen/Antikörper-Systemen die thermodynamischen und kinetischen Konstanten bestimmt. Während sich zur Bestimmung der Affinitätskonstante der Reaktion in Lösung ein Verfahren durchgesetzt hat (Piehler *et al.* 1997a), sind für die Auswertung der Kinetik der Bindung an die Oberfläche mehrere Auswerteverfahren gebräuchlich (Morton *et al.* 1995). Daher wurden die Bindungsassays zuerst am bekannten Modellsystem Atrazin/K4E7 durchgeführt, um verschiedene Berechnungsverfahren kinetischer Konstanten zu prüfen.

Anschließend wurden Antikörper gegen Benz(a)pyren untersucht. Aufgrund der Cancerogenität dieser Verbindung und der Notwendigkeit, es neben verwandten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen einzeln nachzuweisen, da die Europäische Union den Grenzwert im Trinkwasser für Benz(a)pyren auf 10 ng/l beschränkt hat (EG 1998), waren diese Antikörper für die Immunanalytik von besonderem Interesse.

Der Nachweis niedriger Konzentrationen niedermolekularer Verbindungen mit Hilfe des Bindungshemmtests, kann mit FIA für die Probenhandhabung und RIfS als Detektionsmethode einfach durchgeführt werden. Hierbei wird eine mit Antikörpern vorinkubierte Analytlösung mit größtmöglicher Konzentration auf eine mit Analytderivat modifizierte Oberfläche im Durchflußdetektor gebracht. Die im Gleichgewicht vorliegenden noch freien Antikörpermoleküle binden dort auf diese Oberfläche. Aus der Änderung der optischen Schichtdicke, die mit RIfS bestimmt wird, kann man auf die Ausgangskonzentration an Analyt schließen. Dieses Verfahren ist schnell, wenig aufwendig und preisgünstig, hat jedoch

den Nachteil, daß der Arbeitsbereich bislang kaum eine Größenordnung überschreitet (Mouvet *et al.* 1996).

Deshalb sollte im zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe der FIA ein Gradientenansatz entwickelt werden, bei dem, ebenfalls mit markierungsfreier Detektion, der Arbeitsbereich zu höheren Analytkonzentrationen hin erweitert werden konnte. Grundidee war, daß die Reaktion zwischen Analyt und Antikörper erst im Fluß stattfinden sollte, so daß zum einen durch den Grad der Durchmischung in den Fluidelementen unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse Antigen : Antikörper miteinander reagierten und zum anderen durch das Nacheinander-Eintreffen der Fluidelemente am Detektor die Gleichgewichtseinstellung unterschiedlich weit fortgeschritten war. Zuvor mußte durch theoretische Berechnungen sichergestellt werden, daß beim gewählten Antigen/Antikörper-System unterschiedliche Ausgangskonzentrationen in unterschiedlichen Bindungskurven resultieren würden.

Ein weiteres Einsatzgebiet der FIA in markierungsfreien Bindungsassays war durch das DFG-Projekt „Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate und deren Wirkung auf humorale, zelluläre und bakterielle Interaktionen in-vitro“ (Förd.-Nr. GE 505/9) gegeben. Ein ideales Zahnimplantat begünstigt das Einwachsen desselben im Zahnfleisch durch Förderung der Anlagerung oder des Wachstums von Zellen. Das Implantat muß jedoch auch übermäßige Adsorption von Makromolekülen wie z. B. Proteinen verhindern, da diese zu unerwünschter Adhäsion von Bakterien führt, wodurch entzündliche Prozesse hervorgerufen werden, welche den Implantatserfolg beeinträchtigen (König 1987).

In dieser Arbeit wurden zunächst adhäsive Glycoproteine, die sich als günstig für Zellanlagerung bzw. -wachstum erwiesen hatten (Tamura *et al.* 1997; Leonhardt 1990) kovalent auf TiO<sub>2</sub>-Oberflächen gebunden. Anschließend sollte das Bindungsverhalten weiterer Proteine auf diesen Schichten zeitaufgelöst mit RfS beobachtet und so ein erstes Urteil über die Eignung dieser modifizierten Oberflächen als Implantatbeschichtung abgegeben werden. Der Einsatz der FIA hat hier gegenüber Messungen im Stopped-Flow-Aufbau den Vorteil, daß das Dissoziationsverhalten einmal aufgebracht Modell-Proteine ebenfalls beobachtet und so eine Aussage über die Irreversibilität der Bindung dieser Modell-Proteine auf den modifizierten Oberflächen getroffen werden kann.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Fließ-Injektions-Analyse (FIA)

#### 2.1.1 Prinzip

Mit Hilfe der Fließ-Injektions-Analyse (FIA) lassen sich flüssige Proben mit relativ geringem technischen Aufwand schnell und reproduzierbar vermessen. Abbildung 2.1 zeigt ein FIA-System mit seinen wesentlichen Komponenten. Danach besteht der grundsätzliche Aufbau einer FIA-Anlage aus einer Anordnung von Schläuchen, Pumpen und Ventilen (Růžička und Hansen 1988).

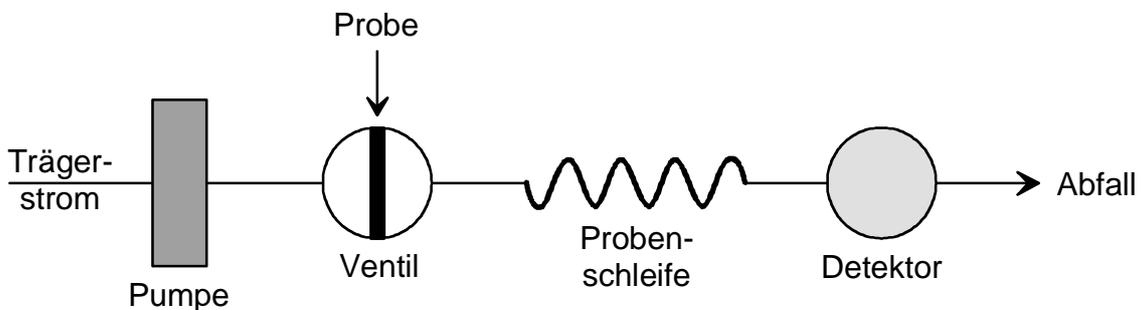


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines FIA-Systems.

Die Probenvolumina werden über ein Ventil reproduzierbar in einen von einer Pumpe angetriebenen Flüssigkeitsstrom injiziert. Dieser kontinuierliche Trägerstrom transportiert die Probe durch die Probenschleife zum (Durchfluß-)Detektor und anschließend in ein Abfallgefäß. Im Fluß bewirken Dispersionsvorgänge eine Durchmischung von Probe und Trägerstrom, die jedoch nicht homogen ist, so daß eine exakte zeitliche Steuerung aller Vorgänge Voraussetzung für reproduzierbare Analysenergebnisse ist (Schwedt 1995).

#### 2.1.2 Probentransport: Vorgänge im Trägerstrom

##### 2.1.2.1 Laminare Strömung

Für reproduzierbaren Probentransport in der FIA sind laminare Strömungsbedingungen notwendig, d. h. ein einheitlicher und gerichteter Fluß ohne Turbulenzen. In einem kreisförmigen Rohr (bzw. Schlauch) sind unter laminaren Be-

dingungen die Stromlinien parallel zueinander symmetrisch um das Zentrum des Kanals verteilt. Dort bewegt sich die Flüssigkeit mit der doppelten Durchschnittsgeschwindigkeit, während die Geschwindigkeit an den Wänden gegen Null geht. Daraus resultiert das für laminaren Fluß charakteristische parabolische Strömungsprofil (Růžička und Hansen 1988).

Der Wechsel von der laminaren in die turbulente Strömungsform hängt von der Reynoldszahl  $R_e$  ab, die sich aus der mittleren Fließgeschwindigkeit  $\bar{v}$ , dem Rohrdurchmesser  $d$ , der Dichte  $\rho$  und der Viskosität  $\eta$  nach

$$R_e = \frac{\bar{v} \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad (1)$$

zusammensetzt. Für Reynoldszahlen  $R_e < R_e^{krit}$  ist die Strömung laminar, andernfalls turbulent. Die kritische Reynoldszahl  $R_e^{krit}$  beträgt bei der Rohrströmung 2300 (Gersten 1991). Werden in Gleichung (1) Größen eingesetzt, die in FIA-Anlagen gebräuchlich sind, erhält man

$$R_e = \frac{4\rho \cdot Q}{\pi(2r)\eta} \quad (2)$$

mit  $\rho$  als Dichte,  $Q$  als Volumenflußrate,  $r$  als Schlauchradius und  $\eta$  als Viskosität. Typische FIA-Systeme mit einem Schlauchdurchmesser von 0.5 mm sowie  $Q$  zwischen 0.5 und 3 ml/min haben  $R_e$ -Werte zwischen 20 und 130, d. h. es kann eine laminare Strömung vorausgesetzt werden.

Auch bei kleinen Reynoldszahlen können Schlauchbiegungen oder sich ändernde Schlauchdurchmesser Unregelmäßigkeiten in der Strömung hervorrufen. Besonders der Übergang von kleinen zu großen Schlauchdurchmessern stört den laminaren Fluß. Daher sollten auf dem Weg zur Probenschleife und von dort in den Durchflußdetektor Änderungen im Durchmesser der Schläuche vermieden werden (Růžička und Hansen 1988).

### 2.1.2.2 Konvektion

Abbildung 2.2 veranschaulicht die Ausbildung der parabolischen, zentrosymmetrischen Verteilung des Geschwindigkeitsprofils nach Injektion einer Probe in einen laminaren Trägerstrom. Dabei ist die Probe vor der Injektion ( $t = 0$ ) als Probenpfropf mit zylindrischem Probenprofil dargestellt. Nach der Injektion

( $t > 0$ ) wird das Probenmaterial innerhalb von Millisekunden entlang des parabolischen Profils verteilt.

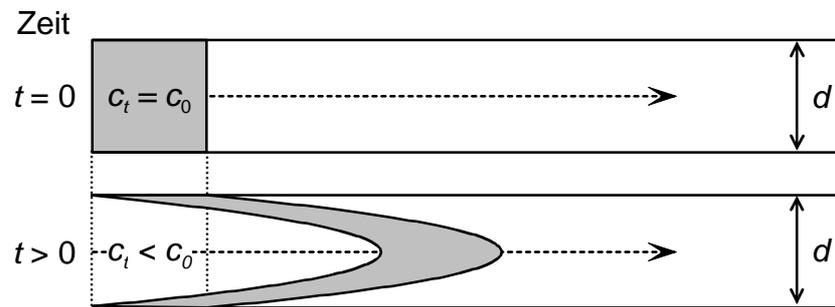


Abbildung 2.2: Verteilung eines Probenpfropfs im laminaren Trägerstrom durch Konvektion. Die Flußrichtung wird durch die zentrale Stromlinie angezeigt.

Diese Verteilung der Probe allein durch die Fließbewegung des Trägerstroms wird als Konvektion bezeichnet. Sie nimmt zu bei Vergrößerung der Schlauchdimensionen und bei Erhöhung der Fließgeschwindigkeit (Růžička und Hansen 1988).

### 2.1.2.3 Diffusion

In der FIA gibt es einen Konzentrationsgradienten sowohl in axialer als auch in radialer Richtung, deshalb wird zwischen axialer und radialer Diffusion unterschieden (Abbildung 2.3).

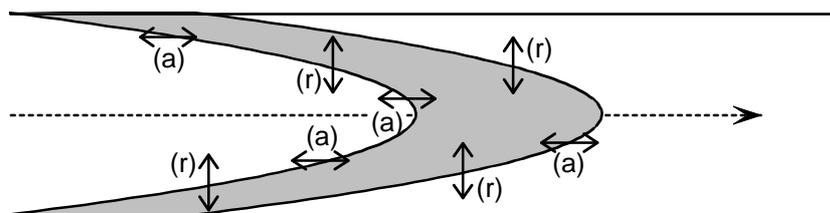


Abbildung 2.3: Konvektion mit axialer (a) und radialer (r) Diffusion im Trägerstrom. Die Flußrichtung wird durch die zentrale Stromlinie angezeigt.

Die axiale Diffusion, d. h. die Diffusion in Flußrichtung, ist vernachlässigbar, da sich wegen des kleinen Schlauchdurchmessers die eingespritzten Volumina über große Schlauchlängen erstrecken. Beispielsweise würde eine Probe von 1 ml in einem Schlauch mit 0.5 mm Innendurchmesser unverdünnt ein 5 m langes Schlauchstück ausfüllen.

Die radiale Diffusion hingegen, d. h. die Diffusion senkrecht zur Flußrichtung, bewirkt die eigentliche Durchmischung von Probe und Trägerstrom. Dabei wer-

den zum einen Probenelemente an der Spitze der Probenzone, d. h. auf Stromlinien in Zentrumsnähe, nach außen in Zonen geringerer Strömungsgeschwindigkeit bewegt, was zu einem Abbremsen dieser Elemente führt. Zum anderen werden Probenelemente, die sich von außen auf die zentrale Stromlinie zubewegen, beschleunigt (Růžička und Hansen 1988).

Für die Diffusion im laminaren Fluß erhält man nach dem 1. Fickschen Gesetz

$$J = -D \frac{\Delta c}{\delta} \quad . \quad (3)$$

Bei gleichbleibendem Konzentrationsgradienten hängt die Geschwindigkeit der Diffusion allein vom Diffusionskoeffizienten  $D$  ab. Je kleiner dieser Koeffizient ist, umso schneller können die Teilchen diffundieren. Methoden zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten sind in (Kohlrausch 1996) zusammengefaßt. (Murphy *et al.* 1991) beschreiben den Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient  $D$  und Molekulargewicht  $M$  nach

$$D = \alpha M^\beta, \quad (4)$$

wobei  $\beta$  Werte  $< 0$  annimmt, d. h.  $D$  nimmt mit zunehmendem  $M$  ab. Für Antikörper mit  $M = 150\,000$  g/mol beispielsweise wird nach (Juros *et al.* 1993) ein mittlerer Diffusionskoeffizient von  $D_{IgG} = 4.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  erhalten. Die Diffusionskoeffizienten niedermolekularer Verbindungen liegen bis zu 1-2 Größenordnungen darüber (Cussler 1997).

#### 2.1.2.4 Dispersion

Konvektion und Diffusion verursachen zahllose Neupositionierungen der Flußelemente in axiale und radiale Richtungen und beeinflussen sich dabei gegenseitig. Die Summe der Auswirkungen dieser Effekte auf die Verteilung der Probe im Trägerstrom wird als Dispersion beschrieben. Sie hängt von der Größe der Kontaktfläche zwischen Probe und Trägerstrom, und damit von den Schlauchdimensionen, sowie von der Fließgeschwindigkeit ab. In Abschnitt 2.1.2.5 wird auf die Abhängigkeit der Dispersion von einzelnen Parametern näher eingegangen, eine ausführliche Abhandlung ist in (Cussler 1997) zu finden.

Die axiale Dispersion (Dispersion in Flußrichtung) wird nahezu ausschließlich durch die Konvektion (Abschnitt 2.1.2.2) verursacht, während die axiale Diffusion zu vernachlässigen ist (Abschnitt 2.1.2.3). Wenn nun ein Element des Pro-

benmaterials auf derselben Stromlinie bleibt, d. h. im gleichen Abstand von der Mittellinie des Rohrs, wird die axiale Dispersion unbegrenzt mit der zurückgelegten Strecke anwachsen, weil sich die achsennahen Elemente entlang der Rohrachse bewegen, während die letzten Spuren des Probenmaterials, die sich nahe der Wand befinden, nie hinausgeschwemmt werden. Allein durch Konvektion werden Probe und Trägerstrom nicht durchmischt, die einzelnen Schichten laufen lediglich entlang der Stromlinien nebeneinander her. Damit könnten FIA-Anwendungen, bei denen zusätzlich chemische Reaktionen zwischen Probe und umgebendem Fluid während des Flusses ausgenutzt werden, nur begrenzt durchgeführt werden.

Eine wichtige Rolle spielt daher die radiale Dispersion, d. h. die Neuverteilung der Elemente des Probenmaterials weg von der ursprünglichen Stromlinie. Sie verursacht die tatsächliche Durchmischung von Probe und Trägerstrom und kann damit Reaktionen zwischen beiden Partnern begünstigen. Die radiale Dispersion kann durch radiale Diffusion (Abschnitt 2.1.2.3), durch Einführung von (lokalen) Turbulenzen, durch eine zweite Strömung oder durch eine Kombination dieser drei Möglichkeiten hervorgerufen werden. Während jedoch die Einführung lokaler Turbulenzen oder die einer zweiten Strömung nur durch zusätzlichen apparativen Aufwand zu bewerkstelligen sind, ist die radiale Diffusion der Probe im Trägerstrom immer vorhanden (Růžička und Hansen 1988).

Bei langsam diffundierenden Probenelementen wird die axiale Dispersion durch die radiale Dispersion kaum beeinflusst. Bei schnell diffundierenden Probenelementen jedoch kann der Effekt, der durch die radiale Dispersion hervorgerufen wird, so groß sein, daß er die Ausbildung des durch Konvektion im laminaren Fluß hervorgerufenen parabolischen Geschwindigkeitsprofils der Probe stört. Dies nennt man Taylor-Dispersion (Taylor 1953).

Abbildung 2.4 zeigt zusammenfassend die Auswirkungen von Konvektion sowie langsamer und schneller radialer Diffusion auf das Geschwindigkeitsprofil im Schlauch und auf den Konzentrationsverlauf am Detektor. In allen drei Fällen wird die gleiche Teilchenzahl eingesetzt, d. h. die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven sind ebenfalls gleich.

Findet keine Dispersion statt (Fall ①), bleibt der zylindrische Probenpfropf unverändert. Alle Probenelemente haben dieselbe Geschwindigkeit, es resultiert ein Rechtecksignal für die Konzentration am Detektor. Wird die Probe durch

Konvektion auseinandergezogen, ohne daß Diffusion der Ausbildung des parabolischen Strömungsprofils entgegenwirkt (Fall ②), so nehmen die Geschwindigkeiten der einzelnen Probenelemente einen großen Bereich ein. Dementsprechend verteilt ist die Anzahl der Teilchen, die in einem längeren Zeitraum pro Zeiteinheit den Detektor passiert. Wird dagegen der Konvektion durch radiale Diffusion entgegengewirkt (Fall ③), so nimmt die gleiche Teilchenzahl wie in Fall ② einen kleineren Geschwindigkeitsbereich ein. Die Teilchen bewegen sich innerhalb eines kürzeren Zeitraums wie in Fall ② durch den Detektor, d. h. bei der Taylor-Dispersion muß die Anzahl der Teilchen in den jeweiligen Zeiteinheiten beim Passieren des Detektors entsprechend höher liegen (Cussler 1997).

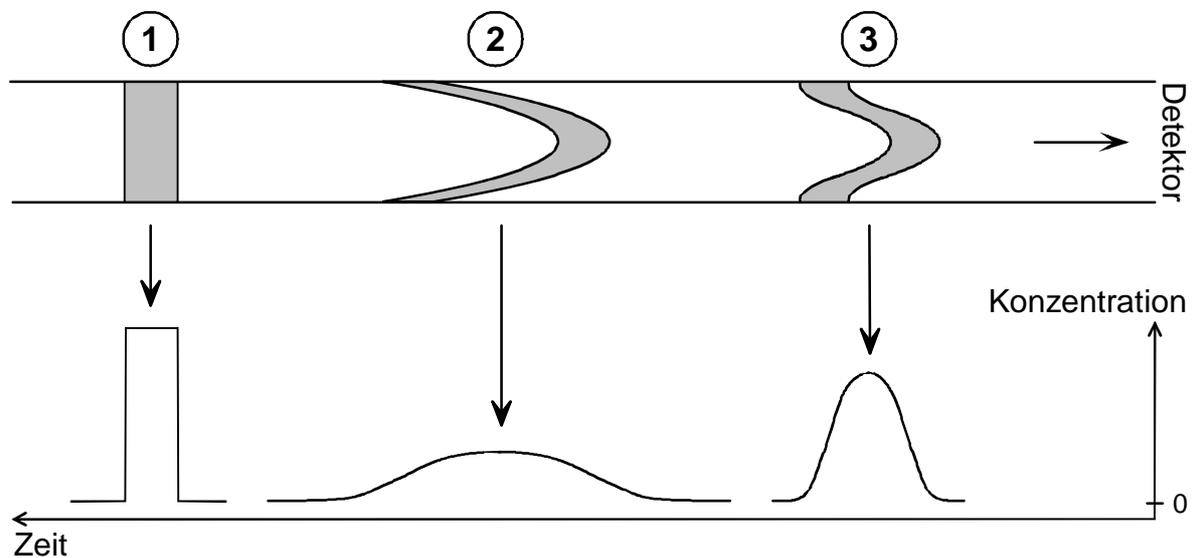


Abbildung 2.4: Einfluß von Konvektion und Diffusion auf das Geschwindigkeitsprofil.

- ①: Keine Dispersion, da weder Konvektion noch Diffusion.
- ②: Dispersion durch Konvektion und langsame Diffusion.
- ③: Dispersion durch Konvektion und schnelle Diffusion (Taylor-Dispersion).

Man beachte, daß ein vom Fluß transportiertes Fluidelement, das den Detektor erreicht, immer jünger ist als das nachfolgende. Daraus folgt, daß die Flußrichtung zum Detektor hinführt, die Zeitachse jedoch entgegengesetzt gerichtet ist.

### 2.1.2.5 Dispersionskoeffizient

Damit ein FIA-System charakterisiert und das Ergebnis am Detektor richtig beurteilt werden kann, muß man wissen, ob und in welchem Maße die Probe auf dem Weg zum Detektor verdünnt worden ist, in welcher Konzentration sie letztendlich dort vorliegt und wieviel Zeit zwischen Injektion der Probe und der De-

tektion vergangen ist. Das Ausmaß der Dispersion der Probe gibt der Dispersionskoeffizient  $D_{FIA}$  wieder, der nach

$$D_{FIA} = \frac{c_0}{c} \quad (5)$$

definiert ist. Dabei ist  $c_0$  die Ausgangskonzentration der Probe und  $c$  die Konzentration der verdünnten Probe zu dem Zeitpunkt, an dem dieser Dispersionskoeffizient bestimmt wurde. (Der Index „FIA“ dient hier zur Unterscheidung des Dispersionskoeffizienten vom Diffusionskoeffizienten  $D$  in Abschnitt 2.1.2.3)

Man betrachte als Modell eine sog. Pfropfenströmung, d. h. das Probenprofil ist zylinderförmig, die Probe ist homogen und hat die Ausgangskonzentration  $c_0$ . Am Detektor würde davon ein rechteckiges Signal erzeugt werden, dessen Höhe proportional zur Probenkonzentration wäre (Abbildung 2.5 links). Der Dispersionskoeffizient beträgt 1, da die Probe unverdünnt vorliegt.

In der Realität wird eine Dispersionszone ausgebildet, bei deren Detektion der Peak ein Konzentrationskontinuum widerspiegelt (Abbildung 2.5 rechts). Man betrachtet dieses Kontinuum so, als sei es aus einzelnen Fluidelementen zusammengesetzt, von denen kein einziges die gleiche Konzentration wie ein benachbartes hat. Jedes dieser Elemente wird einzeln detektiert.

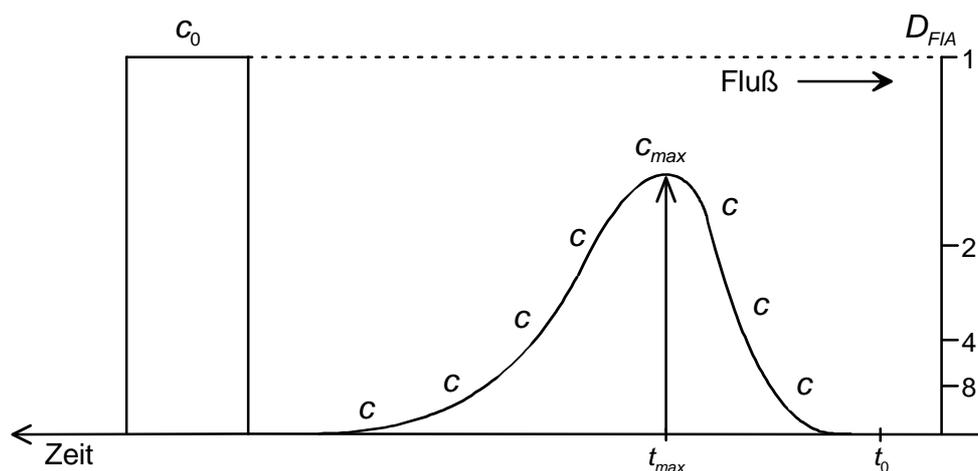


Abbildung 2.5: Detektion nicht dispergierter (links) und dispergierter (rechts) Probenzonen.

Der Wert für den Dispersionskoeffizienten  $D_{FIA}$  hängt demnach vom Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt  $t_0$  der Probeninjektion und dem Zeitpunkt  $t$  ab, an dem das dispergierte Element des Probenmaterials durch das Beobachtungsfeld des Detektors fließt. Wird allein über die Peakhöhe ausgewertet, dann wird das

Fluidelement mit der maximalen Konzentration  $c_{\max}$ , das zum Zeitpunkt  $t_{\max}$  den Detektor erreicht, zur ursprünglichen Konzentration der injizierten Probenlösung  $c_0$  ins Verhältnis gesetzt:

$$D_{FIA}^{\max} = \frac{c_0}{c_{\max}}. \quad (6)$$

Mit diesen  $D_{FIA}^{\max}$ -Werten ist es möglich, FIA-Schlauchsystem, Detektor und Detektionsmethode zu charakterisieren. Je nach Ausmaß der Dispersion bezeichnet man sie als begrenzt ( $D_{FIA} = 1 - 3$ ), mittel ( $D_{FIA} = 3 - 10$ ) oder groß ( $D_{FIA} > 10$ ) (Růžička und Hansen 1988).

Die Dispersion einer Probe kann bestimmt werden, indem man ein definiertes Volumen eines Farbstoffs in einen farblosen Trägerstrom einspritzt und photometrisch die Absorption der farbigen Dispersionszone aufzeichnet. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß sich die Farbstoffmoleküle von den späteren Probenmolekülen aufgrund unterschiedlicher Molekülmassen im Diffusions- und damit auch im Dispersionsverhalten unterscheiden können. Der mathematische Zusammenhang zwischen Dispersions- und Diffusionskoeffizient wird nach (Cussler 1997) wiedergegeben als

$$D_{FIA} = \frac{(r \cdot v)^2}{48D} \quad (7)$$

mit  $r$  = Schlauchradius und  $v$  = Fließgeschwindigkeit. Demnach hängt der Dispersionskoeffizient  $D_{FIA}$  umgekehrt proportional vom Diffusionskoeffizienten  $D$  ab, d. h. eine langsame Diffusion verursacht eine starke Dispersion, während eine schnelle Diffusion die Dispersion vermindert. Anschaulich wurde dieser Effekt bereits in Abschnitt 2.1.2.4 erklärt. Außerdem kann man Gleichung (7) entnehmen, daß der Dispersionskoeffizient mit zunehmendem Schlauchradius und zunehmender Fließgeschwindigkeit wächst. Weitere Berechnungen zeigen, daß die Dispersion überdies noch mit der Wurzel der Schlauchlänge zunimmt.

Der Dispersionskoeffizient ist ein zuverlässiger Parameter zur Veranschaulichung der Konzentrationsverhältnisse in einem Fluid, hat aber seine Grenzen:

- Der Dispersionskoeffizient ist eine fiktive Größe, denn auch die betrachteten Fluidelemente sind fiktiv. Erst der Detektor wertet eine dispergierte Probenzone als vermeintlich diskrete Sektionen eines Konzentrationsgradienten aus, abhängig von seiner Erkennung. Er bezieht sich damit nur auf Proben-

konzentrationen zwischen zwei Dispersionsprozessen, die zu keiner aktuellen Konzentration innerhalb der dispergierten Probenzone passen.

- Der FIA-Peak ist häufig das Ergebnis zweier gleichzeitig stattfindender Prozesse: Eines physikalischen Prozesses der Zonendispersion und zusätzlich eines chemischen Prozesses, der durch die Reaktion zwischen Probe und Reagenz stattfindet. Der Dispersionskoeffizient berücksichtigt jedoch nur den physikalischen Dispersionsprozeß (Růžička und Hansen 1988).

### 2.1.3 Durchflußsysteme zur Probenhandhabung: Einige Beispiele

#### 2.1.3.1 *Continuous-Flow-Methoden*

Bei der Einführung der kontinuierlichen Durchflußanalyse (continuous flow analysis, CFA) nach Skeggs (Skeggs 1966) wurde zunächst mit luftsegmentierten Flüssigkeitsströmen gearbeitet (Segmented Flow Analysis, SFA), d. h. die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Mechanismen der Durchmischung von Probe und Trägerstrom waren nur in geringem Maß vorhanden (Karlberg und Pacey 1989). Ziel war die vereinfachte und automatisierbare Handhabung flüssiger Proben. Darauf aufbauend wurde von Růžička und Hansen die Fließ-Injektions-Analyse entwickelt (Růžička und Hansen 1988).

#### 2.1.3.2 *Fließ-Injektions-Analyse (FIA)*

In der Fließ-Injektions-Analyse wird eine Probe in einen unsegmentierten Flüssigkeitsstrom injiziert, wobei es zur Durchmischung von Probe und Trägerstrom kommt (Abschnitt 2.1.1). Häufig werden Peristaltik-Pumpen eingesetzt, deren Förderrate u. a. vom Durchmesser des Pumpschlauchs abhängt. Zwar können hier Schwankungen bei der Einstellung der Fließgeschwindigkeit auftreten, doch ist eine einmal eingestellte Förderrate über einen längeren Zeitraum konstant (Hoffmann 1996).

Das FIA-System kann als Transportmittel einer Probe oder einer Reagenzlösung zum Detektor verwendet werden (Kuban *et al.* 1997; Wilson *et al.* 1997), es werden aber auch sog. Gradienten-Techniken eingesetzt, bei denen dem Trägerstrom ein Reagenz zugesetzt wird, mit dem die Probe vor der Detektion im Fluß reagiert (Silva *et al.* 1996; Saurina *et al.* 2000). In Kombination mit immunanalytischen Nachweisverfahren werden vielfach die Begriffe Immuno-FIA oder

Fließ-Injektions-Immunoassay FIIA verwendet (Fintschenko und Wilson 1998). Hier werden oft heterogene kompetitive Enzymimmunoassays eingesetzt, bei denen durch ein Indikatorenzym eine Reaktion katalysiert wird, deren Produkt letztendlich nachgewiesen wird. Reaktionsraum und Durchflußdetektor können dabei in einer Einheit kombiniert vorliegen (Wilson *et al.* 1997; Fernández-Romero *et al.* 1998), oder der Detektor ist hinter der Reaktionskammer installiert (González-Martínez *et al.* 1998; Fránek *et al.* 2000). Fließ-Injektions-Immunoassays, die auf dem Format des Bindungshemmtests beruhen, wurden ebenfalls beschrieben (Lang *et al.* 1996; Mallat *et al.* 1999; Länge *et al.* 1999) und sind in Abschnitt 2.3.3 näher erläutert.

Oft werden nur solche Systeme als FIA-Systeme bezeichnet, bei denen der Trägerstrom nicht durch Luftblasen segmentiert ist (Schwedt 1995). Auch im Rahmen dieser Arbeit wird von FIA gesprochen, obwohl zur Verminderung des Probenvolumens meist eine Luftblase unmittelbar vor der Probe aufgezogen wurde. Da jedoch die Durchmischung mit nachfolgendem Fluid, sei es Trägerstrom oder Reagenzlösung, zugelassen wurde, wurden die von Růžicka und Hansen beschriebenen Dispersionsvorgänge nicht verhindert, weshalb die Bezeichnung FIA gestattet sei.

### **2.1.3.3 Sequentielle Injektions-Analyse (SIA)**

In der SIA wird kein permanenter Flüssigkeitsstrom aufrechterhalten. Im Gegensatz zur FIA wird bei der SIA der Fluß durch den Durchflußdetektor angehalten, während die Probe in die Probenschleife geladen wird. Meist werden Spritzenpumpen zum Antreiben des Flüssigkeitsstroms verwendet, mit denen die gewünschte Fließgeschwindigkeit exakt eingestellt werden kann (Hoffmann 1996). Dies setzt Nachweisverfahren voraus, die unempfindlich gegen starke Schwankungen in der Fließgeschwindigkeit sind.

Die SIA wird häufig zur automatisierten Probenhandhabung in der HPLC verwendet, aber auch für andere Anwendungen, bei denen viele Proben unmittelbar hintereinander in einen Detektor überführt werden müssen (Barnett *et al.* 1999). In Kombination mit immunanalytischen Nachweisverfahren wurde SIA speziell zur Ermittlung kinetischer Konstanten der Reaktion in homogener Phase eingesetzt (Jung *et al.* 2000).

## 2.2 Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS)

### 2.2.1 Prinzip

Die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS) beruht auf der Mehrfachreflexion an dünnen Schichten (Weißlichtinterferometrie nach Fabry-Perot, Hecht 1989). Es ist ein markierungsfreies, optisches Verfahren, das zur direkten zeitaufgelösten Detektion von Bindungsvorgängen an der Oberfläche eingesetzt werden kann. Das Prinzip ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

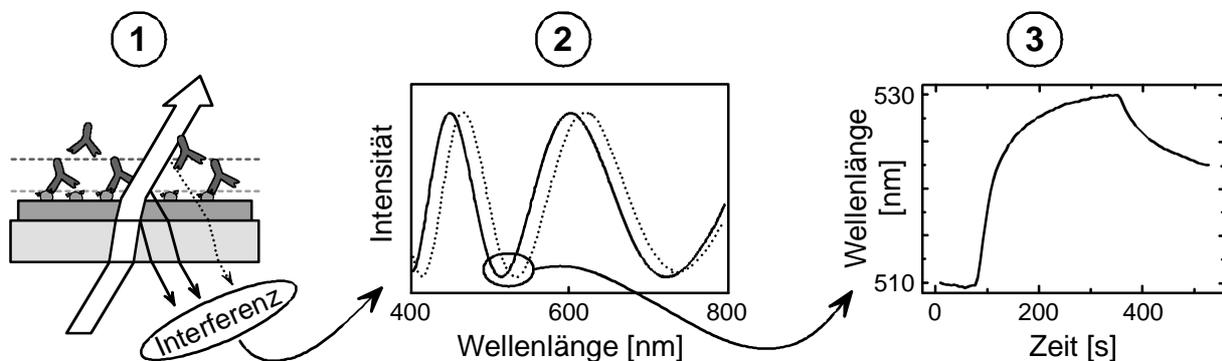


Abbildung 2.6: Prinzip der Reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie.

- ①: Senkrecht einstrahlendes Weißlicht; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Lichtstrahlen schräg eingezeichnet.
- ②: Interferenzspektrum der reflektierten Teilstrahlen.
- ③: Bindungskurve: Lage eines Extremums aus dem Spektrum ( $\hat{=}$  Signal) während der Zeit.

Weißlicht wird auf ein Mehrschichtsystem eingestrahlt. Die Lichtstrahlen werden an den Phasengrenzen teilweise durchgelassen, teilweise reflektiert. Die Amplituden der reflektierten Einzelstrahlen verstärken sich oder schwächen sich ab. Es entsteht ein Interferenzmuster, dessen Lage von den physikalischen Eigenschaften der Schicht (Dicke, Brechungsindex) abhängt (Abbildung 2.6 ①, ②: durchgezogene Linien). Nimmt nun die Schichtdicke zu, beispielsweise durch Bindung von Molekülen auf der Oberfläche, verschiebt sich dieses Interferenzmuster (Abbildung 2.6 ①, ②: gestrichelte Linien). Beobachtet man die Lage eines Extremums dieses Spektrums während des Bindungsvorgangs, so können aus deren Verschiebung Informationen über den Bindungsvorgang gewonnen werden (Abbildung 2.6 ③) (Brecht *et al.* 1992).

## 2.2.2 Optische Grundlagen

### 2.2.2.1 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten

Ein Lichtstrahl, der unter einem bestimmten Einfallswinkel  $\theta_I$  auf eine ebene Grenzfläche fällt, tritt teilweise unter Brechung in das zweite Medium ein (Transmission, Winkel  $\theta_T$ ), während der Rest unter dem Winkel  $\theta_R$  reflektiert wird. Für die gerichtete Reflexion gilt  $\theta_I = \theta_R$ . Für die Transmission gilt das Snelliussche Brechungsgesetz mit  $n_I \sin \theta_I = n_T \sin \theta_T$ . Abbildung 2.7 veranschaulicht das Zustandekommen der Mehrfachreflexion an planparallelen Schichten.

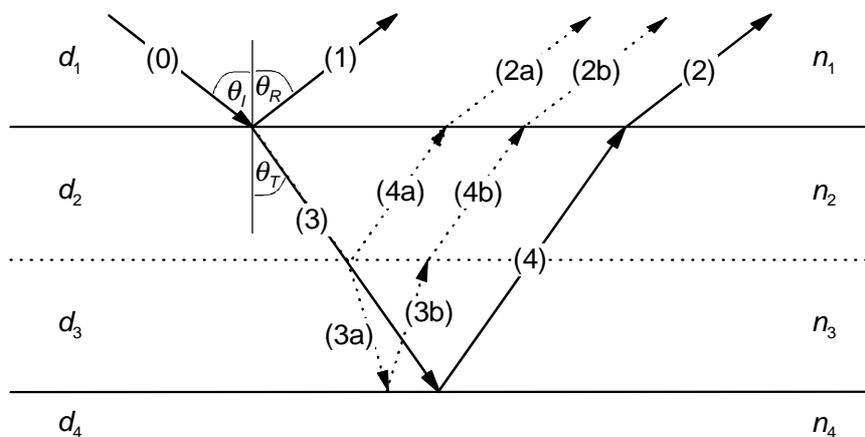


Abbildung 2.7: Mehrfachreflexion an dünnen Schichten der Schichtdicke  $d_j$  und des Brechungsindex'  $n_j$ . Nach Reflexion (1) und Brechung (3) des einfallenden Strahls (0) an der ersten Phasengrenze gelten für den weiteren Verlauf der Teilstrahlen die durchgezogenen Linien für  $n_2 = n_3$  (Einschichtsystem) und die gestrichelten Linien für  $n_2 < n_3$  (Zweischichtsystem). Nähere Informationen s. Text.

Abgebildet sind zunächst der einfallende Lichtstrahl (0) sowie dessen Reflexion (1) und Brechung (3) an der ersten Phasengrenze ( $n_1 < n_2$ ). Für  $n_2 = n_3$  (Einschichtsystem) wird Strahl (3) erst an der Phasengrenze  $n_3/n_4$  reflektiert (4). Die Brechung an der Phasengrenze  $n_3/n_4$  werde im folgenden vernachlässigt. Strahl (4) wird dann wieder an der ersten Phasengrenze gebrochen, so daß Strahl (2) in dieselbe Richtung geht wie Strahl (1). Für  $n_2 < n_3$  (Zweischichtsystem) treten Reflexion und Brechung an einer weiteren Phasengrenze auf (Darstellung mit gestrichelten Linien, Strahlen (3a), (3b), (4a), (4b)). Daraus resultieren letztendlich zwei weitere Teilstrahlen, (2a) und (2b), parallel zu Strahl (1). Damit steigt die Zahl der reflektierten Teilstrahlen allein durch Erhöhung der Zahl der Pha-

sengrenzen. Die Reflexion der reflektierten Teilstrahlen wird unter der Annahme geringer Reflektivitäten vernachlässigt (Hecht 1989).

Damit Interferenzeffekte reflektierter Teilstrahlen, z. B. (1) und (2) bzw. (1), (2a) und (2b) in Abbildung 2.7, beobachtet werden können, müssen kohärente Lichtstrahlen auf planparallele Schichten fallen, deren Schichtdicken wiederum im Bereich der Kohärenzlänge liegen. Da Weißlicht eine sehr kleine Kohärenzlänge hat, sind Interferenzeffekte nur dann zu beobachten, wenn die Schichtdicke einige  $\mu\text{m}$  nicht überschreitet (Gauglitz 1996).

Das Verhalten von Transmission und Reflexion an Phasengrenzen wird von den Fresnelschen Gleichungen beschrieben, die sich ihrerseits aus den Maxwell'schen Gleichungen ableiten lassen (Bergmann und Schäfer 1993).

### 2.2.2.2 *Einschichtsysteme*

Abbildung 2.8 zeigt ein Beispiel für den Aufbau eines Einschichtsystems. Der Schichtaufbau, und damit der Verlauf der Teilstrahlen, ist analog Abbildung 2.7 gewählt. Mit solchen Systemen wurde in den Abschnitten 4.2 und 4.3 gearbeitet.

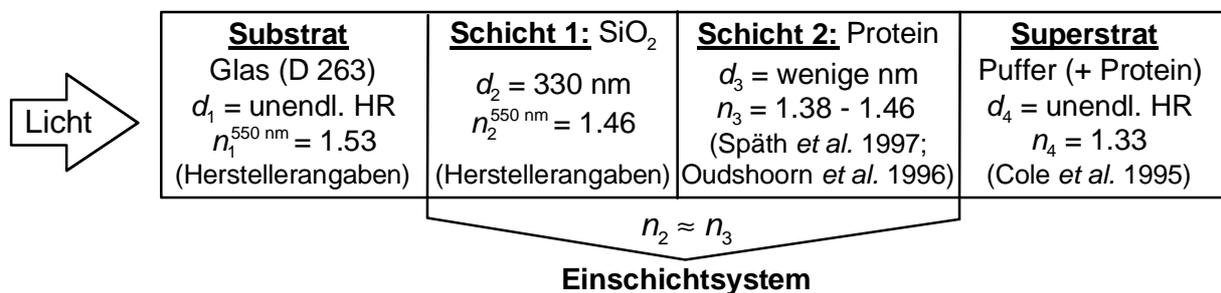


Abbildung 2.8: Beispiel für ein Einschichtsystem, HR = Halbraum. Nicht berücksichtigt ist die reflexionsverstärkende  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -Schicht zwischen Glassubstrat und  $\text{SiO}_2$  (s. Abschnitt 3.1.3), da ihre Dicke mit 10 nm weit unter der Kohärenzlänge lag.

Wird bei senkrechtem Einfall gemessen, entspricht der Lichtweg der zweifachen Schichtdicke. Falls an der Grenzfläche keine Phasensprünge auftreten, ergibt sich bei Interferenz der reflektierten Strahlen mit den Intensitäten  $I_1$  und  $I_2$  für die reflektierte Intensität:

$$I_R = I_{\text{Substrat}, \text{Schicht}} + I_{\text{Schicht}, \text{Superstrat}} + 2\sqrt{I_{\text{Substrat}, \text{Schicht}} I_{\text{Schicht}, \text{Superstrat}}} \cos\left(\frac{4\pi(nd)_{\text{Schicht}}}{\lambda}\right) \quad (8)$$

Daraus folgt, daß die Intensität des reflektierten Lichts von der Wellenlänge abhängt (Bergmann und Schäfer 1993).

Die Amplitude des resultierenden Interferenzspektrums wird durch den Gangunterschied, der durch die optische Schichtdicke  $nd$  hervorgerufen wird, und durch den an den Phasengrenzen auftretenden Reflexionskoeffizienten  $R$  bestimmt. Die optische Schichtdicke  $nd$  ist das Produkt aus dem Brechungsindex  $n$  und der physikalischen Schichtdicke  $d$  des Interferenzfilms, wobei der Brechungsindex frequenzabhängig ist (Dispersion). Der Reflexionskoeffizient  $R$  gibt an, welcher Anteil der eingestrahlen Intensität reflektiert wird. So gilt für den Reflexionskoeffizienten an der Phasengrenze zweier unendlicher Halbräume  $a$  und  $b$ :

$$R = \left( \frac{n_a - n_b}{n_a + n_b} \right)^2 \quad (9)$$

Aus Gl. (8) folgen als Bedingungen für das Auftreten von Extrempunkten:

$$\begin{aligned} \frac{2nd}{\lambda} = m_{\max} & \quad \text{bzw.} \quad \frac{2nd}{\lambda} = m_{\min} \\ m_{\max} = 1, 2, 3, \dots & \quad m_{\min} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \end{aligned} \quad (10)$$

Soll mit RIFs die optische Schichtdicke mit Hilfe des gemessenen Reflexionsspektrums berechnet werden, muß die Ordnung  $m_i$  (mindestens) eines Extrempunkts bekannt sein. Beim Vorliegen zweier Extrempunkte bei den Wellenlängen  $\lambda_i$  und  $\lambda_j$  im Interferenzspektrum dispersionsfreier Systeme kann ihre Ordnung bestimmt werden nach (Hecht 1989):

$$m_i = \frac{\lambda_j \cdot \Delta m}{(\lambda_j - \lambda_i)} \quad (11)$$

### 2.2.2.3 Multischichtsysteme

Abbildung 2.9 zeigt ein Beispiel für den Aufbau eines Zweischichtsystems. Der Schichtaufbau, und damit der Verlauf der Teilstrahlen, ist analog Abbildung 2.7 gewählt. Mit solchen Systemen wurde in Abschnitt 4.4 gearbeitet.

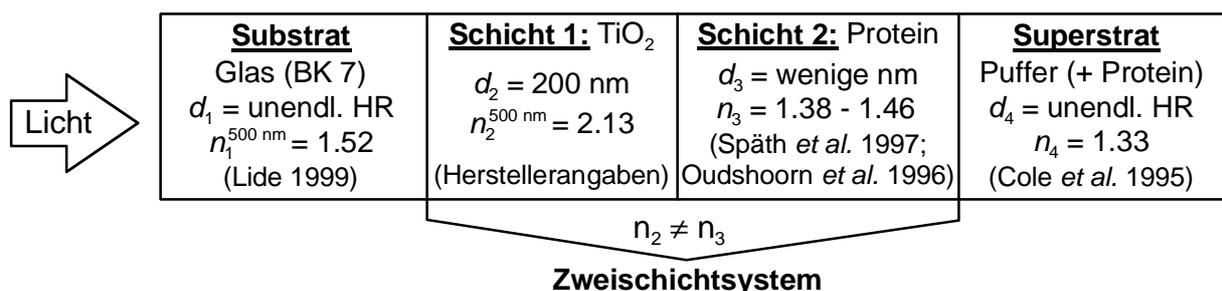


Abbildung 2.9: Beispiel für ein Multischichtsystem, HR = Halbraum.

Für senkrechten Lichteinfall und unter der Annahme, daß zunächst wie in Abschnitt 2.2.2.2 ein Einschichtsystem betrachtet wird, ist das Reflexionsverhältnis  $r$  (Quotient aus reflektiertem und eingestrahlem elektrischen Feldvektor) mit dem Transmissionsverhältnis  $t$  (Quotient aus durchgelassenem und eingestrahlem elektrischen Feldvektor) wie folgt korreliert:

$$\begin{bmatrix} 1 \\ n_{\text{Substrat}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -n_{\text{Substrat}} \end{bmatrix} r = M \begin{bmatrix} 1 \\ n_{\text{Superstrat}} \end{bmatrix} t \quad (12)$$

Obiger Matrixformalismus geht auf die Jonesschen- und die Mueller-Matrizen zurück. Danach werden vom Licht durchlaufene Grenzflächen und Schichten als Matrizen sowie Lichtstrahlen als Vektoren dargestellt (Hecht 1989).  $M$  ist die sog. Transfermatrix der Interferenzschicht der Dicke  $d$ , für die gilt:

$$M = \begin{bmatrix} \cos(kd) & -\frac{i}{n_{\text{Schicht}}} \sin(kd) \\ -in_{\text{Schicht}} \sin(kd) & \cos(kd) \end{bmatrix} \quad \text{mit } k = \frac{2\pi n_{\text{Schicht}}}{\lambda}. \quad (13)$$

Liegen  $N$  planparallele Schichten übereinander, läßt sich die Transfermatrix dieses Multischichtsystems darstellen als

$$M_1 M_2 M_3 \dots M_N = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \quad (14)$$

Löst man nun Gl. (12) nach dem Reflexionsverhältnis  $r$  auf, so kann daraus der Reflexionskoeffizient  $R = |r|^2$  für das Multischichtsystem berechnet werden nach:

$$R(\lambda) = \left( \left| \frac{An_{\text{Substrat}} + Bn_{\text{Superstrat}}n_{\text{Substrat}} - C - Dn_{\text{Superstrat}}}{An_{\text{Substrat}} + Bn_{\text{Superstrat}}n_{\text{Substrat}} - C - Dn_{\text{Superstrat}}} \right| \right)^2 \quad (15)$$

Das Interferenzspektrum eines Multischichtsystems entspricht dem Quotienten aus Reflexionskoeffizient des Multischichtsystems und dem entsprechenden Reflexionskoeffizienten des Multischichtsystems ohne Interferenzschicht (Fowles 1989):

$$\text{Interferenz}(\lambda) = \frac{R(\lambda)_{\text{mit Interferenzfilm}}}{R(\lambda)_{\text{ohne Interferenzfilm}}} \quad (16)$$

Die in Abschnitt 4.4 berechneten Schichtdicken wurden mit Hilfe der Gleichungen (15) und (16) ermittelt.

#### 2.2.2.4 Beschreibung von Interferenzspektren

Die Modulationstiefe des Interferenzspektrums, d. h. die Differenz zwischen im Interferenzmaximum reflektierter Intensität  $I_{max}$  und im Interferenzminimum reflektierter Intensität  $I_{min}$ , wird als Nutzsinalhub  $I_{Ifz}$  bezeichnet. Der Quotient aus Nutzsinalhub  $I_{Ifz}$  und maximal reflektierter Intensität  $I_{max}$  ist der Nutzsinalanteil  $I_N$ . Folgende Gleichung faßt dies zusammen.

$$I_N = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} = \frac{I_{Ifz}}{I_{max}} \quad (17)$$

Anschaulich bedeutet dies, daß der Nutzsinalanteil  $I_N$  den Anteil am reflektierten Licht beschreibt, der die Informationen über die Interferenzschicht trägt.

Offset-Anteile schränken den dynamischen Bereich des Detektors ein, was zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führt. Daher wird die Umgebung der Schicht möglichst reflexionsfrei gehalten. Beispielsweise wird durch Verdrängen der Luft ( $n_D \approx 1.000$ , (Lide 1999)) im Spalt zwischen Lichtleiter und Glassubstrat (s. Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9) durch Glycerin ( $n_D = 1.454$ , (Fluka 1999)) die Differenz der Brechungsindices herabgesetzt, wodurch störende Reflektivitäten vermindert werden (Brecht 1993).

#### 2.2.3 Bindungsassays mit RIfS

Die Änderung der Schichtdicke des oberflächenempfindlichen RIfS-Transducers durch Anlagerung von Molekülen führt zu einer Verschiebung des Interferenzmusters (Abschnitt 2.2.1), die proportional zur Schichtdickenänderung und damit zur Anzahl der angelagerten Moleküle ist. Dies ermöglicht eine verhältnismäßig einfache Quantifizierung der Vorgänge an der Oberfläche. Es wird eine Auflösung der optischen Schichtdicke  $nd$  von bis zu 1 pm erreicht (Brecht und Gauglitz 1997).

In der vorliegenden Arbeit wird die RIfS im Rahmen von Bindungsassays eingesetzt. Unter geeigneten Randbedingungen ist hier die Bestimmung thermodynamischer oder kinetischer Größen der Bindungsreaktion möglich (Piehler *et al.* 1997a; Abschnitt 4.2), die Konzentrationsbestimmung von Lösungen kleiner Moleküle z. B. für die Umweltanalytik (Brecht *et al.* 1995; Abschnitt 4.3) sowie die Beurteilung der Schichtdickenzunahme durch Proteinadsorption (Rothmund *et al.* 1997; Abschnitt 4.4).

## 2.3 Immunoassays mit markierungsfreier Detektion

### 2.3.1 Das Antigen/Antikörper-System

#### 2.3.1.1 Herstellung der Antikörper

Antikörper (Ak) werden innerhalb der humoralen Immunabwehr höherer Lebewesen von den B-Lymphozyten gebildet (Roitt 1995). Zur gezielten Darstellung von Antikörpern wird einem Tier wiederholt das entsprechende Antigen gespritzt. Wenn Antikörper an verschiedene Stellen eines Antigens (Ag; auch: Analyt) binden können, kommt es *in vivo* zur Bildung eines Gemisches von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität (polyklonale Antikörper), selbst wenn mit einheitlichem Antigen immunisiert wurde. Kleine Moleküle (Haptene) müssen erst auf ein hochmolekulares Trägerprotein gebunden werden, um eine Immunantwort auszulösen. Diese ist dann zwar zum größten Teil gegen Sequenzen des Trägerproteins gerichtet, jedoch auch gegen die durch das Hapten gebildete Antigen-Determinante (Epitop) und damit gegen das Molekül selbst (Cooper 1981).

Nach der Immunisierung werden die entsprechenden Immunglobuline (Ig, am häufigsten IgG) aus dem Serum isoliert. Je nach Bedarf können die isolierten Immunglobuline noch durch Affinitätschromatographie in monospezifische Antikörper (heterogene Population) aufgetrennt werden, die verschiedene Determinanten desselben Antigens erkennen (Pingoud und Urbanke 1997). Monoklonale Antikörper (einheitliche Spezifität, homogene Population) sind Sekretionsprodukte von Hybridom-Zellklonen. Diese Klone werden durch Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen gewonnen. Damit besitzen sie sowohl die antikörperproduzierende Fähigkeit der B-Lymphozyten als auch die Langzeitüberlebensfähigkeit der Myelomzellen in Gewebekultur (Liddell und Weeks 1996).

#### 2.3.1.2 Eigenschaften der Antikörper

Antikörper (Immunglobuline) gehören zu den Glykoproteinen. Die IgG-Moleküle bestehen aus zwei schweren ( $M_G \approx 50\,000$  g/mol) und zwei leichten Ketten ( $M_G \approx 25\,000$  g/mol), die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die schweren Ketten sind in der Mitte geknickt, wodurch die typische Y-Form gebildet wird. Die leichten Ketten sind an den Armen des Y befestigt. Bei

der Spaltung eines Antikörpers durch das Enzym Papain erhält man drei Fragmente. Die beiden aus den Armen des Y gebildeten  $F_{ab}$ -Fragmente ( $ab \hat{=}$  Antigen-bindend) enthalten die für die Erkennung von Antigenen notwendigen Sequenzen und unterscheiden sich deshalb je nach Antigen, gegen das sie gebildet wurden. Das dritte Fragment, das  $F_c$ -Fragment ( $c \hat{=}$  kristallisierbar), ist bei allen Antikörpern einer Wirtsklasse identisch aufgebaut (Cooper 1981). Die Größe eines Antikörpers beträgt bis zu 12 nm bei linearer und ca. 7.5 nm bei sphärischer Anordnung. Damit liegt die Antikörperkonzentration bei vollständiger Bedeckung einer Oberfläche (Monolage) bei ca.  $10 \text{ ng/mm}^2$ , das entspricht ca.  $10^{-13} \text{ mol/mm}^2$  (Brecht 1993).

Aufgrund der enthaltenen Tyrosin- und Tryptophan-Gruppen hat IgG, wie auch andere Proteine, ein Absorptionsmaximum bei 278 nm, der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{278}$  beträgt  $201\,700 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$  (Wells *et al.* 1965). Damit ist eine absorptive Konzentrationsbestimmung des IgG möglich, allerdings kann hier nicht zwischen aktiven, gegen das gewünschte Antigen entwickelten, Antikörpern und inaktiven Antikörpern oder anderen Proteinen unterschieden werden. Daher werden meist Präzipitationsmethoden zur Konzentrationsbestimmung angewandt (Cooper 1981). Auch mit Hilfe der Affinitätstitration kann die Konzentration an bindungsfähigen Antikörpern ermittelt werden (Abschnitt 2.3.3.1).

### **2.3.1.3 Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes**

Die spezifischen, nichtkovalenten Bindungskräfte zwischen Antigen und Antikörper beruhen auf abstandsabhängigen elektrostatischen Anziehungskräften ( $\sim 1/d^2$ ) und Van-der-Waals-Bindungen ( $\sim 1/d^6$ ) sowie auf hydrophoben Wechselwirkungen, bei denen vor allem der Entropieeffekt eine Rolle spielt. Daneben treten sterische Abstoßungskräfte ( $\sim 1/d^{12}$ ) auf. Demnach müssen für eine stabile Bindung die Raumstrukturen von Antigen und Antikörper so zueinander passen, daß die Anziehungskräfte die Abstoßungskräfte maximal übertreffen (Roitt 1995). Trotz dieser Voraussetzungen für die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes können Kreuzreaktivitäten auftreten, d. h. die Antikörper binden nicht spezifisch an eine bestimmte Antigen determinante, sondern reagieren zusätzlich mit anderen, strukturell ähnlichen Determinanten (Liddell und Weeks 1996).

### 2.3.2 Kinetik und Thermodynamik der Wechselwirkungsprozesse während eines Immunoassays mit markierungsfreier Detektion

#### 2.3.2.1 Wechselwirkungsprozesse im Überblick

Abbildung 2.10 zeigt eine Übersicht über die möglichen Wechselwirkungsprozesse bei einem markierungsfreien Bindungsassay unter Ausnutzung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Der Antikörper ist in Lösung, während das Antigen sowohl in Lösung als auch an der Oberfläche immobilisiert ist. Diese Anordnung hat bei markierungsfreien optischen Nachweismethoden den Vorteil, daß während des Assays der größere Bindungspartner an die Oberfläche bindet, was einen größeren Effekt hervorruft als der umgekehrte Fall (Lang *et al.* 1994).

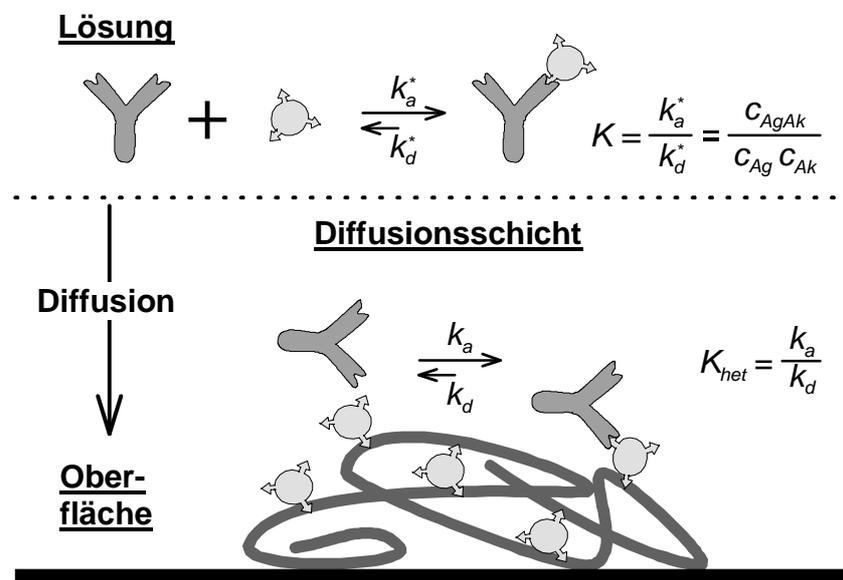


Abbildung 2.10: Wechselwirkungsprozesse im Überblick.

Ag = Antigen, Ak = Antikörper, AgAk = Antigen-Antikörper-Komplex.

In der Lösung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Antigen, Antikörper und Antigen-Antikörper-Komplex ein. Über der Oberfläche bildet sich eine Diffusionsschicht aus, unabhängig davon, ob die Lösung steht oder sich im Fluß befindet, keine Strömung ausgebildet wird. Bei zunehmender Fließgeschwindigkeit der Lösung oder bei Verkleinerung der Dimensionen des Flußkanals wird die Dicke dieser Grenzschicht verringert (Guyon *et al.* 1997).

Die Bindung von Antikörpern an auf der Oberfläche immobilisiertes Antigen läßt sich nun formal in zwei Schritte gliedern, da die Antikörper erst aus der Lösung zur Oberfläche hin diffundieren müssen, bevor sie dort binden können. Ist

dieser Massentransport an die Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so bezeichnet man die Reaktion als Massentransport-kontrolliert (auch: diffusionskontrolliert). Ist die Bindung selbst geschwindigkeitsbestimmend, so spricht man von einer kinetisch kontrollierten (auch: reaktionskontrolliert) Reaktion (Glaser 1993). Welcher dieser beiden Schritte tatsächlich geschwindigkeitsbestimmend ist, kann durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen gesteuert werden.

Die Massentransport-kontrollierte Bindung wird durch eine hohe Oberflächenkonzentration des immobilisierten Analyten und eine langsame Diffusion der Antikörper an die Oberfläche gefördert. Letztere ist durch eine hohe Dicke der Diffusionsschicht sowie die niedrigen Diffusionskoeffizienten der Antikörper begünstigt (Abschnitt 2.1.2.3). Dementsprechend wird die kinetisch kontrollierte Bindung durch eine niedrige Oberflächenkonzentration des immobilisierten Analyten und eine schnelle Diffusion der Antikörper an die Oberfläche gefördert, wobei letztere durch eine niedrige Diffusionsschichtdicke begünstigt ist (Eddowes 1987).

In der Praxis wird üblicherweise für mehrere Anwendungen derselbe Durchflußdetektor und damit derselbe Flußkanal verwendet. Die Fließgeschwindigkeit kann nicht beliebig erhöht werden, da sonst der Probenverbrauch zu hoch wird (Abschnitt 2.1.2.2). Außerdem sind die Diffusionskoeffizienten durch die ausgewählten Bindungspartner vorgegeben. Damit ist die Bindungskapazität der Oberfläche, d. h. die Dichte des darauf immobilisierten Analyten, derjenige Parameter, durch den der Reaktionsablauf am einfachsten gesteuert werden kann.

### 2.3.2.2 *Kinetische Betrachtungen*

#### 2.3.2.2.1 *Geschwindigkeitsgleichung der Bildung des Ag-Ak-Komplexes in Lösung*

Die Bildung des Ag-Ak-Komplexes wird als bimolekulare Reaktion 2. Ordnung betrachtet, der Zerfall als monomolekulare Reaktion 1. Ordnung. Damit ergibt sich für die Geschwindigkeit der Komplexbildung in Lösung folgende Differentialgleichung (Klein 1991):

$$\frac{dc_{AgAk}}{dt} = k_a^* \cdot c_{Ag} \cdot c_{Ak} - k_d^* \cdot c_{AgAk} \quad (18)$$

### 2.3.2.2.2 Geschwindigkeitsgleichung der Bildung des Ag-Ak-Komplexes auf der Oberfläche

Aufgrund des auf der Oberfläche immobilisierten Ag entspricht die Bildung des Ag-Ak-Komplexes der Bindung von Ak auf der Oberfläche. Für die Assoziation an die Oberfläche wird zunächst eine bimolekulare Reaktion 2. Ordnung angenommen, für die Dissoziation von der Oberfläche eine monomolekulare Reaktion 1. Ordnung. Man erhält ein Geschwindigkeitsgesetz analog Gleichung (18).

Die Konzentration des immobilisierten Ag kann nun auch als Konzentration der Oberflächenbindungsstellen ausgedrückt werden. Dann wäre  $\Gamma_{max}$  die Konzentration derjenigen Bindungsstellen auf der Oberfläche, die maximal von Ak besetzt werden können, d. h. unter Berücksichtigung von Größe und intermolekularen Wechselwirkungen (Sadana und Ram 1994).  $\Gamma(t)$  entspräche der Konzentration der momentan besetzten Bindungsstellen auf der Oberfläche und damit der Konzentration des über das Ag immobilisierten Ag-Ak-Komplexes. Ausgehend von Gleichung (18) erhält man daraus folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot (\Gamma_{max} - \Gamma(t)) \cdot c_{Ak} - k_d \cdot \Gamma(t) \quad (19)$$

Werden die durch Bindung an die Oberfläche verbrauchten Ak nachgeliefert, sei es durch Arbeiten im Fluß oder durch Rühren im Reaktionsgefäß, ändert sich von den Konzentrationen der Bindungspartner während der Reaktion lediglich diejenige der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche. Damit liegt eine Bindungsreaktion (pseudo-)erster Ordnung vor und das Geschwindigkeitsgesetz vereinfacht sich zu (Schwetlick *et al.* 1989):

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c_{Ak} \cdot \Gamma_{max} - \underbrace{(k_a \cdot c_{Ak} + k_d)}_{k_{obs}} \cdot \Gamma(t) \quad (20)$$

Es wird demnach aus dem Geschwindigkeitsgesetz der Bindung von Ak an die Oberfläche eine observable Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  erhalten, die neben der konstanten Antikörperkonzentration die Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation enthält (Piehler 1997).

### 2.3.2.2.3 Geschwindigkeitsgleichung der Dissoziation von der Oberfläche

Der Zerfall des über das Ag auf der Oberfläche immobilisierten Ag-Ak-Komplexes wird als monomolekulare Reaktion erster Ordnung betrachtet (s.o.).

Analog Gleichung (19) erhält man für diese Dissoziationsreaktion folgendes Geschwindigkeitsgesetz (Piehler 1997):

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = -k_d \cdot \Gamma(t) \quad (21)$$

#### 2.3.2.2.4 Ermittlung kinetischer Größen aus dem Bindungsassay

Wie in Abschnitt 2.2.3 erläutert, ist bei der Verwendung markierungsfreier Nachweismethoden, wie z. B. RIfS, das Detektorsignal direkt proportional zu der pro Zeiteinheit auf der Oberfläche gebundenen Ak. Deshalb wird zur Vereinfachung im folgenden für das Signal ebenfalls die Variable  $\Gamma(t)$  verwendet.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion in Lösung  $k_a^*$  und  $k_d^*$  können bei bekannten Ausgangskonzentrationen von Ag und Ak durch Verfolgung der Konzentrationsänderung mindestens eines der Reaktionspartner während der Reaktion ermittelt werden. Beim „Kinetic Inhibition Assay“ (KIA) wird dazu die Konzentration der freien Antikörper zu jedem Zeitpunkt der Reaktion durch Massentransport-kontrollierte Bindung auf der Oberfläche bestimmt. Näheres siehe (Jung *et al.* 2000).

Für die Ermittlung der observablen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  der Ak-Bindung an die Oberfläche sind mehrere Möglichkeiten vorhanden.

- a) Nach Gleichung (20) ergibt sich bei Auftragung der Ableitung des Signals  $d\Gamma(t)/dt$  gegen das Signal  $\Gamma(t)$  eine Gerade mit der Steigung  $-k_{obs}$  (Karlsson *et al.* 1991).

Diese Auswertung ermöglicht gleichzeitig die Beurteilung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Bindungsreaktion, da dieser lineare Zusammenhang nur bei kinetischer Kontrolle gilt. Überwiegt im Anfangsbereich der Bindungskurve noch der Massentransport, so kann die Abweichung der entsprechenden Werte bei linearer Auftragung visuell einfach erkannt und der Auswertebereich entsprechend angepaßt werden.

- b) Löst man die Differentialgleichung in Gleichung (20) nach  $\Gamma(t)$  auf, erhält man:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (22)$$

Wenn der Bereich der überwiegenden kinetischen Kontrolle festgelegt ist, dann kann die Funktion (22) daran angepaßt und die observable Geschwin-

digkeitskonstante  $k_{obs}$  aus dieser Kurvenanpassung ermittelt werden (O'Shannessy und Winzor 1996).

Nach dem Zusammenhang  $k_{obs} = k_a c_{Ak} + k_d$  können die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten durch Kurvenanpassung auch direkt ermittelt werden. Simulationsrechnungen zeigten jedoch, daß dann die durch Kurvenanpassung erhaltenen Werte von den vorgegebenen Werten abweichen.

- c) Eine weiterer Ansatz zur Auswertung ist die numerische Integration, die teilweise auch als formale Integration bezeichnet wird (Mauser 1974). Dazu wird Gleichung (20) umgeformt zu:

$$\underbrace{\frac{\Delta\Gamma(t)}{\Delta t}}_{\text{Ordinate}} = k_a \cdot c_{Ak} \cdot \Gamma_{max} - k_{obs} \cdot \underbrace{\frac{\int \Gamma(t) dt}{\Delta t}}_{\text{Abszisse}} \quad (23)$$

Für das Integral  $\int \Gamma(t) dt$  kann in der Regel keine Stammfunktion angegeben werden. Es numerisch zu lösen bedeutet, daß die Fläche (bzw. die Flächenausschnitte bei  $\Delta t$ ) unter der Bindungskurve (Abbildung 2.6 ③) mittels angepaßter Trapeze angenähert wird. Als verbessertes Verfahren hat sich die zu den Runge-Kutta-Methoden gehörige Methode von Heun erwiesen, bei der die Einzelintegrale aus Gleichung (23) aufsummiert werden. Daraus ergibt sich (Björck und Dahlquist 1979):

$$\underbrace{\frac{\Delta\Gamma(t + \delta t)}{\Delta t + \delta t}}_{\text{Ordinate}} = k_a \cdot c_{Ak} \cdot \Gamma_{max} - k_{obs} \cdot \underbrace{\frac{\int \Gamma(t) dt + \int \Gamma(\delta t) dt}{\Delta t + \delta t}}_{\text{Abszisse}} \quad (24)$$

In beiden Fällen erhält man bei der Auftragung der jeweiligen Ordinate gegen die Abszisse eine Gerade, aus deren Steigung  $k_{obs}$  ermittelt werden kann. Analog a) ermöglicht auch dieses Verfahren eine einfache visualisierte Überprüfung des Auswertebereichs, da der lineare Zusammenhang hier ebenfalls nur bei überwiegender kinetischer Kontrolle der Reaktion gilt.

Eine weitere Kontrolle bietet die Rückwärtsintegration, d. h. Integration nach Vertauschen der Integralgrenzen, die die zusätzliche Berechnung des Achsenabschnitts durch Interpolation und damit einen besseren Vergleich mit dem theoretischen Wert ermöglicht (Niemann und Mauser 1972).

Hat man nun mittels a), b) oder c) die observable Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  für verschiedene Antikörperkonzentrationen  $c_{Ak}$  bestimmt, so wird durch Auftragung von  $k_{obs}$  gegen  $c_{Ak}$  nach dem Zusammenhang

$$k_{obs} = k_a \cdot c_{Ak} + k_d \quad (25)$$

die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_a$  aus der Steigung und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_d$  aus dem Achsenabschnitt ermittelt (Karlsson *et al.* 1991).

Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von der Oberfläche  $k_d$  gibt es noch weitere Möglichkeiten.

a') Trägt man nach Gleichung (21) die Ableitung des Signals  $d\Gamma(t)/dt$  gegen das Signal  $\Gamma(t)$  selbst auf, so erhält man eine Ursprungsgerade mit der Steigung  $-k_d$  (nach Karlsson *et al.* 1991). Wieder ist hier eine visuelle Kontrolle des Reaktionsverlaufs durch Betrachtung der Linearität möglich.

b') Löst man die Differentialgleichung aus Gleichung (21) nach  $\Gamma(t)$  auf, so erhält man folgenden Zusammenhang:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot e^{-k_d t} \quad (26)$$

Aus Gleichung (26) kann  $k_d$  durch Kurvenanpassung ermittelt werden (O'Shannessy *et al.* 1993).

c') Für die numerische Integration wird Gleichung (21) umgeformt zu:

$$\underbrace{\Delta\Gamma(t)}_{\text{Ordinate}} = -k_d \cdot \underbrace{\int \Gamma(t) dt}_{\text{Abszisse}} \quad (27)$$

bzw. nach Aufsummieren der Einzelintegrale nach der Methode von Heun (Björck und Dahlquist 1979):

$$\underbrace{\Delta\Gamma(t + \delta t)}_{\text{Ordinate}} = -k_d \cdot \underbrace{\left( \int \Gamma(t) dt + \int \Gamma(\delta t) dt \right)}_{\text{Abszisse}} \quad (28)$$

In beiden Fällen wird nach Auftragung von Ordinate gegen Abszisse eine Ursprungsgerade mit der Steigung  $-k_d$  erhalten. Wie schon in a') ist eine visuelle Kontrolle des Reaktionsverlaufs möglich. Die Berechnung des Achsenabschnitts durch Rückwärtsintegration ermöglicht auch hier einen besseren Vergleich mit dem theoretischen Wert, der in diesem Fall 0 ist (Niemann und Mauser 1972).

Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation liegen bei niedermolekularen Liganden zwischen  $10^7 - 10^8$  l/(mol·s) und bei makromolekularen Verbindungen ein bis zwei Größenordnungen darunter. Dieser Unterschied hängt im wesentlichen mit den verschiedenen Diffusionsraten der Moleküle zusammen (Wedler 1997). Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation schwanken im Bereich von  $10^{-4} - 10^3$  1/s (Brecht 1993).

#### 2.3.2.2.5 Rückbindung

Nach Dissoziation des Antikörpers von der Oberfläche in die Diffusionsschicht hinein, ist bei endlicher Dicke dieser Schicht eine erneute Bindung desselben Antikörpers an die Oberfläche möglich (Shoup und Szabo 1982). Aufgrund dieser Rückbindung wird die durch die Dissoziation hervorgerufene Signaländerung vermindert, was zu einer Verfälschung von  $k_d$  zu niedrigeren Werten hin führt. Da  $k_d$  auch in das Geschwindigkeitsgesetz der Bindung an die Oberfläche eingeht, wird  $k_d$  nach Gleichung (20) bzw. Gleichung (25) zu höheren Werten hin verfälscht.

Zur Vermeidung von Rückbindungseffekten kann man zum einen die Fließgeschwindigkeit erhöhen, um die Dicke der Diffusionsschicht zu verringern, und zum anderen mit niedriger Oberflächendichte an immobilisiertem Antigen sowie nahe der Sättigungsbelegung  $\Gamma_{\max}$  arbeiten, damit für abdissoziierte Antikörper weniger (Rück-)Bindungsstellen zur Verfügung stehen (Piehler 1997).

### 2.3.2.3 Thermodynamische Betrachtungen

#### 2.3.2.3.1 Gleichgewichtskonstante der Reaktion in Lösung

Für die Gleichgewichtsreaktion in Lösung  $Ag + Ak \rightleftharpoons AgAk$  erhält man mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes für die Gleichgewichtskonstante  $K$

$$K = \frac{c_{AgAk}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak}} = \frac{c_{AgAk}}{(c_{0,Ag} - c_{AgAk}) \cdot (c_{0,Ak} - c_{AgAk})} \quad (29)$$

mit  $c_{Ag}$  : Gleichgewichtskonzentration des freien Ag  
 $c_{0,Ag}$  : Gesamtkonzentration des Ag  
 $c_{Ak}$  : Gleichgewichtskonzentration der freien Ak-Bindungsstellen  
 $c_{0,Ak}$  : Gesamtkonzentration der Ak-Bindungsstellen  
 $c_{AgAk}$  : Gleichgewichtskonzentration der besetzten Bindungsstellen.

Die aus (29) resultierende quadratische Gleichung hat für die Konzentration der besetzten Bindungsstellen  $c_{AgAk}$  nur eine sinnvolle Lösung:

$$c_{AgAk} = \frac{c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{\left(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}} \quad (30)$$

Demnach hängt die Konzentration an besetzten Bindungsstellen nur von den Ausgangskonzentrationen der Ag- und Ak-Bindungsstellen ab sowie von der Gleichgewichtskonstanten.

Für monovalente Antikörper (-Fragmente,  $F_{ab}$ ) ergibt sich die Konzentration der verbleibenden Bindungsstellen und damit die Konzentration der bindungsfähigen Antikörper  $c_{Ak,bind}$  zu

$$c_{Ak,bind} = c_{0,Ak} - c_{AgAk} \quad (31)$$

und nach Einsetzen von Gleichung (30) in Gleichung (31) zu

$$c_{Ak,bind} = \frac{c_{0,Ak} - c_{0,Ag} - \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{\left(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}} \quad (32)$$

Bei divalenten Antikörpern ist die Ak-Konzentration halb so groß wie die der Ak-Bindungsstellen insgesamt. Der Antikörper kann erst dann keine Antigene mehr binden, wenn beide Bindungsstellen besetzt sind. Damit läßt sich die Konzentration an bindungsfähigen divalenten Antikörpern (IgG) berechnen nach

$$c_{Ak,bind} = \frac{c_{0,Ak}}{2} - \frac{c_{AgAk}^2}{2c_{0,Ak}} \quad (33)$$

bzw. nach Einsetzen von Gleichung (30) in Gleichung (33) nach

$$c_{Ak,bind} = \frac{c_{0,Ak}}{2} - \frac{\left( \frac{c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{\left(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}} \right)^2}{2c_{0,Ak}} \quad (34)$$

(Piehler *et al.* 1997a).

### 2.3.2.3.2 Gleichgewichtskonstante der Reaktion an der Oberfläche

Bei der kinetisch kontrollierten Reaktion an der Oberfläche ändert sich im Gleichgewicht die Konzentration der besetzten Bindungsstellen  $\Gamma_{GG}$  während der Zeit nicht. Damit erhält man aus Gleichung (19) folgenden Zusammenhang:

$$k_a \cdot c_{Ak} \cdot (\Gamma_{max} - \Gamma_{GG}) = k_d \cdot \Gamma_{GG} \quad (35)$$

Aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation kann die Gleichgewichtskonstante der Reaktion an der Oberfläche berechnet werden nach:

$$K_{het} = \frac{k_a}{k_d} \quad (36)$$

Die Linearisierung nach Scatchard, d. h. Die Umformung von Gleichung (35) unter Berücksichtigung von Gleichung (36), ergibt dann folgenden Zusammenhang (Klein 1991):

$$\frac{\Gamma_{GG}}{c_{Ak}} = K_{het} \cdot \Gamma_{max} - K_{het} \cdot \Gamma_{GG} \quad (37)$$

### 2.3.2.3.3 Ermittlung thermodynamischer Größen aus dem Bindungsassay

Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion in Lösung wird mit Hilfe der Gleichungen (32) bzw. (34) bestimmt. Dazu wartet man die Gleichgewichtseinstellung unterschiedlicher Antigen-Antikörper-Mischungen bekannter Ausgangskonzentrationen ab und bestimmt anschließend die Gleichgewichtskonzentration der freien Antikörperbindungsstellen durch Massentransport-kontrollierte Bindung an die Oberfläche (Affinitätstitration, s. Abschnitt 2.3.3.1). Damit die Ergebnisse mit Hilfe einer Kurvenanpassung sinnvoll ausgewertet werden können, wird  $c_{0,Ag}$  variiert, während  $c_{0,Ak}$  sowie die Volumina der zusammengegebenen Lösungen gleich gehalten werden (Piehler *et al.* 1997a).

Lägen die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion in homogener Phase vor, könnte man die Gleichgewichtskonstante  $K$  zusätzlich durch Quotientenbildung analog Gleichung (36) bestimmen (Schwetlick *et al.* 1989).

Die Gleichgewichtskonstante der Oberflächenreaktion  $K_{het}$  läßt sich zum einen aus der Auftragung nach Scatchard als negative Steigung der Funktion  $f(\Gamma_{GG}) = \Gamma_{GG}/c_{Ak}$  ermitteln (Gleichung (37), (Klein 1991)) und zum anderen als Quotient der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation be-

rechnen (Gleichung (36)). Dabei ist zu beachten, daß Rückbindungseffekte (Abschnitt 2.3.2.2.5) zu einer Verfälschung von  $K_{het}$  zu höheren Werten hin führen.

Für die Gleichgewichtskonstante wurden Werte im Bereich von  $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  bis  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  gefunden (Scheller und Schubert 1989). Wie aus Abschnitt 2.3.2.2.4 abgeleitet werden kann, kommt die Breite dieses Bereichs vornehmlich durch die Variationsbreite der  $k_d$ - bzw. der  $k_d^*$ -Werte zustande.

#### 2.3.2.3.4 Gleichgewichtskonstante, Affinität und Avidität

Bei Antigen/Antikörper-Systemen, wird die Gleichgewichtskonstante häufig als Affinitätskonstante oder Affinität bezeichnet. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Affinität nur die Bindung zwischen einer einzelnen antigenen Determinante und dem entsprechenden Bindungsort beschreibt. Werden zwischen einem multivalenten Antikörper und einem multivalenten Antigen mehrere Bindungen gleichzeitig ausgebildet, wird die Gleichgewichtskonstante als Avidität (Roitt 1995) oder auch als „funktionelle Affinität“ (Mattes 1999) bezeichnet.

Befindet sich ein Antikörper in Lösung und sind die entsprechenden Antigene klein (Haptene), so beeinflussen sich die Bindungsreaktionen aufgrund der räumlichen Trennung der beiden  $F_{ab}$ -Bindungsstellen gegenseitig nicht. Damit wäre die Gleichgewichtskonstante die Affinitätskonstante dieser Reaktion. Sind die Antigene dagegen auf einer Oberfläche immobilisiert, so können bei genügend großer Bindungsstellendichte Antikörper mit beiden  $F_{ab}$ -Bindungsstellen auf der Oberfläche binden. Die Gleichgewichtskonstante würde dann der Avidität der Bindungsreaktion entsprechen. Zwar hängt die Avidität von den Affinitäten der einzelnen Bindungen ab, sie ist jedoch größer als die Summe dieser Affinitäten (Roitt 1995). Das liegt vor allem daran, daß die Dissoziationskonstante  $k_d$  stark verringert ist, da sich beim Abdissoziieren des Antikörpers mehrere Bindungen gleichzeitig lösen müssen (Mattes 1999). Damit sind durch den Vergleich der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion in Lösung mit dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion an der Oberfläche Aussagen über das Vorliegen von Aviditäten bzw. „funktionellen Affinitäten“ möglich.

Üblicherweise sind die unter physiologischen Bedingungen vorkommenden Antigene multivalent, d. h. Aviditäten kommen häufiger vor als Affinitäten. Dafür vermitteln aber Hapten-Antikörper-Reaktionen einen besseren Einblick in die immunochemische Natur der Antigen-Antikörper-Reaktion (Roitt 1995).

### 2.3.3 Immunoassay mit FIA und markierungsfreier Detektion am Beispiel des Bindungshemmtests

#### 2.3.3.1 Bindungshemmtest für die Affinitätstitration

Bei Massentransport-kontrollierter Bindung von Antikörpern an immobilisierte Antigene gilt das 1. Ficksche Gesetz (Wedler 1997). Dann bleibt bei gleichbleibender Antikörperkonzentration in Lösung die Zahl der Antikörper, die pro Zeiteinheit an die Oberfläche bindet, ebenfalls gleich. Bei markierungsfreier Detektion führt dies zu einer linearen Signalzunahme und damit zu einer konstanten Steigung der Bindungskurve. Diese Steigung ist dann proportional zur Konzentration der bindungsfähigen Antikörper in Lösung (Piehler *et al.* 1997a).

Beim Bindungshemmtest werden diese Steigungen zur Konzentrationsbestimmung der freien Antikörperbindungsstellen von sich im Gleichgewicht befindlichen Antigen-Antikörper-Lösungen verwendet und für die Kalibrierkurve gegen die logarithmisch skalierten Antigenkonzentrationen aufgetragen. Dieses Testformat kann einerseits bei gleichartigen Bindungsstellen zur Bestimmung der Affinitätskonstanten dieses Antigen/Antikörper-Systems angewandt werden (Abschnitt 2.3.2.3.3). Dann spricht man auch von einer Affinitätstitration und bezeichnet die zugehörigen Kalibrierkurven als Titrationskurven. Andererseits kann mit diesem Verfahren auch die Ausgangskonzentration an aktiven Antikörperbindungsstellen bestimmt werden. Es muß jedoch beachtet werden, daß lediglich in Systemen, in denen die Affinitätskonstante kleiner ist als die reziproke Antikörperbindungsstellenkonzentration, die Affinitätskonstante für die Lage der Titrationskurve ausschlaggebend ist und so mit dieser Methode bestimmt werden kann. Umgekehrt sind Titrationskurven von Systemen, bei denen die Affinitätskonstante größer ist als die reziproke Antikörperbindungsstellenkonzentration, besser geeignet zur Bestimmung der Konzentration an aktiven Antikörperbindungsstellen, da nun diese die Lage der Titrationskurve entscheidend beeinflußt (Piehler 1997).

Eine weitere Anwendung des Bindungshemmtests ist die Konzentrationsbestimmung von Antigenen mit kleinem Molekulargewicht (Lang *et al.* 1996). Die folgende Abbildung soll veranschaulichen, welchen Einfluß niedrige bzw. hohe Affinitätskonstanten auf diese Anwendung haben.

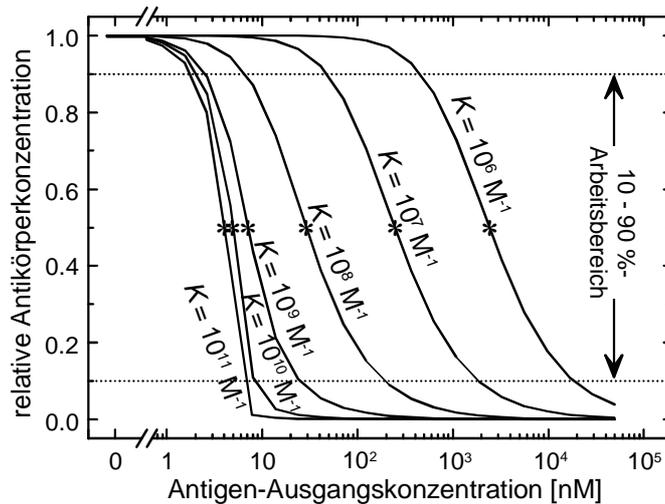


Abbildung 2.11: Kalibrierkurven aus dem Bindungshemmtest für verschiedene Affinitätskonstanten  $K$  nach Gleichung (34) für zweiwertige Antikörper mit  $c_{0,AK} = 6 \text{ nM}$ . Die jeweiligen Testmittelpunkte sind mit Stern gekennzeichnet.

Abbildung 2.11 zeigt die Kalibrierkurven mit Testmittelpunkt und 10 - 90 %-Arbeitsbereich von Antigen/Antikörper-Systemen gleicher Ausgangskonzentrationen an Antigen und Antikörper sowie verschiedener Affinitätskonstanten.

Bei hohen Affinitätskonstanten ( $K \geq 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) kann durch geeignete Wahl der Antikörperausgangskonzentration die Lage der Kalibrierkurven in den Bereich niedriger Antigenkonzentrationen verschoben werden. Die sigmoidalen Kalibrierkurven sind sehr steil, was zum einen zu einer hohen Empfindlichkeit führt, zum anderen jedoch zu Arbeitsbereichen, die unter einer Größenordnung liegen. Dies ist für analytische Anwendungen nicht ausreichend (Schwedt 1995).

Bei niedrigeren Affinitätskonstanten wird zwar der Arbeitsbereich größer, jedoch verschiebt sich der Testmittelpunkt zu höheren Antigenkonzentrationen hin und die Empfindlichkeit nimmt ab. Da nun die Affinitätskonstante ausschlaggebend für die Lage der Kalibrierkurve ist, kann letztere nicht mehr über die Antikörperkonzentration zu niedrigeren Antigenkonzentrationen hin verschoben werden. Dies ist ebenfalls ungünstig für analytische Anwendungen, bei denen teilweise Nachweisgrenzen  $< 1 \text{ nM}$  verlangt sind (EWG 1980).

Für die Analytik niedermolekularer Verbindungen ist es daher notwendig, die Durchführung des Bindungshemmtests dahingehend zu verändern, daß bei der Auswertung der Detektorsignale Kalibrierkurven erhalten werden, deren Arbeitsbereich zu höheren Konzentrationen hin erweitert ist, ohne daß die Nachweisgrenze bei niedrigeren Konzentrationen schlechter ist.

### 2.3.3.2 Bindungshemmtest mit Gradientenansatz

Für das in Abschnitt 2.3.3.1 vorgestellte Testformat wurde jeweils das Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper in einer Lösung abgewartet, diese Lösung möglichst dispersionsfrei zum Detektor gebracht und dort die Gleichgewichtskonzentration an freien Antikörperbindungsstellen bestimmt.

Im neuen Ansatz soll die Antigen-Antikörper-Reaktion im Fluß auf dem Weg zum Detektor stattfinden, d. h. physikalische und chemische Dispersion (Abschnitt 2.1.2.5) sind nun erwünscht. Den Detektor erreichen Fluidelemente mit unterschiedlichen Verhältnissen Antigen : Antikörper in unterschiedlichen Stadien der Gleichgewichtseinstellung. Entscheidend für das Gelingen dieses Ansatzes ist eine ausreichende Geschwindigkeit dieser Gleichgewichtseinstellung. Zu deren Abschätzung wurde die Zeit des 90 %igen Antikörper-Umsatzes für verschiedene Verhältnisse  $c_{0,Ak}/c_{0,Ag}$  sowie  $k_a/k_d$  berechnet (Abbildung 2.12).

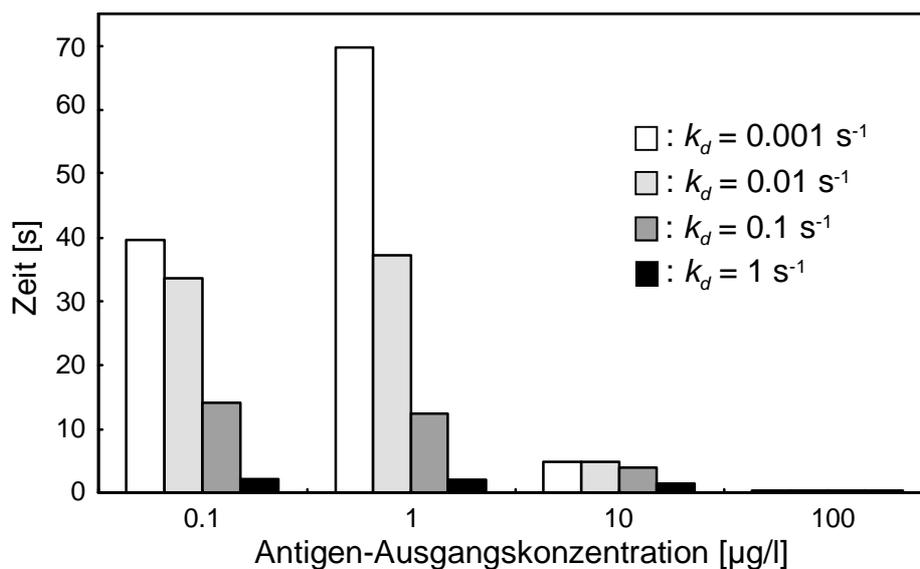


Abbildung 2.12: Zeit des Erreichens des 90 %igen Umsatzes für  $k_a = 10^7 \text{ l}/(\text{M}\cdot\text{s})$  (Piehler et al. 1997a),  $c_{0,Ak} = 6 \text{ nM}$ ,  $MG(\text{Ag}) = 200 \text{ g/mol}$ : Lineare Näherung nach 
$$c_{AgAk}(t+\Delta t) = c_{AgAk}(t) + k_a \cdot c_{Ag}(t+\Delta t) \cdot c_{Ak}(t+\Delta t) \cdot \Delta t - k_d \cdot c_{AgAk}(t) \cdot \Delta t.$$

Demnach ist der 90 %ige Antikörper-Umsatz nach maximal 70 s erreicht, d. h. innerhalb der üblichen Dauer eines Assays (15 min, mit Regeneration, (Mouvet et al. 1996)) sind bei verschiedenen  $c_{0,Ag}$ -Werten unterschiedliche Bindungskurven zu erwarten.

Durchführung und Auswertung dieses Gradientenansatzes war Teil der vorliegenden Arbeit und wurde in (Länge et al. 1999) veröffentlicht.

## **2.4 Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate**

### **2.4.1 Anforderungen an Implantate**

Als Implantat wird fremdes oder körpereigenes Material bezeichnet, das durch Eingriff von außen in den Körper eingepflanzt wird, um verlorengegangene Körperfunktionen strukturell und funktionell zu ersetzen (Thull 1994).

Zu den wichtigsten Anforderungen, die an Implantate gestellt werden, gehören Bioverträglichkeit, mechanische Festigkeit, Korrosions-, Degradations-, Auslaug-, Abrieb- und Verschleißfestigkeit, Verarbeitbarkeit sowie Sterilisierbarkeit. Davon ist lediglich die Sterilisierbarkeit durch Vorschriften geregelt (DAB 1991), da die anderen Eigenschaften von Implantationsfunktion und -ort sowie gewünschte Verweildauer im Körper abhängen. Die Verweildauer selbst richtet sich ebenfalls nach dem Verwendungszweck und der Verträglichkeit des Materials (Thull 1994).

Die Biokompatibilität beschreibt die Verträglichkeit von technischen, nichtbiologischen mit lebenden, biologischen Systemen. Entsprechend unterscheidet man zwischen der Strukturkompatibilität, die die Anpassung der Implantatstruktur an das mechanische Verhalten des Empfängergewebes beschreibt, und der Oberflächenkompatibilität, die die chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Eigenschaften von Implantatoberflächen umfaßt (Wintermantel und Suk-Woo 1998). Letztere kann durch gezielte Oberflächenmodifizierungen gesteigert werden. Für den Aufbau moderner Implantate werden deshalb vermehrt Verbundwerkstoffe eingesetzt, bei denen der Volumenwerkstoff vorwiegend mechanische Aufgaben erfüllt und der Oberflächenwerkstoff die Reaktivität mit den jeweiligen umgebenden Geweben bestimmt.

Damit ein Implantat die gestellten Anforderungen erfüllt, müssen die vorgegebenen Eigenschaften durch Material- und Bauteilprüfungen bestätigt werden. Anschließend werden die Ergebnisse dieser bei kurzen Prüfzeiten durchgeführten Tests auf die erwartete Betriebszeit im Körper hochgerechnet (Thull 1994).

### 2.4.2 Dentale Titan-Implantate

Titan hat sich als Werkstoff für dentale Implantate durchgesetzt. Titanlegierungen, die im Vergleich zum reinen Titan verbesserte mechanische Eigenschaften aufweisen, werden seltener verwendet (Wintermantel und Suk-Woo 1998).

Der Aufbau eines Zahnimplantats und sein Einbau in den Kiefer ist in Abbildung 2.13 schematisch dargestellt.

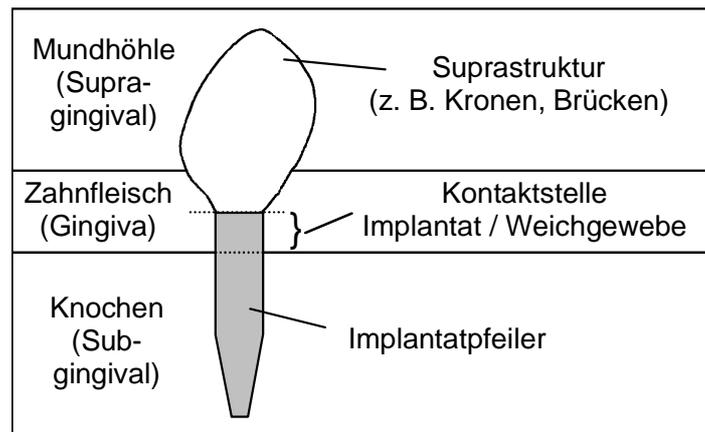


Abbildung 2.13: Einbau eines transgingivalen Titanimplantats im Kiefer.

Der Implantatpfeiler aus Titan ist im Kieferknochen verankert und ragt ins Zahnfleisch (Gingiva) hinein. Auf dem Pfeiler ist eine zahnähnliche Suprastruktur befestigt, die aus ästhetischen Gründen aus Keramik besteht. Sie ragt von der Mundhöhle aus ebenfalls ins Zahnfleisch hinein, so daß beide Bauteile im Weichgewebe aneinandergrenzen. Damit sind vier verschiedene Grenzzonen Werkstoffoberfläche/Biosystem zu betrachten, in denen jeweils unterschiedliche Anforderungen an das Implantat gestellt werden (Watzek 1993):

#### A) Suprastruktur/Mundhöhle

Im Bereich der Mundhöhle ist Bioadhäsion unerwünscht. Der Kontakt mit Speichel führt nacheinander zur Anlagerung von Proteinen (Pellikelbildung), Bakterienadhäsion und Plaqueakkumulation, die zu entzündlichen Prozessen führen und damit den Implantationserfolg beeinträchtigen können (König 1987; Rupp 2000).

#### B) Suprastruktur/Zahnfleisch und Implantatpfeiler/Zahnfleisch

In diesen Grenzzonen ist Bioadhäsion von Zellen erwünscht, um das Entstehen von Lücken zwischen Weichgewebe und Implantat zu vermeiden. Bei

schlechter Abdichtung können sonst aus der Mundhöhle Bakterien eindringen, die zu einer Periimplantitis (Entzündung des Weichgewebes um das Implantat) führen würden (König 1987).

### C) Implantatpfeiler/Knochen

Die Bioadhäsion beim Knochenkontakt ist Voraussetzung für eine lückenlose Verankerung des Implantats im Knochen. Beim Titan gelten die Oberflächeneigenschaften als ideal für die Osseointegration (Verbund ohne Einlagerung von Bindegewebsfasern) (Albrektsson 1984; Adell *et al.* 1990).

Die Auswahl von Titan als Werkstoff für dentale Implantate beruht demnach nicht nur auf seinen ausreichenden mechanischen Eigenschaften, sondern auch auf den günstigen Oberflächeneigenschaften, die die völlige knöcherne Integration des Implantats im Knochen fördern (Thull 1994).

Dentale Implantate sollen ihre Aufgabe über die Lebenserwartung des Patienten hinaus erfüllen. Gegenwärtig wird ihre Überlebensrate je nach Studie und Implantattyp mit 82 - 99 % angegeben, d. h. Material wie auch die chirurgische Versorgung haben einen hohen Stand erreicht (Spieckermann *et al.* 1994; d'Hoedt *et al.* 1996). Diese Überlebensrate ist zwar hoch, es gibt jedoch auch eine signifikante Anzahl von Fehlschlägen, beispielsweise durch Lockerungen oder periimplantäre Infektionen (Quirynen *et al.* 1992; Arys *et al.* 1998). Um solche Fehlschläge zu vermeiden, besteht ein Ansatz darin, die Eigenschaften des Titanimplantats durch geeignete Oberflächenmodifizierungen dahingehend zu optimieren, daß die Wechselwirkung zwischen Implantat und Weichgewebe verbessert und damit die Grenzzone zwischen beiden abgedichtet wird.

### 2.4.3 Biofunktionalisierung und Kontrolle der Modifizierung

Das Einsetzen eines Implantats in den Körper ruft eine biologische Antwort hervor, die mit der Anlagerung von Proteinen, Bakterien und Zellen beginnt (Wintermantel und Suk-Woo 1998). Eine ideale Oberfläche würde demnach die Anlagerung von Zellen, oder zumindest von Proteinen, die die anschließende Zelladsorption fördern, begünstigen und die Bakterienadhäsion vermindern. Die initiale Phase kann durch die Modifizierung der Oberfläche beeinflusst werden. Da diese Modifizierung biologische Vorgänge beeinflussen soll, wird sie auch als Biofunktionalisierung bezeichnet (Baquay *et al.* 1999).

Die Mikrostrukturierung der Implantatoberfläche ist eine Möglichkeit der Modifizierung, da sich die Topographie der Oberfläche offenbar sowohl auf die Zell- als auch auf die Proteinadsorption auswirkt (Eisenbarth *et al.* 1996; François *et al.* 1997).

Eine weitere Möglichkeit sind chemische Modifizierungen, bei denen neben Beschichtungen mit Keramik oder Kunststoff auch Proteinbeschichtungen in Betracht kommen. Da für die Anlagerung von Zellen auf dem Implantat auch Art und Struktur der bereits adsorbierten Proteine eine Rolle spielen, sind gerade Proteinbeschichtungen vielversprechend, bei denen die für die Zelladhäsion erforderlichen Sequenzen bereits vom Implantat vorgegeben wären. Beispielsweise wird durch Beschichtung von Titan mit dem adhäsiven Glycoprotein Fibronectin die Anlagerung von Fibroblasten (hochaktive Bindegewebszellen) um das zwei- bis dreifache erhöht (Dean *et al.* 1995). Auch eine Beschichtung mit Laminin, einem weiteren adhäsiven Glycoprotein, kann die Anlagerung von Keratinozyten (Epithelzellen) erhöhen (Tamura *et al.* 1997). Eine generelle Erhöhung des Zellwachstums könnte durch Beschichtung mit Wachstumsfaktoren erreicht werden (Leonhardt 1990).

Die Biofunktionalisierung der Oberfläche kann durch die Beobachtung der Adsorption ausgewählter Proteine überprüft werden. Dafür können Proteinlösungen in der gewünschten Verdünnung hergestellt (Zeng *et al.* 1999), aber auch natürliche Proteinlösungen wie z. B. Speichel, der neben anorganischen Bestandteilen verschiedene Proteine und Glykoproteine enthält (König 1987), direkt verwendet werden (Vassilakos *et al.* 1992).

Für die Bewertung der Proteinadsorption auf den biofunktionalisierten Titanoberflächen stehen eine Anzahl etablierter Verfahren zur Verfügung. Dazu gehören immunochemische Nachweismethoden (Merritt *et al.* 1988 (ELISA); Thull *et al.* 1992), aber auch optische Verfahren wie Ellipsometrie (Lassen und Malmsten 1996) oder RfS (Piehler *et al.* 1997b), um nur einige zu nennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Beobachtung von Proteinwechselwirkungen mit unterschiedlich modifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen das markierungsfreie Nachweisverfahren RfS (Abschnitt 2.2) mit FIA (Abschnitt 2.1) gekoppelt. Der Fluß sollte zum einen der Verfälschung der Meßergebnisse durch Sedimentation der Proteine vorbeugen und zum anderen nach der zeitaufgelösten Beobachtung der Adsorption die Verfolgung der Dissoziation der Proteine ermöglichen.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standard(bio)chemikalien stammten, sofern im folgenden nicht anders angegeben, von Fa. Fluka Neu-Ulm, Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS), Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurde von der Fa. Fluka, Neu-Ulm erworben.
- Aminodextran (AMD) 260/10, hergestellt nach (Piehler *et al.* 1996), wurde von Herrn Jochen Mehne bereitgestellt.
- Diamino- und Dicarboxy-Polyethylenglycol (DA- bzw. DC-PEG) wurden von Rapp Polymere, Tübingen bezogen.
- Polyklonale Antiseren gegen Benz(a)pyren (BP; sowohl rohes Serum als auch aufgereinigte IgG-Fraktion) sowie Benz(a)pyren-6-Isocyanat (BP-6-NCO), hergestellt nach (Creech 1941), wurden von T. Vo-Dinh und G. de Griffin, Oak Ridge National Laboratory, TN USA, abgegeben.
- 2-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-2-(6'-amino)hexansäure (Atrazincapronsäure, ACA), hergestellt nach (Weller 1992), wurde von Herrn Dipl.-Chem. Ivo Stemmler überlassen.
- Atrazin-(2-Chlor-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-)Lösung (in Methanol) wurde bei Riedel-de-Haën, Seelze, bestellt.
- Der monoklonale Antikörper (Ak) K4E7 wurde vom Arbeitskreis B. Hock, Fachbereich Botanik an der TU München, zur Verfügung gestellt.
- Laminin (Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor) und rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, Epidermal Growth Factor) wurde von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg bezogen. Zusätzlich wurde rekombinanter humaner EGF von Life Technologies, Karlsruhe, erworben.
- Anti-EGF wurde von Santa-Cruz-Biotechnology, Heidelberg, gekauft.

### 3.1.2 Lösungen

#### 3.1.2.1 Lösungen für die Bindungsassays (Abschnitt 3.2.3.4)

- PBS = phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): 8.76 g (150 mmol) NaCl und 1.36 g (10 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M KOH auf pH = 7.4 titriert.
- Analyt-Standardlösungen  
Käuflich erworbene Analytlösungen oder selbst aliquotierte Analyt-DMF-Lösungen ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ; DMF = N,N-Dimethylformamid) wurden mit PBS zu den gewünschten Konzentrationen herunterverdünnt.
- Regenerationslösung I:  
500 mg Pepsin wurden in 25 ml bidestilliertem Wasser ( $\hat{=}$  10 % Lösungsmittel) und 225 ml PBS ( $\hat{=}$  90 % Lösungsmittel) gelöst und mit 2 M HCl auf pH = 2 titriert. Die Lösung wurde in 40 ml-Portionen bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.
- Regenerationslösung II:  
200 ml Acetonitril, 200 ml bidestilliertem Wasser und 4 ml Propionsäure wurden zusammengegeben.

#### 3.1.2.2 Lösungen für die Affinitätschromatographie (Abschnitt 3.2.2.1)

- 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, pH = 7.0 (Lösung A):  
13.6 g (0.1 mol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M KOH auf pH = 7.0 titriert.
- 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 M NaCl, pH = 7.0 (Lösung B):  
13.6 g (0.1 mol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 8.8 g (0.15 mol) NaCl wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M KOH auf pH = 7.0 titriert.
- 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung, pH = 8.0 (Lösung C):  
174.2 g (1 mol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M HCl auf pH = 8.0 titriert.
- Glycin-Lösung, pH = 3.0 (Lösung D):  
7.5 g (0.1 mol) Glycin wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M HCl auf pH = 3.0 titriert.

### 3.1.3 Geräte

- Fließ-Injektions-Analyse (FIA): Anlage ASIA (Automated Sample Injection Analyser), mit Autosampler von Ismatec, Wertheim. Verwendet wurden eine Fixpumpe mit 20 Umdrehungen pro Minute (upm), die mit einem Tygon<sup>®</sup> R3603-Schlauch mit 0.76 mm Innendurchmesser betrieben wurde, sowie eine Variopumpe mit maximal 50 upm, in die ein Tygon<sup>®</sup> F4040A-Schlauch mit 0.25 mm Innendurchmesser eingebaut war. Die Drehzahl der Variopumpe konnte in 100 Schritten ( $n = 0-99$ ) variiert werden. Nähere Angaben zu den Förderraten sind in Abschnitt 4.1 aufgeführt. Für die übrigen Schlauchverbindungen wurden Teflonschläuche mit 0.9 mm Innendurchmesser verwendet.
- Meßzellen (Flußzellen) aus Plexiglas, Fertigung nach eigener Zeichnung (vgl. Abschnitt 3.2.4.1).
- Simultanes Spektralphotometer SPEKOL 1100 von Zeiss, Jena, modifiziert nach (Schmitt *et al.*, 1997) mit Polymerlichtleiter (PMMA,  $\varnothing$  1 mm, mit 1 auf 2 Faserkoppler) von MicroParts, Dortmund, und Halogenlampe (5 V / 10 W) mit integriertem Reflektor von Oshino Lamps, Nürnberg.
- Interferenzschichten 10 nm Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und 330 nm SiO<sub>2</sub> auf D 263 Glassubstrat von Schott, Mainz.
- Interferenzschichten TiO<sub>2</sub> auf BK7 Glassubstrat: Die Beschichtung sowie die Charakterisierung mittels Ellipsometrie (ES4G, SOPRA, Paris) wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chem. Martin Herold durchgeführt.
- Flüssigchromatographiesystem Standard BioLogic LP (Low Pressure) System, 220-240 V, mit Econo-Pac<sup>®</sup> Protein A Cartridge, Peristaltik-Pumpe, Autosampler, UV-Detektor, Schreiber von Bio-Rad Laboratories, München.
- Mikrokonzentratoren Microcon von Millipore, Eschborn.
- Winkelrotor Zentrifuge Biofuge 15 von Heraeus Sepatech, Osterode.
- Winkelrotor Kühlzentrifuge Labofuge 400 R von Heraeus, Osterode.
- Registrierendes Spektralphotometer Specord M500 von Zeiss, Jena.
- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- pH-Meter CG 843 von Schott, Mainz.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Modifikation der Glastypoberflächen

(nach Piehler *et al.* 1996; Birkert *et al.* 2000)

#### 3.2.1.1 Reinigung

##### a) SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

SiO<sub>2</sub>-beschichtete Glasplättchen wurden zunächst 1 min in 3 M KOH eingelegt und dann mit bidestilliertem Wasser gespült. Danach wurden sie 1 h in frisch zubereitete Piranha-Lösung (60 Vol% konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxid-Lösung, 30 %; *Achtung! Sowohl die Edukte als auch das Produkt sind stark ätzend, zudem wird das frisch zusammengegebene Gemisch kochend heiß. Daher ist unbedingt für geeignete Schutzmaßnahmen wie Schutzbrille, Handschuhe etc. zu sorgen!*) eingelegt, dann mit bidestilliertem Wasser gründlich abgespült und getrocknet.

##### b) TiO<sub>2</sub>-Oberflächen

TiO<sub>2</sub>-beschichtete Glasplättchen wurden zunächst im Sauerstoffplasmaverascher bei einer Leistung von 300 W, einem Sauerstoffdruck von 0.8 mbar 5 min dem Plasma ausgesetzt. Danach wurden sie 10 s in abgekühlte Piranha-Lösung eingelegt, dann mit bidestilliertem Wasser gründlich abgespült und getrocknet.

#### 3.2.1.2 Silanisierung

Auf die gereinigten SiO<sub>2</sub>- bzw. TiO<sub>2</sub>-Plättchen wurde GOPTS getropft (10 µl/cm<sup>2</sup>  $\hat{=}$  45 µmol/cm<sup>2</sup>). Nach 1 h Reaktionszeit in einer geschlossenen Glaskammer wurden die Plättchen mit trockenem Aceton (Wassergehalt max. 0.2 %) gespült, mit Stickstoff trockengeblasen und sofort weiterverarbeitet.

#### 3.2.1.3 Umsetzung mit einem Spacermolekül

##### a) AMD 260/10 auf silanisierten SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

Eine 0.8 mM Lösung von AMD 260/10 in bidestilliertem Wasser wurde auf die silanisierten SiO<sub>2</sub>-Plättchen gegeben ( $V = 10 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \hat{=} 13 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ ). Nach Re-

aktion über Nacht in einer Wasserdampfkammer wurden die Plättchen mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

b) DA- bzw. DC-PEG ( $MG = 2000 \text{ g/mol}$ ) auf silanisierten  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen  
Eine 1 mM Lösung von DA- bzw. DC-PEG in Dichlormethan wurde auf die silanisierten  $\text{SiO}_2$ -Plättchen gegeben ( $V = 10 \text{ } \mu\text{l/cm}^2 \hat{=} 10 \text{ nmol/cm}^2$ ). Nach Abdampfen des Lösungsmittels reagierten die Plättchen über Nacht im Ofen bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Plättchen wurden nach Herausnehmen sofort mit bidestilliertem Wasser (Zimmertemperatur) gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

c) DC-PEG ( $MG = 2000 \text{ g/mol}$ ) auf silanisierten  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen  
Eine 1 mM Lösung von DC-PEG in Dichlormethan wurde auf die silanisierten  $\text{TiO}_2$ -Plättchen gegeben ( $V = 10 \text{ } \mu\text{l/cm}^2 \hat{=} 10 \text{ nmol/cm}^2$ ). Vor Abdampfen des gesamten Lösungsmittels wurde überschüssige Lösung abgetropft. Die Plättchen reagierten über Nacht im Ofen bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach Herausnehmen wurden die Plättchen sofort in  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  warmes Wasser gegeben, danach mit bidestilliertem Wasser (Zimmertemperatur) gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

#### **3.2.1.4 Immobilisierung von Liganden**

a) Kupplung von ACA auf mit Aminogruppen modifizierte  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen

##### *I) Hohe Ligandendichte auf der Oberfläche:*

Eine frisch hergestellte Lösung von 0.3 M ACA und 1.1 M DIC in trockenem DMF (Wassergehalt max. 0.1 %) wurde auf ein mit AMD modifiziertes  $\text{SiO}_2$ -Plättchen gegeben und dieses mit einem zweiten Plättchen abgedeckt ( $V = 1.4 \text{ } \mu\text{l/cm}^2 \hat{=} 0.4 \text{ } \mu\text{mol ACA/cm}^2$ ). Nach Reaktion über Nacht in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer wurde gründlich mit DMF sowie bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

##### *II) Niedrige Ligandendichte auf der Oberfläche:*

Die unter I) beschriebene Lösung wurde mit trockenem DMF 1:1000 verdünnt und auf ein mit DA-PEG modifiziertes  $\text{SiO}_2$ -Plättchen gegeben ( $V = 7 \text{ } \mu\text{l/cm}^2 \hat{=} 2 \text{ nmol ACA/cm}^2$ ). Nach 30 s wurde das Reaktionsgemisch mit DMF und bidestilliertem Wasser abgespült und das Plättchen mit Stickstoff trockengeblasen.

b) Immobilisierung von BP-6-NCO auf mit Aminogruppen modifizierte  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen

##### *I) Hohe Ligandendichte auf der Oberfläche:*

Eine 0.4 mM Lösung von BP-6-NCO in trockenem DMF wurde auf ein mit

AMD modifiziertes SiO<sub>2</sub>-Plättchen gegeben und dieses mit einem zweiten Plättchen abgedeckt ( $V = 1.4 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \hat{=} 0.6 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ ). Nach Reaktion über Nacht in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer wurde gründlich mit DMF sowie bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

*II) Niedrige Ligandendichte auf der Oberfläche:*

Wie I), jedoch wurden nun mit DA-PEG modifizierte SiO<sub>2</sub>-Plättchen verwendet.

c) Kupplung von Proteinen auf mit DC-PEG modifizierte TiO<sub>2</sub>-Oberflächen

*Aktivierung:*

Eine frisch hergestellte Lösung von 1 M NHS (N-Hydroxy-Succinimid) und 1.1 M DIC in trockenem DMF wurde auf ein mit DC-PEG umgesetztes TiO<sub>2</sub>-Plättchen gegeben und dieses mit einem zweiten Plättchen abgedeckt ( $V = 4.2 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \hat{=} 4.2 \mu\text{M NHS}/\text{cm}^2$ ). Nach Reaktion über Nacht in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer wurden die Plättchen mit trockenem Aceton gespült, mit Stickstoff trockengeblasen und sofort weiterverarbeitet.

*Umsetzung mit Protein:*

Eine konzentrierte Lösung von Protein in bidestilliertem Wasser wurde auf das aktivierte Plättchen gegeben und dieses mit einem zweiten Plättchen abgedeckt ( $V = 1.4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Die Konzentrationen der eingesetzten Proteinlösungen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Nach Reaktion über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer wurden die Plättchen mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

<u>Protein</u>	<u>MG [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>
Laminin	850 000	1.5 $\mu\text{M}$ <sup>*)</sup>
EGF	6 045	0.17 mM
Laminin + EGF	s. o.	je 1.49 $\mu\text{M}$

<sup>\*)</sup> Laminin wurde in dieser Konzentration in einem 0.05 M Tris/0.15 M NaCl-Puffergemisch geliefert und daher nicht weiter mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

*Tabelle 3.1: Molekulargewicht und Konzentrationen der für die Modifizierung der TiO<sub>2</sub>-Oberflächen eingesetzten Proteine.*

### **3.2.1.5 Charakterisierung der modifizierten Glastypoberflächen**

Unspezifische Wechselwirkungen auf der Oberfläche wurden als vernachlässigbar angesehen, wenn bei Injektion von Ovalbumin (OVA) in PBS mit

$c = 1$  mg/ml, d. h. höher als später im Assay, die Signalverschiebung (Abschnitt 3.2.4.2) geringer als 50 pm war (Brecht *et al.* 1995).

Die spezifische Bindung eines Antikörpers auf der Oberfläche während der Bindungssays wurde als Massentransport-kontrolliert angesehen, wenn bei Injektion einer Antikörperkonzentration von  $c = 2.5$  µg/ml in PBS, d. h. höher als später im Assay, die Bindungskurve linear war und die Gesamtverschiebung des Signals während der Bindungssays weniger als 10 % der Gesamtverschiebung des Signals bei Injektion einer hohen Antikörperkonzentration (50 µg/ml) betrug (Piehler *et al.* 1997a).

Für kinetisch kontrollierte spezifische Bindungen von Antikörpern auf der Oberfläche wurden Signalverschiebungen von maximal 800 pm bei einer hohen Antikörperkonzentration (50 µg/ml) zugelassen.

### 3.2.2 Vorbereiten der Antikörper

#### 3.2.2.1 Anreicherung der Immunglobulin G-Fraktion (IgG) aus rohem Kaninchenserum mittels Affinitätschromatographie

In ein Flüssigchromatographiesystem mit UV-Detektor wurde eine Säule mit trägerfixiertem Protein A eingebaut und mit Lösung A (Lösungen A - D s. Abschnitt 3.1.2.2) equilibriert. Auf die Säule wurden bis zu 3 ml rohes Serum gegeben. Nach Waschen mit Lösung B bis zum Rückgang der Extinktion wurde die IgG-Fraktion mit Lösung C eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt, denen jeweils 125 µl Lösung D zur Neutralisation vorgelegt wurden. Die IgG-Eluate wurden anschließend mit Mikrokonzentratoren der Porengröße 30 000 Da in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C aufkonzentriert, mit PBS gewaschen und bis zur späteren Verwendung bei - 18 °C aufbewahrt (Holtzhauer 1997; Bio-Rad).

#### 3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Gesamt-IgG-Konzentration wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie über die Extinktion bei 280 nm mit  $\epsilon_{278} = 201\,700$  l/(mol·cm) bestimmt (Wells *et al.* 1965). Anschließend wurde mittels Affinitätstitration (Abschnitt 2.3.3.1) der aktive IgG-Anteil, der tatsächlich an den Analyten bindet, ermittelt.

### 3.2.3 Probenhandhabung mit dem FIA-System

#### 3.2.3.1 FIA bei Verfahren mit geringer Dispersion ( $D = 1$ )

Abbildung 3.1 zeigt das schematische Geschwindigkeitsprofil einer Probe im Trägerstrom und die daraus resultierenden Konzentrationsprofile der enthaltenen Verbindungen am Detektor (D) bei Anwendungen mit geringer Dispersion am Beispiel eines Immunoassays im Testformat des Bindungshemmtests (Abschnitt 2.3.3.1). Während der Auswertung ist das Konzentrationsverhältnis zwischen den in der Probe enthaltenen Ag (Antigen) bzw. Ak am Detektor konstant.

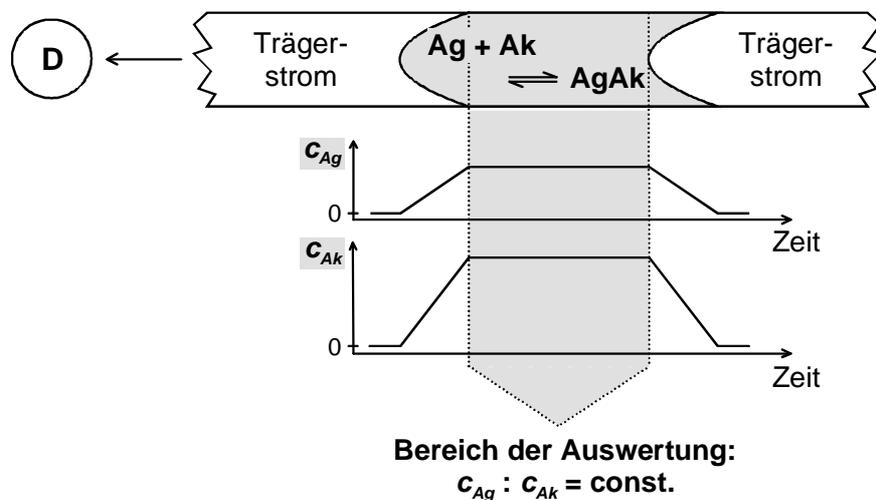


Abbildung 3.1: Geschwindigkeitsprofil (schematische Momentaufnahme zu einem Zeitpunkt  $t > 0$ ) einer Antigen-Antikörper-Probe im Trägerstrom und daraus resultierende Konzentrationsprofile am Detektor.

Abbildung 3.2 zeigt den Aufbau der FIA, mit dem dieser niedrige Dispersionsgrad erreicht wurde.

Als Trägerstrom wird PBS mit  $\text{pH} = 7.4$  verwendet. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde der Kreislauf des Trägerstroms unter 0.5 bar Ar-Überdruck gesetzt. In der Einstellung „Laden“ des Scherventils wird der Trägerstrom durch die Variopumpe direkt durch den Durchflußdetektor geleitet, während die Fixpumpe eine Lösung in die Probenschleife pumpt. In der Einstellung „Injektion“ des Scherventils wird der Trägerstrom durch die Probenschleife zum Detektor geleitet und transportiert so den Inhalt der Probenschleife dorthin. Man beachte, daß die Fließrichtungen bei Laden und Entladen („Injektion“) der Probenschleife entgegengesetzt gewählt wurden (retrograde Befüllung), um der Dispersion durch Konvektion entgegenzuwirken.

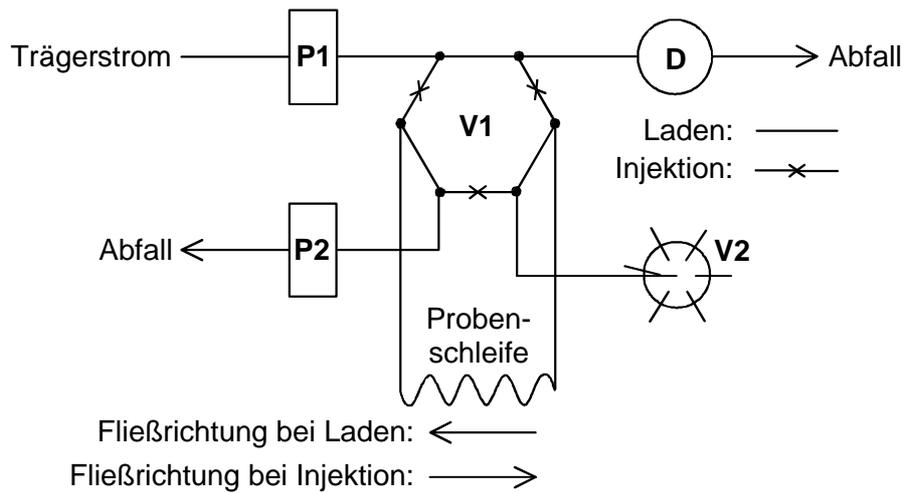


Abbildung 3.2: Schema der FIA-Apparatur für Anwendungen mit geringem Dispersionsgrad. P1: Variopumpe mit variabler Förderrate. P2: Fixpumpe mit festgelegter Förderrate. V1: Scherventil zum Umschalten zwischen Ladungs- und Injektionskreislauf. V2: 6-Wege-Ventil zur Auswahl verschiedener Lösungen, ggf. mit Autosampler kombiniert. D = RfS-Detektor, Aufbau s. Abschnitt 3.2.4.1.

### 3.2.3.2 FIA bei Verfahren mit hoher Dispersion ( $D > 1$ )

Abbildung 3.3 zeigt das schematische Geschwindigkeitsprofil zweier Lösungen im Trägerstrom bei Anwendungen mit hoher Dispersion und die daraus resultierenden Konzentrationsprofile am Detektor am Beispiel eines Immunoassays im Testformat des Bindungshemmtest mit Gradientenansatz (Abschnitt 2.3.3.2). Hier ändert sich während der Auswertung das Konzentrationsverhältnis von Ag und Ak am Detektor.

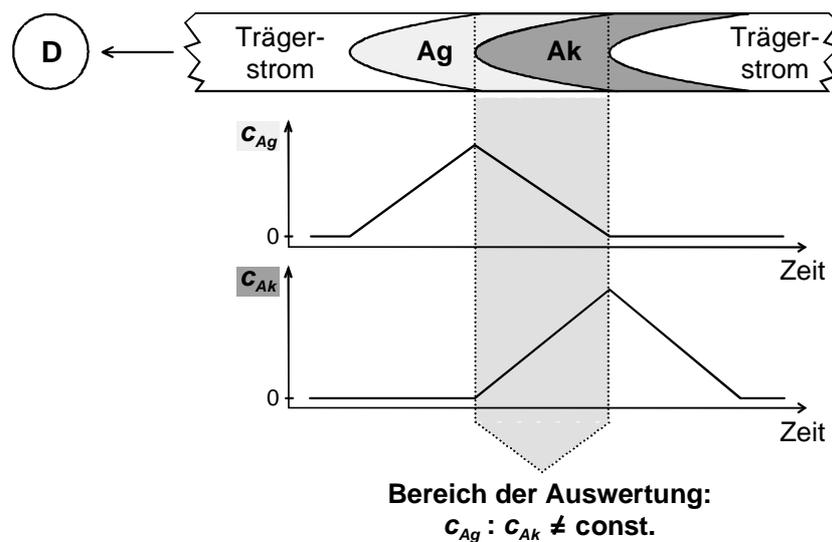


Abbildung 3.3: Geschwindigkeitsprofile (schematische Momentaufnahme zu einem Zeitpunkt  $t > 0$ ) von Ag-Probe bzw. Ak-Lösung im Trägerstrom und daraus resultierende Konzentrationsprofile am Detektor.

Abbildung 3.4 zeigt den Aufbau der FIA, mit dem dieser hohe Dispersionsgrad erreicht wurde.

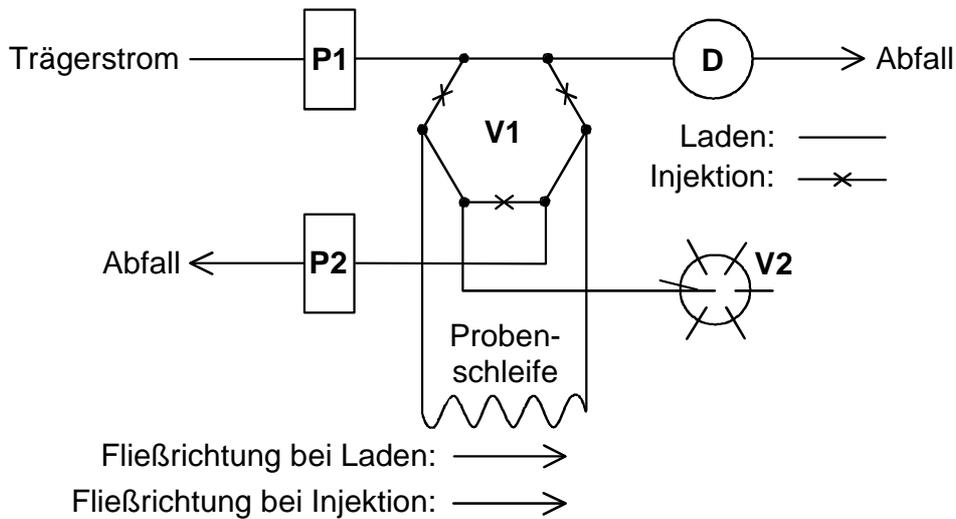


Abbildung 3.4: Schema der FIA-Apparatur für Anwendungen mit hohem Dispersionsgrad.

P1, P2, V1, V2, D: s. Abbildung 3.2.

Im Unterschied zum in Abbildung 3.2 gezeigten Schema wurde hier die Fließrichtung in der Probenschleife während des Ladens und Entladens der Probenschleife gleich gewählt (antegrade Befüllung), um die Dispersion durch Konvektion zu unterstützen.

### 3.2.3.3 Überprüfung der Förderraten

Ein Schlauch, auf dem ein Volumenabschnitt von 200  $\mu\text{l}$  markiert war, wurde mit der entsprechenden Pumpe verbunden. Die Zeit, die eine Luftblase braucht, um diesen Volumenabschnitt zu durchqueren, wurde bestimmt und aus diesen Werten die Förderraten in  $\mu\text{l}/\text{min}$  berechnet.

### 3.2.3.4 Probenvorbereitung und Meßprotokolle

In Tabelle 3.2 sind die Parameter für die durchgeführten Bindungsassays aufgeführt. Die Förderrate während der Injektion betrug jeweils 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Bei den Anwendungen 1) bis 4) wurden jeweils 3 identische Meßreihen durchgeführt, wobei in jeder Meßreihe jede Probenzusammensetzung einmal vorkam. Die Bezeichnungen Antigen und Analyt werden im folgenden äquivalent verwendet. Die Ausgangskonzentrationen  $c_{0, Ak}$  und  $c_{0, Ag}$  werden in Abschnitt 4 an den entsprechenden Stellen angegeben.

<u>Bindungs-</u> <u>assay</u>	<u>Proben</u>	FIA-Einstellungen (PS = Probenschleife)	<u>Glasträger-</u> <u>oberfläche</u>
1) Affinitäts- titration (Testformat: Bindungs- hemmtest)	Analyt (=Ag)-Standard- lsg. + Ak-Lsg mit $c_{0,Ag}$ variabel; $c_{0,Ak}$ , $V(\text{Ak-}$ Lsg.), $V(\text{Ag-Lsg.})$ kon- stant. Vor Messung Zu- sammengabe der Lsg. und Abwarten der Gleichgewichtseinstel- lung ( $\frac{1}{4}$ h). Außerdem: $c(\text{OVA}) = 200 \mu\text{g/ml}$ .	FIA-Aufbau nach Abschnitt 3.2.3.1; <i>mit Autosampler:</i> $V(\text{PS}) = 540 \mu\text{l}$ $V(\text{Probe}) = 800 \mu\text{l}$ , Dauer: 15 min; <i>ohne Autosampler:</i> $V(\text{PS}) = 480 \mu\text{l}$ $V(\text{Probe}) = 500 \mu\text{l}$ Dauer: 12 min	hohe Ligandendichte Regeneration: Lösungen I und II (Abschnitt 3.1.2.1)
2) Kinetik	Ak-Lsg. mit $c_{0,Ak}$ varia- bel, $V(\text{Ak-Lsg.})$ konst.; $c(\text{OVA}) = 200 \mu\text{g/ml}$ .	wie 1)	niedrige Ligan- dendichte; Rege- neration: wie 1)
3) Konzentrationsreihen Flußzellenkalibrierung	wie 2)	wie 1)	wie 1)
4) Gradienten- ansatz (Testformat: Bindungs- hemmtest)	Analyt (=Ag)-Standard- lsg. + Ak-Lsg mit $c_{0,Ag}$ variabel; $c_{0,Ak}$ , $V(\text{Ak-}$ Lsg.), $V(\text{Ag-Lsg.})$ , kon- stant. Analyt- und Ak- Lsg. <i>nacheinander</i> in die PS laden, Maximal- konz. von Ak und OVA am Detektor entspre- chend a) gewählt.	FIA-Aufbau nach Abschnitt 3.2.3.2; <i>mit Autosampler:</i> $V(\text{PS}) = 540 \mu\text{l}$ $V(\text{Ag-Lsg}) = 800 \mu\text{l}$ $V(\text{Ak-Lsg}) = 295 \mu\text{l}$ Dauer: 25 min	wie 1)
5) Protein- adsorption	1 mg/ml BSA (Rinder- serumalbumin) oder filtrierter Speichel	retrograde Befül- lung der 540 $\mu\text{l}$ -PS, $V(\text{Probe}) = 650 \mu\text{l}$	versch. Proteine, Regeneration: ent- fällt
6) Farbstoff- profile	$c(\text{Indigokarmin}) =$ 0.2 mg/ml	abhängig vom zu testenden Assay	Regeneration: NaOH, 20 mM

Tabelle 3.2: Meßprotokolle der Bindungsassays. Die Volumina der in die PS geladenen Lösungen überstiegen  $V(\text{PS})$ , damit Trägerpuffer sicher vollständig entfernt wurde.

### 3.2.4 Markierungsfreie Detektion mit RfS (Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie)

#### 3.2.4.1 Durchflußdetektor

Der in das FIA-System integrierte Durchflußdetektor („Flußzelle“) für die Detektion mit RfS ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

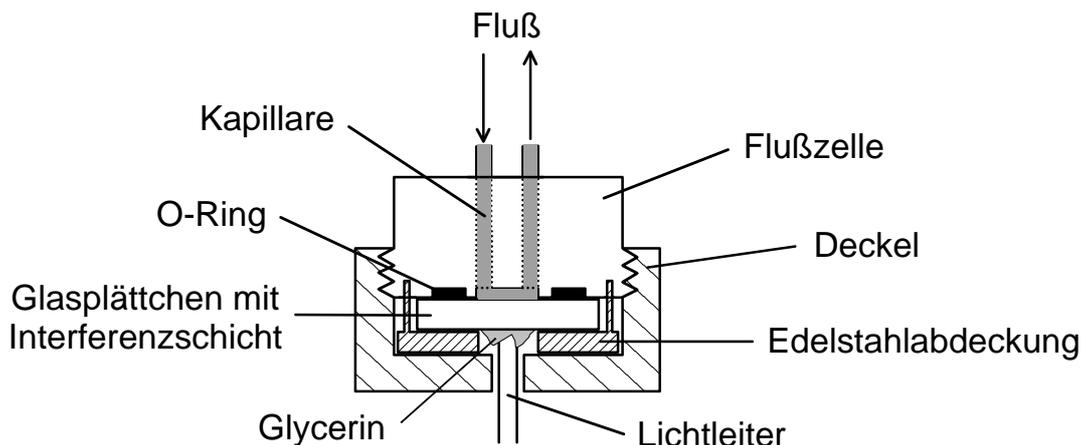


Abbildung 3.5: Durchflußdetektor für FIA-Anwendungen mit RfS-Detektion.

Die Kapillaren hatten einen Innendurchmesser von 0.5 mm, die Maße des Flußkanals waren 4 mm x 1 mm x 50  $\mu$ m, d. h. das Volumen der Flußzelle betrug 200 nl. Die auf das Glasplättchen aufgebraute Interferenzschicht, an der das Bindungsereignis beobachtet werden sollte, war dem Fluß zugewandt. Die Edelstahlabdeckung diente zur Fixierung des Plättchens auf der Flußzelle beim Zudrehen des Deckels. Das Glycerin diente als Brechungsindex-Matching zwischen den Phasengrenzen Plättchen-Luft und Luft-Wellenleiter (Abschnitt 2.2.2.4).

#### 3.2.4.2 Messung und Auswertung

Das Programm „MEASURE“ von G. Kraus diente zur Erfassung der Spektren sowie zur Ansteuerung der FIA. Die Integrationszeit wurde so eingestellt, daß im 90 %-Bereich der Sättigung des Detektors gearbeitet wurde, sie lag im Bereich von 200 - 400 ms pro Spektrum. Da es zur Beobachtung der Bindungsereignisse genügt, lediglich alle 5 s ein Spektrum aufzunehmen (Schmitt *et al.* 1997) und die Gerätekommunikation ca.  $\frac{1}{2}$  s betrug, wurden zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses in diesem Zeitintervall so viele Spektren wie möglich zu einem Gesamtspektrum, dem Reflexionsspektrum, aufsummiert.

Bei Affinitätsmessungen wurden diese Reflexionsspektren  $I_{Ref\ell}(\lambda)$  dann mit dem Dunkelsignal  $I_D(\lambda)$ , das auf dem Dunkelstrom des Spektrometers beruht, und dem Referenzsignal  $I_R(\lambda)$ , das als Spektrum eines Glasplättchens ohne Interferenzschicht gemessen wurde, korrigiert nach

$$I_{Ifz}(\lambda) = \frac{I_{Ref\ell}(\lambda) - I_D(\lambda)}{I_R(\lambda) - I_D(\lambda)} \quad (38)$$

und ergaben so die Interferenzspektren  $I_{Ifz}(\lambda)$ . Das Programm „IFZ“ von A. Brecht und G. Kraus wertete diese Spektren aus, indem es eine Parabel an ein ausgewähltes Extremum anpaßte. Die Verschiebung dieses Extremums durch Bindungsereignisse konnte aufgrund des dynamischen Datenaustauschs zwischen „MEASURE“ und „IFZ“ on-line verfolgt werden. Als Bindungskurve wurde die Lage des Extremums als Signal [nm] gegen die Zeit [s] aufgetragen.

Bei Farbmessungen mit Indigokarmin, bei denen Glasplättchen ohne Interferenzschicht verwendet wurden, wurden die erhaltenen Reflexionsspektren  $I_{Ref\ell}(\lambda)$  zunächst analog obiger Gleichung korrigiert. Anschließend wurde die korrigierte Intensität bei einer Wellenlänge maximaler Absorption ( $\lambda = 610$  nm) durch die korrigierte Intensität bei einer Wellenlänge minimaler Absorption ( $\lambda = 780$  nm) geteilt und die so erhaltene normierte Intensität gegen die Zeit aufgetragen. Diese Auftragung entsprach dem Konzentrationsprofil, d. h. dem Konzentrationsverlauf der Indigokarminlösung am Detektor.

### 3.2.5 Auswertung mit Neuronalen Netzen

Ein Teil der Bindungskurven wurde mit Hilfe von Neuronalen Netzen ausgewertet. Dazu wurde das Programm NEMO verwendet, das auf dem Stuttgarter Neuronale Netze Simulator (SNNS) basiert (Zell *et al.* 1995) und von F.-R. Rapp modifiziert wurde (Seemann *et al.* 1997). Die Netze des Feed-Forward-Typs bestanden aus drei Schichten, d. h. neben Eingabe- und Ausgabeschicht wurde mit einer versteckten Schicht gearbeitet.

Die Daten der Eingabeschicht wurden in einem vorverarbeitenden Verfahren zunächst zentriert und standardisiert (Otto 1997). Anschließend wurden diese Werte nach der Formel  $y_{log} = \log_{10}(y+1)$  umgerechnet, um zu berücksichtigen, daß die Werte der Ausgabeschicht, die mit Hilfe der Werte aus der Eingabeschicht ermittelt werden sollten, logarithmisch skaliert waren. Damit die trans-

formierten Daten für das Netz zugänglich waren, mußten sie dann noch innerhalb des Bereichs  $-0.9 - 0.9$  skaliert werden (Zell 1996).

Als Aktivierungsfunktion für die versteckte und die ausgegebene Schicht wurde der Tangens hyperbolicus gewählt. Für das Training des Neuronalen Netzes wurde der „Scaled Conjugate Gradient“-Lern-Algorithmus (SCG) mit den SNNS Standardeingabewerten verwendet (Zell *et al.* 1995). Der Lernerfolg wurde mit „Full Cross Validation“, der einfachsten Methode der Kreuzvalidierung, überprüft (Otto 1997). Zur Vermeidung des Auswendiglernens von Daten wurde nach jeder Trainingsphase die Netzwerktopologie durch Verwenden des „Magnitude Based Pruning“-Algorithmus optimiert, d. h. nach einer einleitenden Lernphase, in der das gesamte Netz trainiert wurde, wurden die Daten mit den kleinsten Gewichten entfernt, und es erfolgte ein sog. Retraining. Stieg der Fehler des Netzes über 5 %, wurde der Pruning-Prozeß angehalten (Zell 1996).

Die Qualität der resultierenden Netzwerke wurde zum einen durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten der Auftragung von vorhergesagten („predicted“, d. h. mit Neuronalem Netz berechneten) Werten gegen vorgegebene („true“) Werte der Ausgabevariablen und zum anderen durch Beobachtung der Konvergenz des Training-Prozesses, der in einer stabilen Lösung enden sollte, beurteilt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bestimmung der Förderraten im eingesetzten FIA-System

Die Förderraten der eingesetzten Peristaltik-Pumpen wurden bestimmt, um für die FIA (Fließ-Injektions-Analyse) optimale Einstellungen in den Meßprotokollen zu ermöglichen (Abschnitt 3.2.3.4).

#### 4.1.1 Variopumpe zum Antreiben des Trägerstroms

Die Förderrate der Variopumpe kann sowohl durch die Drehzahl  $n$  der Pumpe als auch durch die Wahl des Schlauchinnendurchmessers eingestellt werden (Abschnitt 3.1.3).

##### 4.1.1.1 Pumpschlauch mit kleinem Innendurchmesser

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bindungsassays wurde ein Pumpschlauch mit 0.25 mm Innendurchmesser eingesetzt. In Abbildung 4.1 ist die Förderrate dieses Pumpschlauchs gegen die Drehzahl  $n$  der Variopumpe unter verschiedenen Bedingungen aufgetragen.

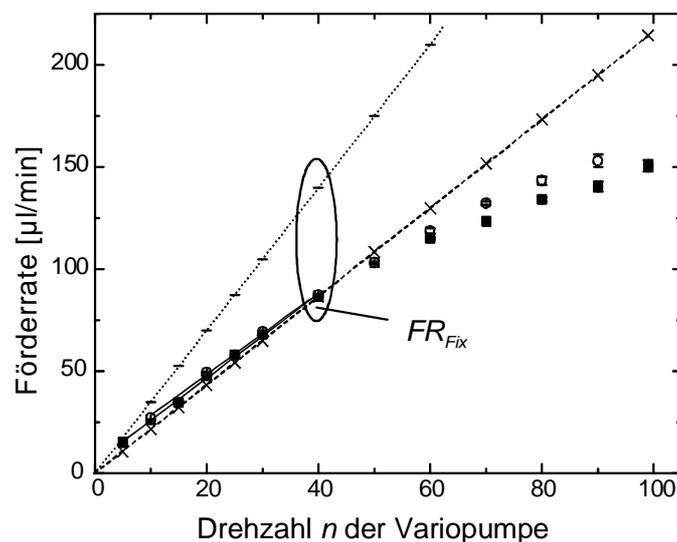


Abbildung 4.1: Förderraten der Variopumpe bei Schlauchinnendurchmesser 0.25 mm.

(-): Berechnung nach Herstellerangaben mit  $FR_{Fix}$  aus Tabelle.

(×): Berechnung nach Herstellerangaben mit  $FR_{Fix}$  selbst bestimmt.

(■): Nach Abschnitt 3.2.3.3 ermittelte Förderraten bei Normaldruck.

(○): Nach Abschnitt 3.2.3.3 ermittelte Förderraten bei 0.5 bar Überdruck.

Laut Hersteller wird die Förderrate  $FR$  nach

$$FR = FR_{Fix} \cdot \frac{n}{40} \quad (39)$$

bestimmt, wobei  $FR_{Fix}$  der Förderrate für  $n = 40$  entspricht. Beim vorliegenden Schlauch werden dafür  $140 \mu\text{l}/\text{min}$  angegeben (Ismatec 1995). Die daraus berechneten Förderraten, in Abbildung 4.1 als (-) dargestellt, liegen auf einer Ursprungsgeraden der Steigung  $3.5 \mu\text{l}/\text{min}$ . Setzt man jedoch in Gleichung (39) den tatsächlich für  $n = 40$  ermittelten Wert  $FR_{Fix} = 87 \mu\text{l}/\text{min}$  ein, so erhält man Förderraten, die um 38 % unter denen liegen, die komplett mit Herstellerangaben berechnet wurden (Symbol (×) in Abbildung 4.1). Die Ursache für diese Abweichung liegt vermutlich in den Schlauchkassetten der Peristaltik-Pumpen, da hier die Schläuche bis zu einem gewissen Grad von jedem Benutzer individuell eingespannt werden können, so daß die Quetschung des Schlauchs, und damit die Fördermenge durch die Peristaltikbewegung der Pumpe, variieren kann.

Betrachtet man die aus den Meßwerten bei Normaldruck erhaltenen Förderraten für  $5 \leq n \leq 99$  (Symbol (■) in Abbildung 4.1) so fällt auf, daß diese für Drehzahlen  $n \leq 40$  zwar nicht vom nach Herstellerangaben erwarteten linearen Verhalten abweichen, allerdings beschreiben diese Werte keine Ursprungsgerade, wie es eigentlich erwartet würde, da die Pumpe bei  $n = 0$  steht. Bei höheren Drehzahlen  $n$ , d. h.  $n > 40$ , ist kein linearer Zusammenhang mehr zwischen  $n$  und Förderrate gegeben. Die Förderraten nähern sich einem Maximalwert an. Ursachen dafür können die Limitierung der Förderrate durch den geringen Schlauchdurchmesser sein, aber auch ein nichtlineares Verhalten der Pumpe sein. Dies wurde im folgenden Abschnitt überprüft.

Da der durch die Variopumpe getriebene Trägerstrom während der Bindungsassays unter 0.5 bar Überdruck stand, wurden die Messungen zur Bestimmung der Förderraten auch unter diesen Bedingungen durchgeführt. Diese Werte, in Abbildung 4.1 durch (○) gekennzeichnet, verhielten sich ähnlich den Werten bei Normaldruck, d. h. lineares Verhalten für  $n \leq 40$  und Annähern an einen Maximalwert für  $n > 40$ . Allerdings wurden für die Förderraten bei Überdruck bis zu 9 % höhere Werte als bei Normaldruck erreicht. Dies hängt damit zusammen, daß bei zunehmendem Druck die Viskosität einer Flüssigkeit steigt (Brdička 1982). Durch diese erhöhte Viskosität steigt auch die Förderrate bei Peristaltik-Pumpen, wie in (Shukla *et al.* 1980) beschrieben wird.

### 4.1.1.2 Pumpschlauch mit großem Innendurchmesser

Wie im vorhergehenden Abschnitt angeführt, kann neben dem limitierend wirkenden Schlauchdurchmesser auch eine Fehlfunktion der Pumpe Ursache für die Annäherung der Förderrate an einen Maximalwert bei steigendem  $n$  sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Förderraten zusätzlich mit einem Schlauch mit Innendurchmesser 2.06 mm bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

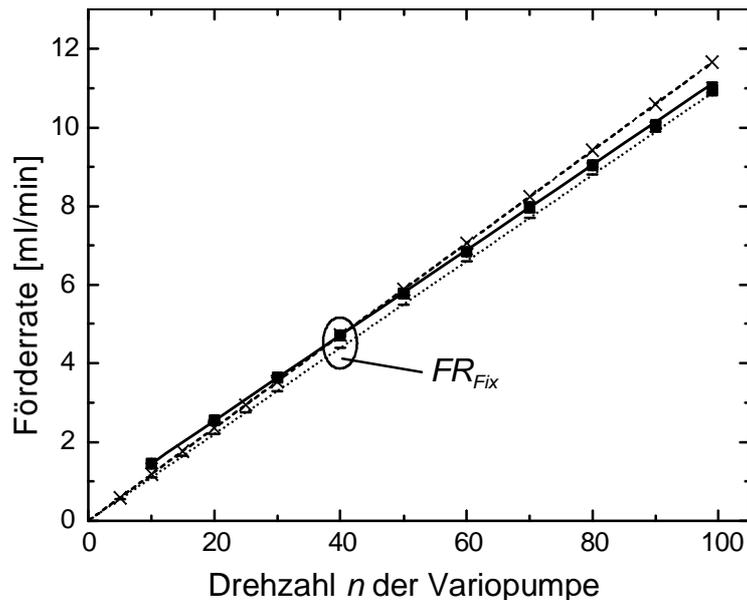


Abbildung 4.2: Förderraten der Variopumpe bei Schlauchinnendurchmesser 2.06 mm.

(-): Berechnung nach Herstellerangaben mit  $FR_{Fix}$  aus Tabelle.

( $\times$ ): Berechnung nach Herstellerangaben mit  $FR_{Fix}$  selbst bestimmt.

( $\blacksquare$ ): Nach Abschnitt 3.2.3.3 ermittelte Förderraten bei Normaldruck.

Laut Hersteller beträgt  $FR_{Fix} = 4.4$  ml/min. Die daraus mit Gleichung (39) berechneten Werte sind in Abbildung 4.2 mit (-) dargestellt und liegen auf einer Ursprungsgeraden der Steigung 0.11 ml/min. Die aus der Messung für  $n = 40$  ermittelte Förderrate  $FR_{Fix} = 4.7$  ml/min sowie die daraus nach Gleichung (39) berechneten Förderraten (Symbol ( $\times$ ) in Abbildung 4.2) lagen um 7 % höher als die komplett aus Herstellerangaben berechneten Werte. Da der Schlauchdurchmesser mit den Herstellerangaben übereinstimmte, wurde, wie schon in Abschnitt 4.1.1.1, als Ursache für die Abweichung die unterschiedliche Einspannstärke der Schläuche in den Kassetten der Peristaltik-Pumpen gesehen und damit unterschiedliches Quetschen der Schläuche. Dies ist insofern wahrscheinlich, da jetzt der selbst bestimmte Wert für  $FR_{Fix}$  höher liegt als der Tabellenwert, wäh-

rend in Abschnitt 4.1.1.1 der selbst bestimmte Wert tiefer lag als der Tabellenwert, so daß für  $FR_{Fix}$  keine systematische Abweichung der selbst bestimmten Werte von den Herstellerangaben erhalten wurde.

Betrachtet man die aus den Meßwerten erhaltenen Förderraten  $5 \leq n \leq 99$  bei Normaldruck (Darstellung als (■) in Abbildung 4.2) so fällt auf, daß die Förderate nun im ganzen Bereich linear mit  $n$  zunimmt. Auch diesmal liegen die Werte nicht auf einer Ursprungsgeraden, doch konnte durch den größeren Schlauchdurchmesser, der im Bereich der Drehzahlen  $n$  nicht mehr limitierend auf die Förderrate wirkte, ein nichtlineares Verhalten der Pumpe ausgeschlossen werden.

Bei Veränderung der Wahl der Drehzahlen der Pumpen für die Meßprotokolle ist daher zu beachten, daß eine Verdopplung der Drehzahl  $n$  keine Verdopplung der Förderrate bringt, sondern daß diese geringfügig niedriger liegt. Zudem kann insbesondere bei Schläuchen mit kleinen Innendurchmessern die Förderrate nicht beliebig weit heraufgesetzt werden.

#### 4.1.2 Fix-Pumpe zur Befüllung der Probenschleife

Die Förderrate der Fixpumpe kann nur durch den Schlauchdurchmesser variiert werden, da die Drehzahl der Pumpe vom Hersteller vorgegeben ist.

Beim verwendeten Schlauch mit Innendurchmesser 0.76 mm wurde eine Förderate von  $(0.81 \pm 0.02)$  ml/min bestimmt, was im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit den Herstellerangaben, die eine Förderate von 0.82 ml/min voraussagen, übereinstimmt. Dies bestätigt die Vermutung in obigem Abschnitt, daß der Unterschied zwischen tabelliertem und durch Messung bestimmtem  $FR_{Fix}$ -Wert durch unterschiedliche Einspannstärken der Schläuche in den Kassetten der Peristaltik-Pumpen hervorgerufen wird.

## 4.2 Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse (FIA) zur Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Konstanten

Die Fließ-Injektions-Analyse (FIA) mit markierungsfreier Detektion wurde dazu eingesetzt, thermodynamische und kinetische Konstanten der Bildung von Antigen-Antikörper-Paaren zu ermitteln.

### 4.2.1 Charakterisierung des eingesetzten Flußsystems

Zur Ermittlung thermodynamischer oder kinetischer Konstanten aus den Bindungskurven muß im Bereich der Auswertung die Konzentration der Probe am Detektor konstant sein (Abschnitt 2.3.2), d. h. die Probe wird mit geringer Dispersion zum Detektor gebracht. Vor Durchführung der Bindungsassays nach Abschnitt 3.2.3.1 wurden die Meßprotokolle mit Hilfe von Konzentrationsprofilen überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

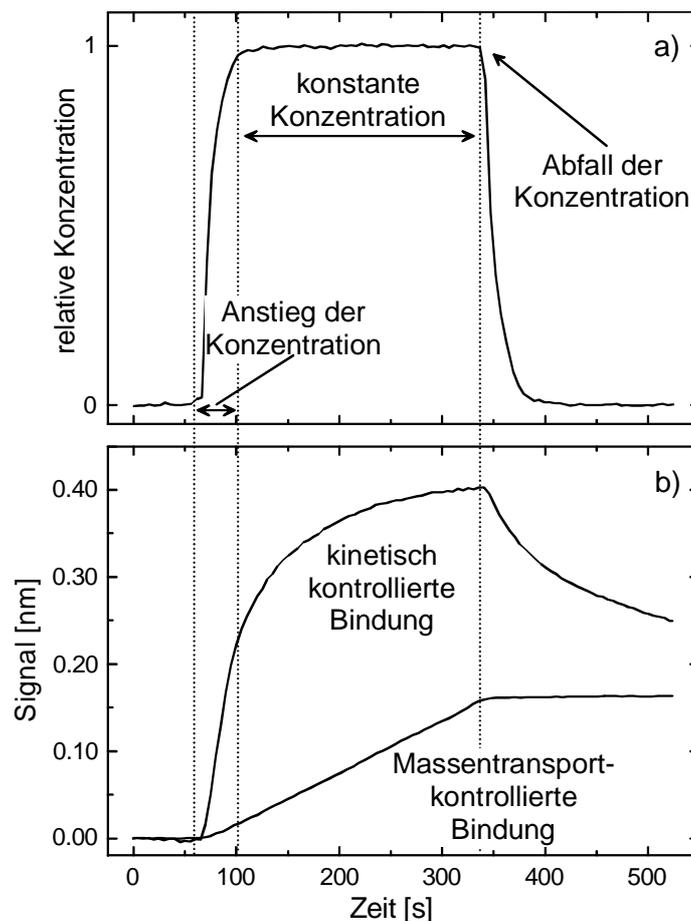


Abbildung 4.3: a) Konzentrationsprofil: Probe = Farblösung.

b) Zugehörige Bindungskurven: Probe enthält Antikörper.

Zunächst wurde an Stelle der Probe eine Farblösung eingespritzt und während des Ablaufs des Meßprotokolls der Konzentrationsverlauf der Probe im Durchflußdetektor aufgezeichnet (Abschnitt 3.2.4.2). Beim Injizieren der Farblösung stieg die Konzentration am Detektor innerhalb 50 s auf einen Maximalwert an und behielt diesen 330 s lang bei. Nach Einleiten der Spülphase fiel die Konzentration rasch wieder auf 0 ab (Abbildung 4.3a)). Anschließend wurde als Probe eine Antikörper enthaltende Lösung eingesetzt. Abhängig von der Dichte an auf der Oberfläche immobilisiertem Antigen wurden bei gleichem Meßprotokoll Bindungskurven wie in Abbildung 4.3b) erhalten (Abschnitt 3.2.4.2).

Bei Massentransport-kontrollierter Bindung dieser Antikörper an auf der Oberfläche immobilisierte Antigene (hohe Oberflächendichte) ist nach dem 1. Fickschen Gesetz die Transportrate auf die Oberfläche (und damit Schichtdicken- sowie Signalzunahme bei markierungsfreier Detektion) proportional zur Konzentration des Bindungspartners in Lösung (Abschnitt 2.3.3.1). War die Konzentration am Detektor 0, dann banden keine Antikörper an die Oberfläche, die Steigung der Bindungskurve betrug ebenfalls 0. Während des raschen Anstiegs bzw. Abfalls der Konzentration im Durchflußdetektor nahm die Steigung ebenfalls rasch zu bzw. ab. Bei konstanter Konzentration war die Steigung ebenfalls konstant, d. h. die Bindungskurve stieg linear an. Der Verlauf von Bindungskurve und Konzentrationsprofil stimmte gut miteinander überein.

Bei kinetisch kontrollierter Bindung von Antikörpern an auf der Oberfläche immobilisierte Antigene (niedrige Oberflächendichte) war am Anfang der Bindungskurve, solange die Konzentration im Durchflußdetektor 0 betrug, die Steigung der Bindungskurve wieder 0, während des Konzentrationsanstieg stieg die Steigung ebenfalls an. Im Unterschied zur Bindungskurve bei Massentransport-kontrollierter Bindung stieg nun die Steigung der Bindungskurve auch bei konstanten Konzentrationsverhältnissen am Detektor an, bis das Gleichgewicht der Oberflächenreaktion erreicht ist. Fiel die Konzentration am Detektor wieder ab, so fiel nun auch die Bindungskurve ab. Deshalb konnte aus dem Verlauf der Bindungskurve bei kinetisch kontrollierter Reaktion nicht sofort auf den Bereich konstanter Konzentration am Detektor geschlossen werden und der Bereich der Auswertung mußte durch andere, in Abschnitt 2.3.2.2 beschriebene Verfahren, ermittelt werden.

Demnach können aus Massentransport-kontrollierter Bindung von Antikörpern an die Oberfläche ebenfalls Konzentrationsprofile für diese Antikörper am Detektor gewonnen werden, während das bei kinetisch kontrollierten Bindung der Antikörper nicht möglich ist.

Es erstaunt zunächst, daß der Verlauf des aufgenommenen Konzentrationsprofils so exakt mit dem der Bindungskurve übereinstimmte, da man nach Abschnitt 2.1.2.3 für die kleinen Farbstoffmoleküle ( $MG(\text{Indigokarmin}) = 466.35 \text{ g/mol}$ ) ein anderes Diffusionsverhalten im Trägerstrom erwartete als für die Antikörper ( $MG = 150\,000 \text{ g/mol}$ ). Allerdings wurden die FIA-Einstellungen so gewählt, daß beim Aufsaugen der Probe eine Luftblase vor der Probe die Vermischung mit dem Trägerstrom verhinderte. Damit konnte es lediglich im Schlauchstück zwischen Ventil und Flußzelle zu Dispersion und Diffusion kommen. Diese Strecke war jedoch zu klein ( $5.5 \text{ cm} \hat{=} 35 \mu\text{l}$ ), so daß diese Effekte hier nicht beobachtet werden können. Die Injektionsphase wurde durch den Spülvorgang abgebrochen, noch bevor sich Durchmischung mit dem Trägerstrom bemerkbar machen konnte. Dabei wurde Trägerstrom mit hoher Geschwindigkeit über die Oberfläche geleitet wurde, so daß hier ebenfalls kein unterschiedliches Verhalten zwischen Farbstoffen und Antikörpern festgestellt wurde.

Es bleibt anzumerken, daß der zeitliche Ablauf der folgenden Bindungsassays teilweise nicht mit dem in Abbildung 4.3 übereinstimmt, da im Meßprotokoll, abhängig von der Probenmenge, unterschiedliche Zeiten eingesetzt wurden. Die Überprüfung dieser Protokolle erfolgte analog dem in diesem Abschnitt vorgestellten Verfahren.

#### **4.2.2 Bindungsassays am Atrazin/K4E7-System**

Die Bindungsassays zur Ermittlung thermodynamischer und kinetischer Konstanten wurden zunächst am bekannten Modellsystem Atrazin/K4E7 durchgeführt, um verschiedene Auswertemethoden zu vergleichen. Atrazin wurde auf der Oberfläche als Atrazincapronsäure (ACA) immobilisiert. K4E7 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen Triazine wie z. B. Atrazin gerichtet ist.

### 4.2.2.1 Affinität

Mit Hilfe der Affinitätstitration sollten zunächst die Affinitätskonstante der Atrazin-K4E7-Komplexbildung in Lösung sowie die Ausgangskonzentration an K4E7-Bindungsstellen in der Probe bestimmt werden. Abbildung 4.5 zeigt die Bindungskurven, die unter Massentransport-kontrollierten Bedingungen am System Atrazin/K4E7 erhalten wurden. Die Ausgangskonzentration an aktivem K4E7 betrug  $c_{Ak} = 0.45 \mu\text{g/ml}$  (s. Abschnitt 4.2.2.2), die Atrazin-Konzentrationen wurden zwischen 0 und 100  $\mu\text{g/l}$  gewählt.

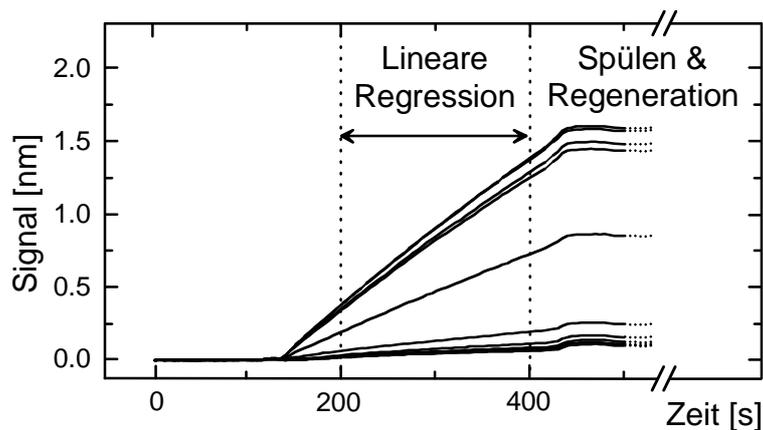


Abbildung 4.4: Bindungskurven der Affinitätstitration am System Atrazin/K4E7, 1 Meßreihe.

Mehrere Bindungskurven in Abbildung 4.4 haben eine hohe Steigung, mehrere eine niedrige. Es gibt nur eine Bindungskurve mit einer Steigung zwischen diesen beiden Extremen. Schon allein aus dieser Verteilung kann bei den gewählten Konzentrationsabständen (s. Abbildung 4.5) auf eine steile Kalibrierkurve geschlossen werden.

Für die Auswertung wurden die Steigungen im linearen Bereich der Bindungskurven zwischen 200 s und 400 s mittels linearer Regression ausgewertet. In jeder der vorgenommenen Meßreihen wurden die Steigungen auf die des jeweiligen Nullwerts (d. h.  $c(\text{Atrazin}) = 0 \mu\text{g/l}$ ) bezogen, um geringe Schwankungen in der Probenzusammensetzung auszugleichen. Aus diesen normierten Steigungen wurde anschließend die Kalibrierkurve aufgetragen.

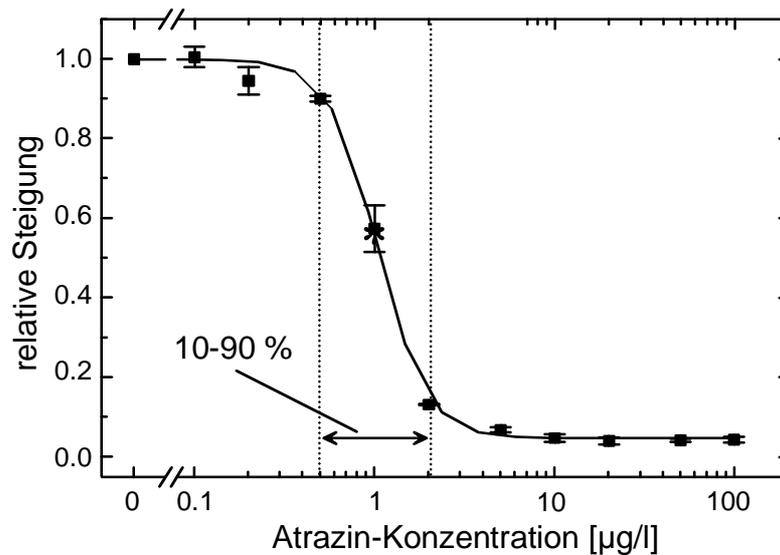


Abbildung 4.5: Kalibrierkurve aus der Affinitätstiteration am Systems Atrazin / K4E7:

$c_{0,Ak} = 6 \text{ nM}$ ; (\*) markiert den Testmittelpunkt.

Die Kalibrierkurve in Abbildung 4.5 belegt, was schon an den Bindungskurven zu sehen war. Die normierten Steigungen der niedrigen Atrazin-Konzentrationen ( $c(\text{Atrazin}) \leq 0.5 \text{ µg/l}$ ) unterschieden sich untereinander weniger als 10 %, ebenso die normierten Steigungen der hohen Atrazin-Konzentrationen ( $c(\text{Atrazin}) = 2 - 100 \text{ µg/l}$ ). Die Steigung der Bindungskurve der Atrazin-Konzentration  $1 \text{ µg/l}$  lag zwischen den beiden beschriebenen Extremen. Dadurch, daß sich die Steigungen nur in einem kleinen Konzentrationsbereich voneinander unterschieden, wurde eine sehr steile Kalibrierkurve erreicht, was auf eine hohe Affinität hinweist und zu einem kleinen Arbeitsbereich führt.

Die Kurvenanpassung der Funktion „Bidiss“, die auf Gleichung (34) in Abschnitt 2.3.2.3.1 beruht, an die Steigungen ergab für die Affinitätskonstante mit  $K = (3.0 \pm 0.6) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  einen hohen Wert, was obige Betrachtungen bestätigt. Der 10 - 90 %-Arbeitsbereich wurde zu  $0.5 - 2 \text{ µg/l}$  Atrazin ermittelt, der Testmittelpunkt lag bei  $1 \text{ µg/l}$  Atrazin. Die Möglichkeiten zur Anwendung des Atrazin/K4E7-Systems in der Analytik werden in Abschnitt 4.3 ausführlicher diskutiert.

#### 4.2.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Anpassung der Funktion „Bidiss“ an die normierten Steigungen aus der Affinitätstiteration ermöglicht neben der Bestimmung der Affinitätskonstanten eines Antigen/Antikörper-Systems in homogener Phase auch die der Konzentration

aktiver Antikörper in der eingesetzten Lösung (Abschnitt 2.3.3.1). Hier wurde für die Ausgangskonzentration an K4E7 ( $0.45 \pm 0.02$ )  $\mu\text{g/ml}$  pro Probe ermittelt bzw. die Gesamtkonzentration an Antikörperbindungsstellen zu  $c_{0,Ak} = (6.0 \pm 0.2)$  nM. Damit galt  $K > 1/c_{0,Ak}$ , d. h. die Konzentration der Bindungsstellen kann hier durch Kurvenanpassung besser bestimmt werden als die Affinitätskonstante. Dies äußerte sich darin, daß die Bindungsstellenkonzentration auf 3 % genau bestimmt werden konnte, während die Standardabweichung der Affinitätskonstanten 20 % des Mittelwerts betrug. Zur besseren Bestimmung der Affinitätskonstanten dieses Systems müßte die Antikörperkonzentration in der Größenordnung Faktor 100 herabgesetzt werden, damit  $K < 1/c_{0,Ak}$  wird. Diese Vorgehensweise wird jedoch durch die Nachweisgrenze des Detektors eingeschränkt.

Mittels UV-Spektroskopie wurde die Ausgangskonzentration an K4E7 in jeder Probe zu  $0.69 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $c_{0,Ak} = 9.2$  nM berechnet. Damit betrug der aktive Anteil an Antikörper nur 65 % der Antikörperkonzentration insgesamt. Da monoklonale Antikörper aufgrund ihrer Eigenschaften gleich gegen dasselbe Antigen reagieren, kann dies nur dadurch erklärt werden, daß, ein Teil dieser Antikörper durch wiederholte Einfrier- und Auftau-Vorgänge denaturiert worden war und so seine Funktion nicht mehr erfüllen konnte.

Insbesondere für die Bestimmung der kinetischen Konstanten der Reaktion auf die Oberfläche wird die genaue Konzentration des aktiven Bindungspartners in Lösung benötigt (s. Abschnitt 4.2.2.3). Da diese, wie soeben gezeigt, von der durch UV-Spektroskopie bestimmten Konzentration abweichen kann, ist es notwendig, sie gesondert zu ermitteln, wie soeben gezeigt.

#### ***4.2.2.3 Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der Bindung an die Oberfläche***

Die Gleichgewichts- sowie die Geschwindigkeitskonstanten der Bindung der Antikörper an auf der Oberfläche immobilisiertes Antigen wurde durch Beobachtung der kinetisch kontrollierten Bindung an die Oberfläche ermittelt. Abbildung 4.6 zeigt die Bindungskurven, die mit unterschiedlich konzentrierten Antikörper-Proben unter kinetisch kontrollierten Bedingungen am System Atrazin(immob.)/K4E7 aufgenommen wurden.

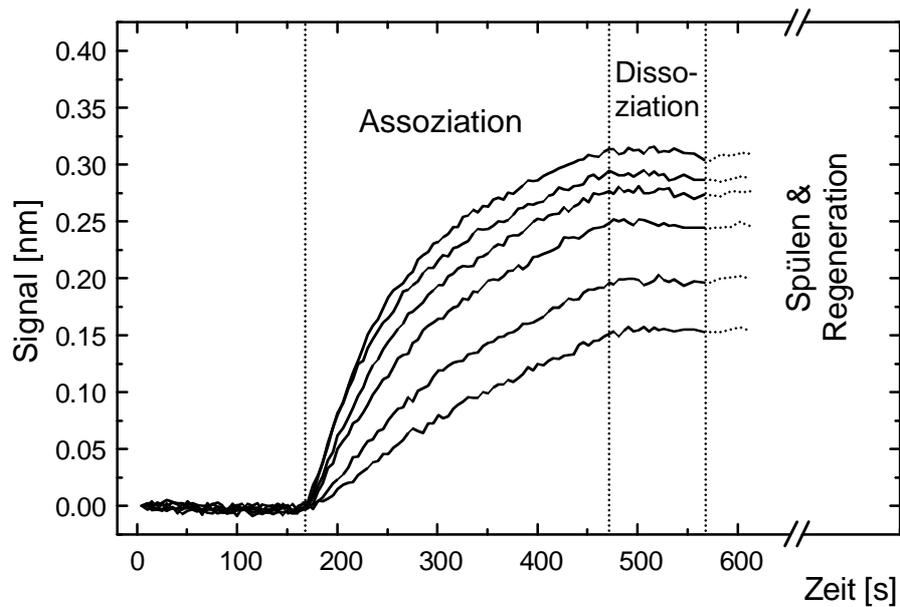


Abbildung 4.6: Kinetik Atrazin(immob.)/K4E7: Bindungskurven, 1 Meßreihe.

#### 4.2.2.3.1 Auswertung der Assoziationsphase

Zunächst wurde die Gleichgewichtskonstante der Bindung an die Oberfläche mit Hilfe des Scatchard-Plots ermittelt (Abschnitt 2.3.2.3.2).

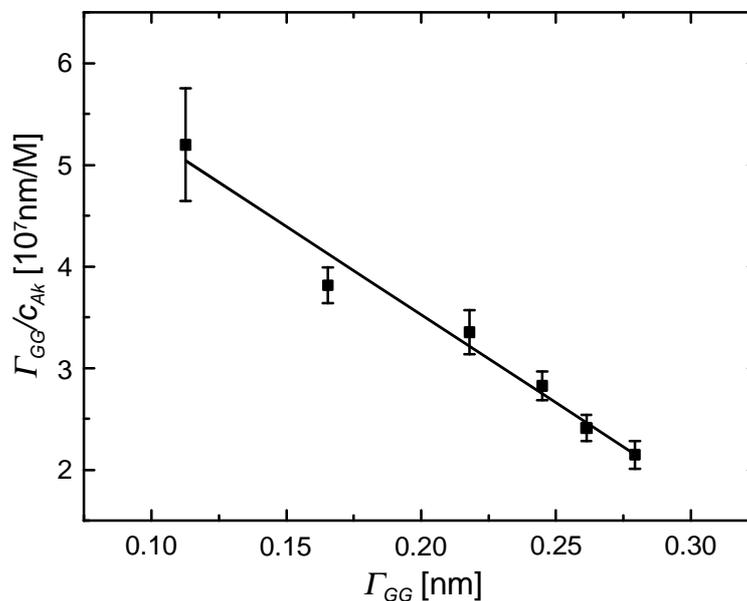


Abbildung 4.7: Kinetik Atrazin(immob.)/K4E7: Scatchard-Plot.

Aus der Steigung der Geraden in Abbildung 4.7 wurde die Gleichgewichtskonstante zu  $K_{het} = (1.7 \pm 0.1) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Sie lag damit eine Größenordnung unter derjenigen in Lösung.

Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten aus der Assoziationsphase der Bindungskurven wurde in (Abschnitt 2.3.2.2.4) beschrieben. Es wurde zunächst die Linearisierung nach Karlsson (Gleichung (20)) angewandt, womit zugleich der Bereich der überwiegenden kinetischen Kontrolle festgelegt war. Anschließend wurde in diesem Bereich eine Kurvenanpassung nach Gleichung (22) durchgeführt. Zuletzt wurde noch das Verfahren der numerischen Integration nach der Methode von Heun (Gleichung (24)) mit Rückwärtsintegration eingesetzt. Die Integrale wurden deshalb aufsummiert, weil bei diesen Werten der lineare Verlauf visuell einfacher erkannt werden konnte als bei Auftragung der Einzelintegrale. Dies war erforderlich, da der Bereich der Auswertung gesondert festgelegt und nicht aus Gleichung (20) übernommen werden sollte.

In Abbildung 4.8 sind die aus diesen drei Auswertemethoden erhaltenen Werte für  $k_{obs}$  gegen die aktive K4E7-Konzentration aufgetragen. Zur Ermittlung von  $k_a$  und  $k_d$  aus dem Zusammenhang  $k_{obs} = k_a \cdot c_{Ak} + k_d$  (Gleichung (25)) wurde zudem noch für jede dieser Datenreihen eine lineare Regression durchgeführt.

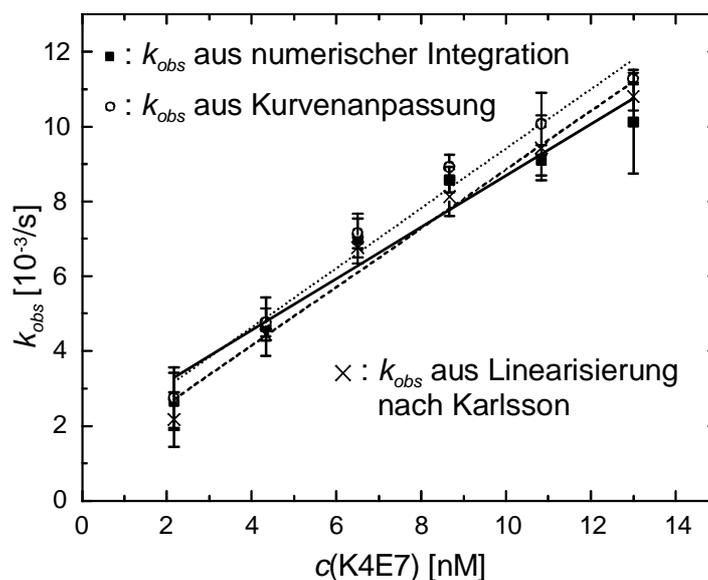


Abbildung 4.8: Kinetik Atrazin(immob)/K4E7: Ermittlung der  $k_{obs}$ -Werte sowie von  $k_a$  und  $k_d$   
 (×):  $k_{obs}$  aus Linearisierung nach Karlsson mit linearer Regression (-----).  
 (○):  $k_{obs}$  aus Kurvenanpassung mit linearer Regression (.....).  
 (■):  $k_{obs}$  aus numerischer Integration mit linearer Regression (—).

Die  $k_{obs}$ -Werte jeweils einer Konzentration waren einander so ähnlich, daß sich ihre Fehlerbereiche überschneiden. Die 98 %-Vertrauensbereiche der Kalibriergeraden wurden ebenfalls berechnet. Sie wurden jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 4.8 nicht eingezeichnet.

Nach dem Zusammenhang  $k_{obs} = k_a \cdot c_{Ak} + k_d$  hängt die Antikörperkonzentration  $c_{Ak}$  mit der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_a$  zusammen, d. h. wenn die Konzentration um den Faktor  $f$  falsch bestimmt wurde (Abschnitt 4.2.2.2), dann wird  $k_a$  um den Faktor  $1/f$  verfälscht. Man beachte außerdem, daß in Abbildung 4.7 die Antikörperkonzentration  $c_{Ak}$  und nicht die Antikörperbindungsstellenkonzentration  $c_{0,Ak}$  als Abszisse aufgetragen wurde, da sich die Schichtdickenänderung unabhängig davon ändert, ob der Antikörper mit 1 oder 2 Bindungsstellen an der Oberfläche bindet. Im Modell wurde davon ausgegangen, daß die immobilisierten Antigenmoleküle so weit voneinander entfernt sind, daß ein Antikörper aus sterischen Gründen nur mit einer Bindungsstelle auf der Oberfläche binden kann, so daß keine Aviditätseffekte auftreten. Ob dieses Modell zutrifft oder nicht, kann durch Vergleich mit anderen Werten ermittelt werden (s. u.).

In Tabelle 4.1 sind die aus den verschiedenen Auswertemethoden für das System Atrazin(immob.)/K4E7 erhaltenen Größen einander gegenübergestellt.

Konstante	Linearisierung nach Karlsson	Kurvenanpassung	Numerische Integration
$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$(7.8 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(8.0 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(6.9 \pm 0.8) \cdot 10^5$
$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(1.8 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}$
$K_{het} = k_a/k_d$ [ $M^{-1}$ ]	$(7.8 \pm 3.6) \cdot 10^8$	$(5.5 \pm 1.8) \cdot 10^8$	$(3.8 \pm 1.5) \cdot 10^8$
$K_{het}$ Scatchard [ $M^{-1}$ ]	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^8$		

Tabelle 4.1: Kinetik Atrazin(immob.)/K4E7: Vergleich der aus der Assoziationsphase nach verschiedenen Auswertemethoden erhaltenen physikalischen Größen.

Die Geschwindigkeitskonstanten, die aus Linearisierung und Kurvenanpassung errechnet wurden, waren im Rahmen der Fehlergenauigkeit gleich. Die Werte aus der Numerischen Integration wichen stärker ab, da mit dieser Methode der Auswertebereich der Bindungskurve gesondert ermittelt wurde. Sie lagen aber immer noch im selben 98 %-Vertrauensbereich wie die Ergebnisse aus den beiden anderen Verfahren und damit in derselben Größenordnung. Damit können zumindest Linearisierung und Kurvenanpassung äquivalent verwendet werden, während die Auswertung mit Numerischer Integration als zusätzliche Kontrolle dienen kann.

Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $k_a$  liegt im mittleren Bereich (Abschnitt 2.3.2.2.4). Die dennoch vergleichsweise hohe Affinität  $K_{het}$  wurde durch die kleine Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_d$  erreicht.

Die Gleichgewichtskonstante der Oberflächenreaktion liegt eine Größenordnung unter derjenigen der Reaktion in Lösung (Abschnitt 4.2.2.1). Nach (Piehler 1997) liegt dies möglicherweise an der Immobilisierung des Antigens, da hierdurch der Zugang der Antikörper zu den entsprechenden Antigen-Determinanten sterisch gehindert sein kann. Auch repulsive Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Oberflächenmatrix führen zu einer Abnahme der Gleichgewichtskonstanten gegenüber derjenigen in Lösung.

#### 4.2.2.3.2 Auswertung der Dissoziationsphase

Die Abnahme der Bindungskurve während der Spülphase nach der Assoziation war so schwach ausgeprägt, daß die Dissoziationsphase nicht ausgewertet werden konnte. Damit konnte die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation  $k_d$  nur aus der Assoziationsphase ermittelt werden. So wurde allein aufgrund des Aussehens der Bindungskurven ein kleiner Wert für  $k_d$  erwartet, was mit den erhaltenen Werten im Bereich von  $(1.0 - 1.8) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  lagen, übereinstimmte.

Rückbindungs- oder Aviditätseffekte können zwar nicht grundsätzlich ausgeschlossen, hier jedoch vernachlässigt werden, da sie nicht ausreichten, um  $k_d$  zu so kleinen Werten zu verfälschen, daß daraus Werte von  $K_{het} > K$  resultierten.

### 4.2.3 Bindungsassays am Benz(a)pyren/anti-Benz(a)pyren-System

Ein polyklonales Antiserum gegen Benz(a)pyren (BP) wurde getestet

- auf die Affinität gegen BP sowie Chrysen und Pyren, zwei dem BP ähnlichen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK),
- auf die Konzentration des aktiven Anteils der Antikörper gegen BP,
- auf die Geschwindigkeit der Reaktion an immobilisiertem BP.

Der Antikörper wurde gegen ein BP-BSA-Konjugat entwickelt, bei dem das Benz(a)pyren über eine Isocyanatgruppe in 6-Stellung kovalent an das BSA (Rinderserumalbumin) gebunden war, und sollte hinsichtlich seiner Verwendung in der Immunanalytik beurteilt werden. BP wurde auf der Oberfläche als Benz(a)pyren-6-Isocyanat (BP-6-NCO) immobilisiert.

### 4.2.3.1 Affinität

Zunächst wurde mit dem BP/anti-BP-System eine Affinitätstitration durchgeführt. Da es sich bei den Antikörpern im Serum um polyklonale Antikörper handelte, sollte sich zumindest eine mittlere Affinitätskonstante ermitteln lassen sowie eine mittlere Konzentration des tatsächlich an BP bindenden IgG-Anteils (Immunglobulin G). Abbildung 4.9 zeigt die Bindungskurven, die unter Massentransport-kontrollierten Bedingungen am System BP/anti-BP erhalten wurden. Die Ausgangskonzentration an anti-BP betrug  $0.16 \mu\text{g/l}$  (s. Abschnitt 4.2.3.2), die BP-Konzentrationen wurden zwischen 0 und  $100 \mu\text{g/l}$  gewählt.

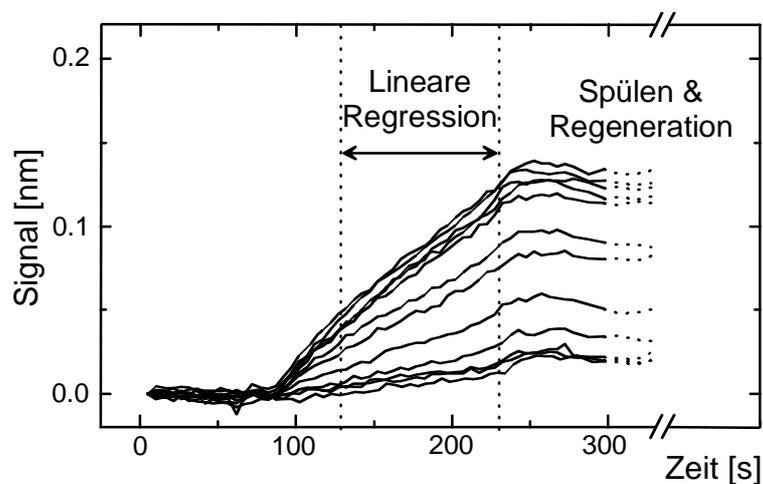


Abbildung 4.9: Bindungskurven der Affinitätstitration am System BP/antiBP, 1 Meßreihe.

Die Steigungen der Bindungskurven unterschieden sich untereinander mehr als diejenigen des Systems Atrazin/K4E7 (Abbildung 4.4). Da die Abstände der Antigenkonzentrationen in beiden Systemen gleich gewählt waren, deutet dies schon jetzt auf eine niedrigere Gleichgewichtskonstante des Systems BP/anti-BP hin.

Bei der Herstellung der Oberflächen für diesen Bindungsassay konnte aufgrund der geringen Löslichkeit von BP-6-NCO in DMF nur eine niedrig konzentrierte Lösung für die Immobilisierung hergestellt werden (Abschnitt 3.2.1.4), woraus eine geringe Oberflächendichte an immobilisiertem BP resultierte. Deshalb wurde mit geringen Antikörperkonzentrationen, d. h. mit geringen Signalverschiebungen im Vergleich zum System Atrazin/K4E7, gearbeitet, damit dennoch der Massentransport geschwindigkeitsbestimmend für die Bindung war.

Für die Auswertung wurden die Steigungen im linearen Bereich der Bindungskurven zwischen 130 s und 230 s mittels linearer Regression ausgewertet. In

jeder der vorgenommenen Meßreihen wurden die Steigungen auf die des jeweiligen Nullwerts (d. h.  $c(\text{BP}) = 0 \mu\text{g/l}$ ) bezogen, um geringe Schwankungen in der Probenzusammensetzung auszugleichen. Aus diesen normierten Steigungen wurde anschließend die Kalibrierkurve aufgetragen.

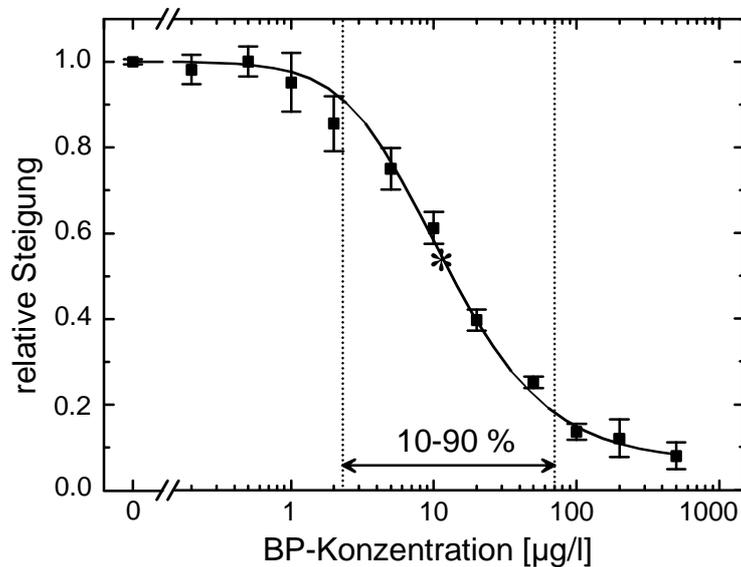


Abbildung 4.10: Kalibrierkurve aus der Affinitätstiteration am System BP/anti-BP:

$c_{0,Ak} = 2.1 \text{ nM}$ ; (\*) markiert den Testmittelpunkt.

Die normierten Steigungen des Systems BP/anti-BP (Abbildung 4.10) unterscheiden sich im gleichen Antigenkonzentrationsbereich bei gleichen Konzentrationsabständen untereinander mehr als diejenigen des Systems Atrazin/K4E7 (Abbildung 4.5), wie schon die Bindungskurven erkennen ließen. Dies kann einerseits damit zusammenhängen, daß ein polyklonales Antiserum anstelle von monoklonalen Antikörpern vorliegt, andererseits mit einer niedrigeren Affinitätskonstanten.

Die Kurvenanpassung der Funktion „Bidiss“ an die Steigungen ergab eine Gleichgewichtskonstante  $K = (5.3 \pm 0.3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Obwohl diese Funktion für monoklonale, bivalente Antikörper entwickelt worden war, ließ sie sich mit sinnvollen Werten für alle Funktionsparameter gut an die Steigungen des BP/anti-BP-Systems anpassen (Abbildung 4.10). Damit traf die berechnete Gleichgewichtskonstante auf den Großteil der im Antiserum enthaltenen anti-BP zu und wird im folgenden als Affinitätskonstante des BP/anti-BP-Systems bezeichnet. Gegenüber dem System Atrazin/K4E7 besaß das System BP/anti-BP eine niedrigere Affinität, weshalb es dann noch mit 3 - 70  $\mu\text{g/l}$  BP einen größeren 10 - 90 %-Arbeitsbereich und mit 12  $\mu\text{g/l}$  BP einen höheren Testmittelpunkt

aufwies. Die Möglichkeiten zur Anwendung des BP/anti-BP-Systems in der Analytik werden in Abschnitt 4.2.3.4 ausführlicher diskutiert.

#### **4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung und Flußzellenkalibrierung**

Durch Anpassen der Funktion „Bidiss“ an die Steigungen wurde analog Abschnitt 4.2.2.2 neben der Affinitätskonstanten die Ausgangskonzentration an aktivem anti-BP zu  $(0.16 \pm 0.04) \mu\text{g/ml}$  pro Probe ermittelt bzw. die Gesamtkonzentration an anti-BP-Bindungsstellen zu  $c_{0,Ak} = (2.1 \pm 0.5) \text{ nM}$ . Damit galt  $K < 1/c_{0,Ak}$ , d. h. hier kann die Affinitätskonstante durch Kurvenanpassung besser bestimmt werden. Dies äußerte sich darin, daß die Affinitätskonstante auf 6 % genau bestimmt werden konnte, während die Standardabweichung der Bindungsstellenkonzentration 24 % des Mittelwerts betrug. Zur besseren Bestimmung der anti-BP-Konzentration müßte diese in der Größenordnung Faktor 100 hinaufgesetzt werden, damit  $K > 1/c_{0,Ak}$  wird. Dies würde einerseits den Materialverbrauch bedenklich erhöhen, andererseits ist der Einsatz höherer anti-BP-Konzentrationen schon durch die geringe Oberflächendichte an immobilisiertem BP begrenzt (s. Abschnitt 4.2.3.1).

Mittels UV-Spektroskopie wurde die Ausgangskonzentration an anti-BP in jeder Probe zu  $3.39 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $c_{0,Ak} = 45.2 \text{ nM}$  berechnet. Damit betrug der aktive Anteil an anti-BP nur 4.7 % der Gesamt-IgG-Konzentration. Dieser geringe Anteil ist darin begründet, daß bei Erzeugung von Antikörpern gegen ein Antigen, das kovalent auf ein Protein gebunden ist, um eine Immunantwort zu erzeugen, der größte Teil der Antikörper auf das Protein ansprechen und nur ein geringer Teil auf das Antigen (Abschnitt 2.3.1.1). Ein kleiner Teil der Antikörper kann zusätzlich durch wiederholte Einfrier- und Auftau-Vorgänge denaturiert worden sein. Das Vorhandensein nur eines geringen Teils aktiver, gegen das Antigen wirksamen Antikörper unterstreicht, wie wichtig es ist, auf den Oberflächen den Anteil an Bindung durch unspezifische Wechselwirkungen gering zu halten.

In Abschnitt 4.2.2.2 wurde erläutert, wie wichtig die tatsächliche Konzentration an aktiven Antikörperbindungsstellen zur Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Konstanten ist. Da beim Vorliegen eines Antigen/Antikörper-Systems mittlerer oder kleiner Affinität die Konzentration an Antikörpern, die gegen das Antigen aktiver sind, nur mit großem Fehler aus der Kurvenanpas-

sung der Affinitätstitration ermittelt werden kann, wurde eine weitere Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung der aktiven Antikörper getestet.

Nach dem ersten Fickschen Gesetz hängt bei Massentransport-kontrollierter Bindung auf der Oberfläche die Transportrate von Antikörpern an die Oberfläche allein von der Konzentration der Antikörper in Lösung ab. Für alle Antikörper der IgG-Gruppe kann ein durchschnittliches Molekulargewicht von 150 000 g/mol angenommen werden, d. h. wenn die Schichtdickenzunahme pro Zeit, also die absolute Steigung der Bindungskurve, für eine aktive Antikörperkonzentration einmal bekannt ist, dann sollten damit auch Konzentrationsbestimmungen unbekannter Antikörperlösungen möglich sein. Voraussetzung ist allerdings, daß die Fließgegebenheiten, d. h. die Dimensionen des Flußkanals sowie die Fließgeschwindigkeit während der Auswertung, exakt dieselben sind.

Bei der Affinitätstitration hochaffiner Antigen/Antikörper-Systeme kann die Konzentrationen an aktiven Antikörpern gut bestimmt werden (Abschnitt 2.3.3.1). In Abschnitt 4.2.2.2 konnte so eine Aussage über die aktive K4E7-Konzentration im vorliegenden Atrazin/K4E7-System gemacht werden. Ausgehend von diesem Wert wurde in einem Durchflußdetektor bei der gleichen Fließgeschwindigkeit während der Injektion die Steigungen bei verschiedenen aktiven K4E7-Konzentrationen bestimmt und daraus eine K4E7-Konzentrationsreihe erstellt.

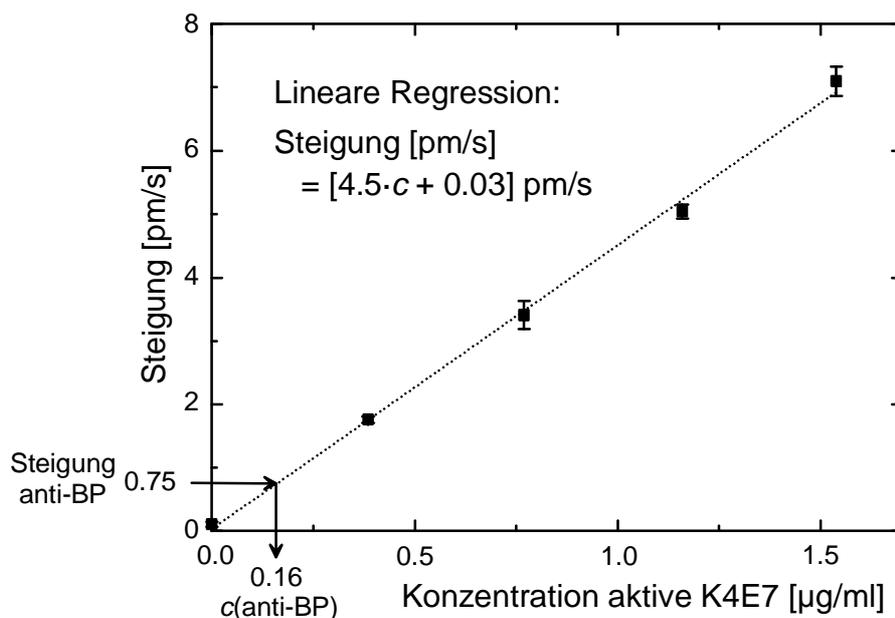


Abbildung 4.11: Flußzellenkalibrierung zur Bestimmung aktiver Antikörperkonzentrationen.

In Abbildung 4.11 sind die Steigungen verschiedener bekannter aktiver K4E7-Konzentrationen gegen diese Konzentrationen sowie die Kalibriergerade dieser Werte aufgetragen. Bei der Affinitätstitration am BP/anti-BP-System betrug die Steigung der Nullwerte (d. h.  $c(\text{BP}) = 0$ )  $(0.75 \pm 0.05)$  pm/s, wobei dieselbe Flußzelle bei derselben Fließgeschwindigkeit während der Injektion verwendet wurde. Mit Hilfe der Kalibriergeraden wird daraus eine Konzentration für aktiven anti-BP von  $(0.16 \pm 0.01)$  µg/ml errechnet. Dies stimmt mit dem aus der Affinitätstitration erwarteten Wert überein, die Abweichung ist nun geringer.

Ein Fehler dieser Methode ist zwar, daß man die Dimensionen des Flußkanals schon durch Aus- und Einbauen eines Plättchens sowie durch Verwenden einer anderen Schichtmodifikation geringfügig verändert, wie jedoch obiger Vergleich zeigt, können durch geeignete Handhabung diese Probleme vermieden werden. Damit ist diese Abschätzung durchaus zu gebrauchen.

#### ***4.2.3.3 Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der Bindung an die Oberfläche***

Wie in Abschnitt 4.2.3.1 mit dem Modell „Bidiss“ gezeigt, sind die Antikörper der anti-BP-Fraktion in der vorliegenden IgG-Fraktion durchaus mit monoklonalen Antikörpern vergleichbar. Damit ist es zulässig, die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion an der Oberfläche zu beobachten und die daraus erhaltene Gleichgewichtskonstante mit derjenigen der Reaktion in Lösung (Abschnitt 4.2.3.1) zu vergleichen.

Abbildung 4.12 zeigt die Bindungskurven, die mit unterschiedlich konzentrierten Antikörper-Proben unter kinetisch kontrollierten Bedingungen am System BP(immob.)/anti-BP aufgenommen wurden.

Die Bindungskurven in Abbildung 4.12 weisen nicht nur den typischen Verlauf auf, der für die Assoziationsphase bei kinetisch kontrollierter Bindung an die Oberfläche erwartet wird, sondern auch eine ausgeprägte Dissoziation. Dies ist ein Hinweis darauf, daß eine höhere Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante als bei dem hochaffinen Atrazin(immob.)/K4E7-System in Abschnitt 4.2.2.3 vorliegt.

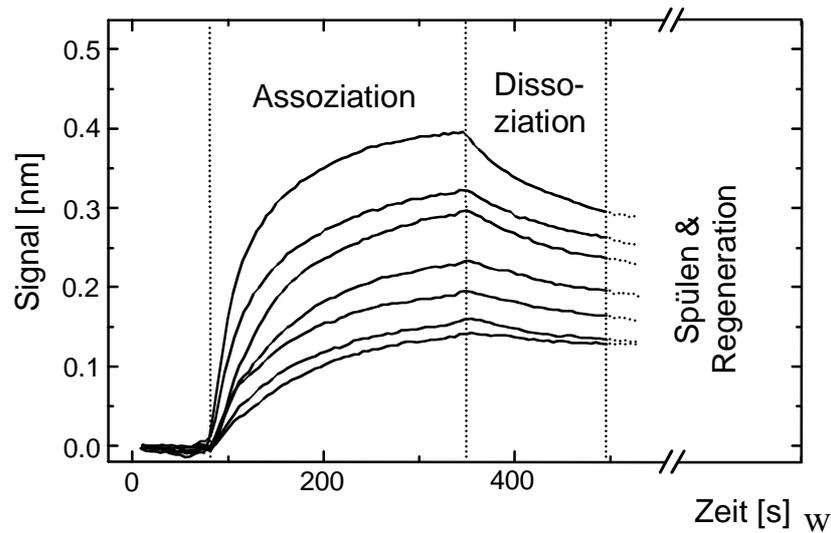


Abbildung 4.12: Kinetik BP(immob.)/anti-BP: 1 Meßreihe.

#### 4.2.3.3.1 Auswertung der Assoziationsphase

Zunächst wurde ein Scatchard-Plot zur Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten der Bindung an die Oberfläche erstellt (Abbildung 4.13).

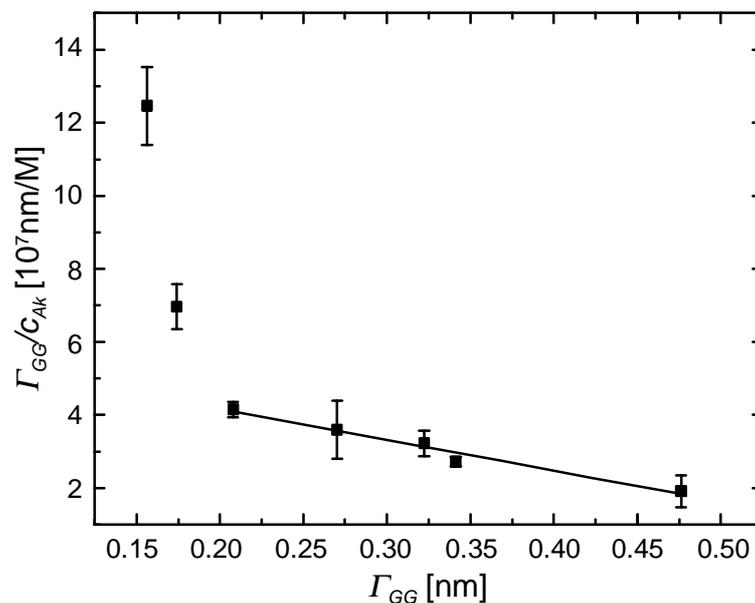


Abbildung 4.13: Kinetik BP(immob.)/anti-BP: Scatchard-Plot.

Die Werte liegen nicht wie erwartet auf einer Geraden, die  $\Gamma_{GG}/c_{AK}$ -Werte für die beiden niedrigsten Gleichgewichtsbeladungen  $\Gamma_{GG}$ , die zu den niedrigsten Konzentrationen  $c_{AK}$  gehören, weichen ab. Dies kann zum einen am teilweise polyklonalen Charakter der Antikörper liegen, da ein linearer Verlauf des Scatchard-Plots nur bei gleichwertigen Bindungsstellen gegeben ist. Zum anderen können die Gleichgewichtsbeladungen  $\Gamma_{GG}$ , die hier die niedrigsten Werte ha-

ben, durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche verfälscht worden sein, deren Anteil bei höheren Gleichgewichtsbeladungen vernachlässigt werden kann. Wegen der Abweichung dieser beiden Werte wurden sie für die lineare Regression nicht berücksichtigt.

Aus der Steigung wurde eine Gleichgewichtskonstante für die Oberflächenreaktion von  $K_{het} = (8.4 \pm 0.8) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  ermittelt. Sie war damit größer als die Affinitätskonstante der Reaktion in Lösung, lag jedoch noch in derselben Größenordnung.

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Bindungskurven während der Assoziationsphase analog Abschnitt 4.2.2.3.1 ausgewertet. In Abbildung 4.14 sind die  $k_{obs}$ -Werte, die aus den drei Auswertemethoden Linearisierung nach Karlsson, Kurvenanpassung und numerische Integration erhalten wurden, gegen die aktive Konzentration an anti-BP aufgetragen. Aufgrund des Zusammenhangs  $k_{obs} = k_a \cdot c_{Ak} + k_d$  (Gleichung (25)) wurde auch hier für jede dieser Datenreihen eine lineare Regression durchgeführt, um daraus die Geschwindigkeitskonstanten  $k_a$  und  $k_d$  zu berechnen. Für  $c_{Ak}$  wurde wieder die aktive Antikörperkonzentration (anstelle der Bindungsstellenkonzentration) aufgetragen.

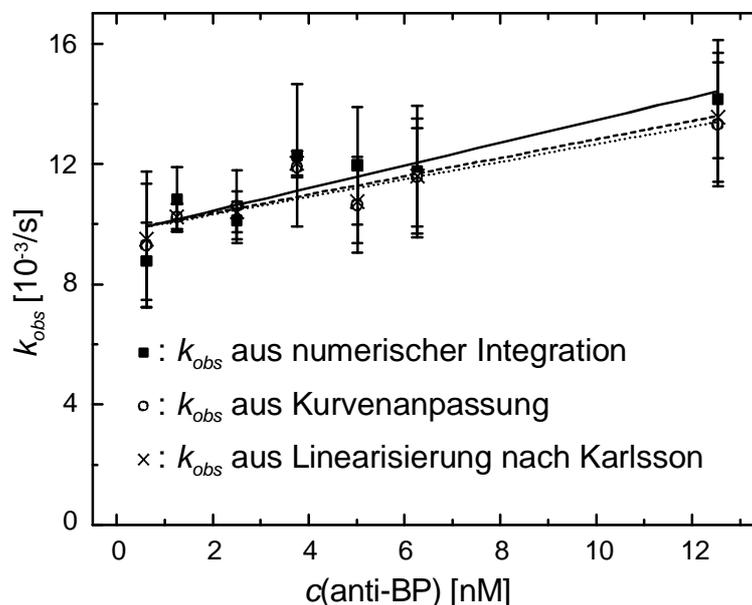


Abbildung 4.14: Kinetik BP(immob)/anti-BP: Ermittlung der  $k_{obs}$ -Werte sowie von  $k_a$  und  $k_d$

(×):  $k_{obs}$  aus Linearisierung nach Karlsson mit linearer Regression (.....).

(○):  $k_{obs}$  aus Kurvenanpassung mit linearer Regression (.....).

(■):  $k_{obs}$  aus numerischer Integration mit linearer Regression (——).

Erneut waren sich die mit den drei Auswertemethoden ermittelten  $k_{obs}$ -Werte so ähnlich, daß sich ihre Fehlerbereiche überschneiden. Die 98 %-Vertrauensbereiche der Kalibriergeraden wurden wieder berechnet, jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 4.14 nicht eingezeichnet.

In Tabelle 4.1 sind die aus den verschiedenen Auswertemethoden für das System BP(immob.)/K4E7 erhaltenen Größen einander gegenübergestellt.

Konstante	Linearisierung nach Karlsson	Kurvenanpassung	Numerische Integration
$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$(3.1 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(2.9 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(3.8 \pm 0.9) \cdot 10^5$
$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$(9.8 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$	$(9.7 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$	$(9.7 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$
$K_{het} = k_a/k_d$ [ $M^{-1}$ ]	$(3.1 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(3.0 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(3.9 \pm 0.9) \cdot 10^7$
$K_{het}$ Scatchard [ $M^{-1}$ ]	$(8.4 \pm 0.8) \cdot 10^7$		

Tabelle 4.2: Kinetik BP(immob.)/anti-BP: Vergleich der aus der Assoziationsphase nach verschiedenen Auswertemethoden erhaltenen physikalischen Größen.

Wie schon beim System Atrazin(immob.)/K4E7 waren die Geschwindigkeitskonstanten, die aus Linearisierung und Kurvenanpassung errechnet wurden, im Rahmen der Fehlergenauigkeit gleich, während die Ergebnisse aus der Numerischen Integration stärker abwichen. Auch hier lagen die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten jeweils im selben 98 %-Vertrauensbereich.

Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation beim System BP(immob.)/anti-BP lag im selben Bereich wie die des Systems Atrazin(immob.)/K4E7. Aufgrund der größeren Dissoziationskonstanten  $k_d$  wird jedoch beim System BP(immob.)/anti-BP ein kleinerer Wert für die Gleichgewichtskonstante  $K_{het}$  erhalten als beim System Atrazin(immob.)/K4E7.

Die Gleichgewichtskonstante der Oberflächenreaktion liegt in der Größenordnung derjenigen der Reaktion in Lösung (Abschnitt 4.2.3.1). Dies kann bedeuten, daß die Zugänglichkeit der Bindungsstellen nicht gehindert ist. Die Größe des Moleküls kann zusätzlich gegen die repulsiven Wechselwirkungen mit der Oberflächenmatrix abschirmen. Abbildung 4.15 veranschaulicht die möglichen Angriffsstellen des Antikörpers am immobilisierten BP-Derivat.

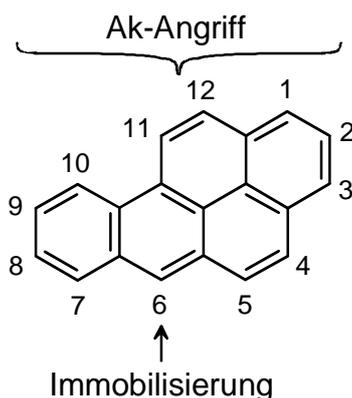


Abbildung 4.15: Mögliche Epitope des Benz(a)pyrens.

Dasselbe BP-Derivat, das hier auf der Oberfläche immobilisiert wurde, wurde für die Herstellung des BP-BSA-Konjugats verwendet, das für die Antikörperherstellung eingesetzt worden war. Bei diesem BP-6-NCO war daher nur die Seite des Moleküls, die der derivatisierten Seite gegenüber lag, zugänglich für den Antikörper. Damit konnte sie vom Immunsystem erkannt werden und so eine Antwort des Immunsystems hervorrufen.

Es ist jedoch auch möglich, daß Rückbindungs- oder Aviditätseffekte die Dissoziationskonstante so weit herabsetzen, daß die Gleichgewichtskonstante  $K_{het}$  heraufgesetzt wird. Allerdings ist die Dissoziationskonstante  $k_d$  nicht so klein, daß  $K_{het}$  größer als  $K$  in der homogenen Phase wird. Dies wird durch zusätzliche Auswertung der Dissoziationsphase überprüft.

#### 4.2.3.3.2 Auswertung der Dissoziationsphase

Die Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_d$  wurde in Abschnitt 2.3.2.2.4 beschrieben. Es wurde die Linearisierung nach Karlsson (Gleichung (21)), Kurvenanpassung (Gleichung (26)) und numerische Integration nach der Methode von Heun (Gleichung (28)) mit Rückwärtsintegration eingesetzt. Es wurde jeweils die erste Minute der Dissoziationsphase ausgewertet. In Abbildung 4.16 sind die aus diesen drei Auswertemethoden erhaltenen Werte für  $k_d$  gegen die aktive Konzentration an anti-BP aufgetragen.

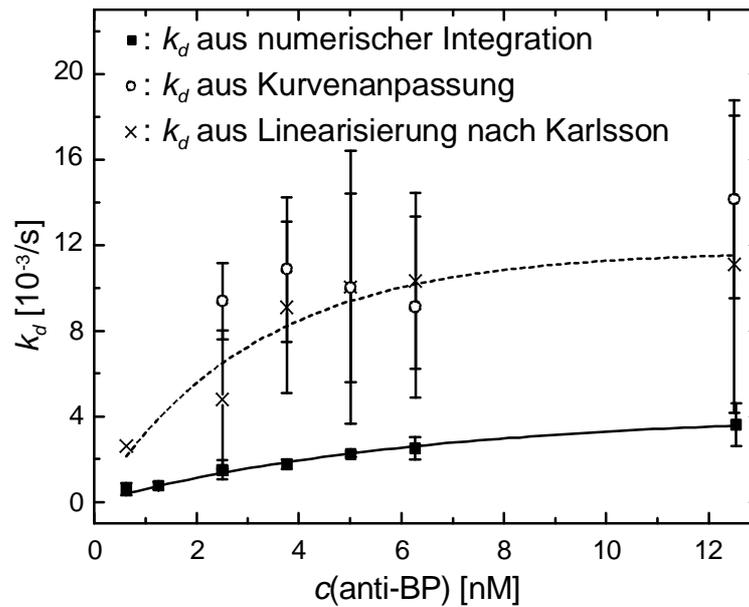


Abbildung 4.16: Kinetik BP(immob)/anti-BP: Ermittlung von  $k_d$  aus der Dissoziationsphase.

(×):  $k_d$  aus Linearisierung nach Karlsson mit Sättigungsfunktion (-----).

(○):  $k_d$  aus Kurvenanpassung.

(■):  $k_d$  aus numerischer Integration mit Sättigungsfunktion (—).

Die Ergebnisse aus der Kurvenanpassung (Symbol (O) in Abbildung 4.16) schwanken stark (Abweichungen bis zu 50 %), es ist keine Tendenz der Werte erkennbar. Bei kleinen anti-BP-Konzentrationen, bei denen die Dissoziation weniger stark ausgeprägt war, konnte sie außerdem nicht durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen der einzelnen  $k_d$ -Werte wurde auf eine weitere Auswertung verzichtet. Eine Ursache für die Schwankungen der Werte bzw. für die fehlgeschlagene Kurvenanpassung an die Dissoziationsphase von Bindungskurven kleinerer Antikörperkonzentrationen kann in der kleinen Punktezahl (13 St.) liegen, die für die Auswertung herangezogen wird. Die Auswertung eines längeren Zeitraums ist nicht sinnvoll, da, je mehr Antikörper von der Oberfläche dissoziieren, umso mehr Bindungsstellen auf der Oberfläche für die Rückbindung frei werden und so das Ergebnis verfälscht werden kann.

Bei der Linearisierung nach Karlsson sowie der numerischen Integration nehmen die  $k_d$ -Werte mit zunehmender Antikörperkonzentration zu, da bei höherer Beladung der Oberfläche weniger Rückbindungseffekte auftreten können, die die  $k_d$ -Werte zu kleineren Werten hin verfälschen können. Um die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante „ $k_d^{max}$ “ für eine vollständig mit Antikörpern bedeckte Oberfläche, d. h.  $c(\text{anti-BP}) \rightarrow \infty$  zu ermitteln, wurde an die Werte eine Sättigungsfunktion nach Gleichung (40) angepaßt:

$$k_d = k_d^{max} (1 - e^{-const \cdot c(anti-BP)}) \quad (40)$$

Bei der Linearisierung nach Karlsson (Symbol (×)) weichen die Werte ebenfalls stark voneinander ab, obwohl hier eine Tendenz erkennbar ist. Auch hier konnten die  $k_d$ -Werte für kleine Antikörperkonzentrationen teilweise nicht ausgewertet werden. Mit Hilfe von Gleichung (40) wurde  $k_d^{max} = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  als Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante erhalten.

Dagegen wurden bei Auswertung der Bindungskurven mit der numerischen Integration (Symbol (■))  $k_d$ -Werte erhalten, die weniger als 20 % voneinander abwichen. Dies lag an der Methode nach Heun, wodurch die Werte stabiler als Einzelintegrale waren. Nun konnten auch Dissoziationsphasen bei kleineren Konzentrationen, die weniger stark ausgeprägt aber noch erkennbar waren, ausgewertet werden. Die Dissoziationsratenkonstante wurde als  $k_d^{max} = (4.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Damit hatte sich auch bei der Auswertung der Dissoziationsphase die numerische Integration als nützliches Verfahren erwiesen, das mit weniger Werten auskommt, einfach zu handhaben ist und im Rahmen der Fehlergenauigkeit sinnvolle Werte liefert.

Die  $k_d^{max}$ -Werte aus den unterschiedlichen Auswertemethoden wichen stark voneinander ab. Während der Wert aus der Karlsson-Linearisierung nur wenig höher lag als der aus der Auswertung der Assoziationsphase erhaltene  $k_d$ -Wert, war der Wert aus der numerischen Integration nur noch halb so groß.

Diese Abweichungen zeigen, wie schwierig es ist, die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation zu ermitteln. Bei der Bestimmung aus der Assoziationsphase wird sie nach linearer Regression bei der Auftragung der einzelnen Werte nach Gleichung (25) aus dem Achsenabschnitt ermittelt, der ohnehin mehr fehlerbehaftet ist als die Steigung der Geraden. Bei Ermittlung der Werte aus der Dissoziationsphase erhält man, je nach Auswertemethode, unterschiedliche Ergebnisse, die sich jedoch im Rahmen einer Größenordnung bewegen, so daß zumindest beurteilt werden kann, ob die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante durch Rückbindungs- oder Aviditätseffekte stark verringert ist. Zunächst läßt sich nicht unterscheiden, welcher dieser beiden Effekte eine stark verringerte Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation verursacht. Die Anpassung einer Sättigungsfunktion an bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen bestimmte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten analog Abbildung 4.16 kann einen Hinweis geben, ob nahe der Sättigungsbelegung die Geschwindigkeitskonstante

der Dissoziation höher ist, vorausgesetzt, die Werte sind nicht, wie oben beschrieben, zu sehr fehlerbehaftet. Dies würde dann für die Verfälschung der Werte durch Rückbindungseffekte sprechen.

Die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante ohne Verfälschung durch Rückbindung wäre theoretisch möglich, indem man nahe der Sättigungsbelegung der Oberfläche arbeitet. Allerdings kann, wenn eine derart hohe Antikörperkonzentration eingesetzt wird, die Assoziationsphase nicht mehr ausgewertet werden, da durch sterische Hinderung an der Oberfläche die Bindungsstelle nicht mehr gleich zugänglich sind und sich damit Effekte mit unterschiedlichen Bindungskinetiken überlagern, so daß eine einheitliche Aussage nicht mehr möglich ist (Piehler 1997).

#### 4.2.3.4 Kreuzreaktivität und Eignung für Immunoassays

Die Antikörper wurden auf Kreuzreaktivität gegen die BP-ähnlichen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) Chrysen und Pyren überprüft. Dazu wurden in Abbildung 4.17 die Kalibrierkurven der Titrations von anti-BP mit diesen PAK aufgeführt. Zum Vergleich ist die Kalibrierkurve der Titration von anti-BP mit BP (vgl. Abbildung 4.10) nochmals dargestellt. Auf die graphische Darstellung der Standardabweichungen durch die sog. Fehlerbalken wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

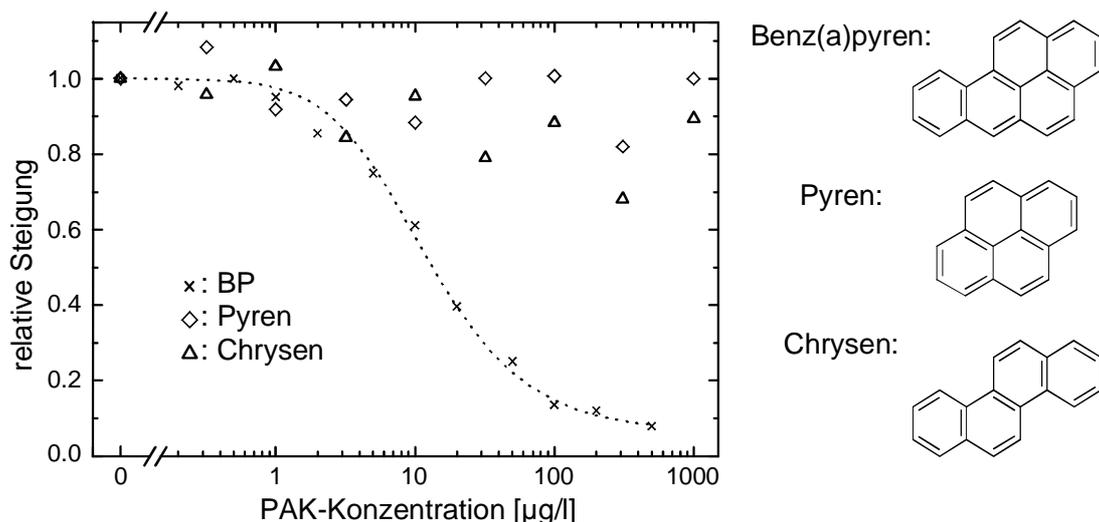


Abbildung 4.17: „Kalibrierkurven“ der Titrations von anti-BP mit Pyren und Chrysen im Vergleich zu derjenigen von anti-BP mit BP (vgl. Abbildung 4.10). Rechts daneben die Strukturen der einzelnen PAK.

Im betrachteten Konzentrationsbereich wurde keine Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen Chrysen oder Pyren festgestellt. damit ist der Antikörper in diesem Konzentrationsbereich für den spezifischen Nachweis von BP aus einer Mischung dieser drei PAK geeignet.

Wie in Abschnitt 4.2.3.1 beschrieben, liegt der Testmittelpunkt der Titration von BP mit anti-BP bei  $12 \mu\text{g/l}$  BP, der 10 - 90 % -Arbeitsbereich wurde zu  $3 - 70 \mu\text{g/l}$  BP ermittelt, d. h. die Kalibrierkurve liegt im Bereich höherer Konzentrationen. Sie konnte nicht durch Herabsetzen der Antikörperkonzentration zu kleineren BP-Konzentrationen hin verschoben werden, da die Affinität des BP/anti-BP-Systems im mittleren Bereich liegt, und so die Lage der Kalibrierkurve von der Affinitätskonstanten des Systems bestimmt wird (Abschnitt 2.3.3.1). Abbildung 4.18 soll veranschaulichen, daß in diesem Fall Änderungen in der Antikörperkonzentration zu niedrigeren Werten hin tatsächlich keinen Effekt auf die Lage der Kalibrierkurve haben. Sie zeigt Kalibrierkurven, die für das System BP/anti-BP mit der Funktion „Bidiss“ berechnet wurden, wobei die Affinitätskonstante sowie die BP-Konzentration aus Abschnitt 4.2.3.1 eingesetzt und für die anti-BP-Bindungsstellenkonzentration  $c(\text{anti-BP})$  verschiedene Werte gewählt wurden.

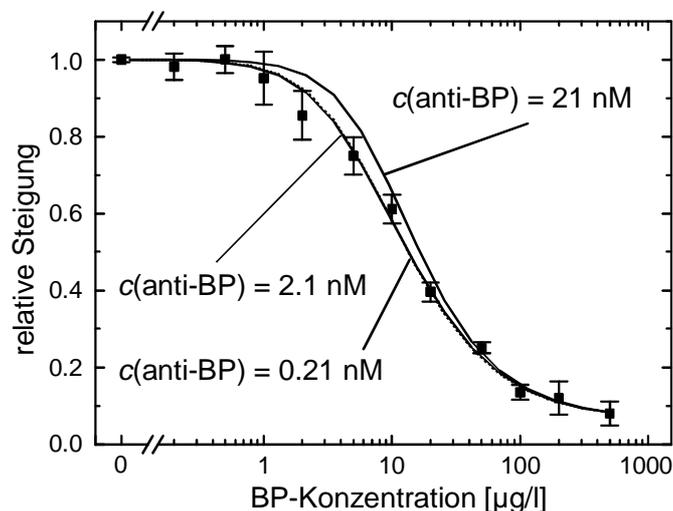


Abbildung 4.18: Kalibrierkurven für das System BP/anti-BP mit  $K$  und  $c_{Ag}$  aus Abschnitt 4.2.3.1 sowie verschiedenen  $c_{0,Ak}$ .

Die Kalibrierkurven für  $c(\text{anti-BP}) = 2.1 \text{ nM}$  und  $c(\text{anti-BP}) = 0.21 \text{ nM}$  können nicht voneinander unterschieden werden, d. h. selbst der Einsatz eines Zehntels der Ausgangskonzentration hat keinen Effekt auf die Lage der Kalibrierkurve. Dagegen verschiebt die zehnfache Antikörperkonzentrationen die Kalibrierkurve

zu höheren Analytkonzentrationen hin, hier gilt  $K = 1/c_{AK}$ . Da der EU-Grenzwert für BP jedoch bei 0.01 µg/l (EG 1998) liegt, ist dies vom analytischen Standpunkt aus gesehen nicht sinnvoll. Damit kann dieser Antikörper nicht dazu verwendet werden, niedrige BP-Konzentrationen zu bestimmen. Er ist aber geeignet zur spezifischen Bestimmung der BP-Konzentrationen in einem PAK-Gemisch, in dem zusätzlich noch Chrysen und Pyren vorhanden sind.

#### 4.2.4 Vergleich der Antigen/Antikörper-Systeme aus den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3

In (Abschnitt 2.3.2.2.4) wird beschrieben, daß die Affinitätskonstante nicht allein von der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation sondern vor allem von derjenigen der Dissoziation abhängt. Bei den beiden untersuchten Antigen/Antikörper-Systemen, dem Atrazin/K4E7-System und dem BP/anti-BP-System, liegt die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante im Bereich von  $10^5$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ], während die Differenz zwischen den Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten nahezu eine Größenordnung beträgt und damit den Unterschied bei den Affinitätskonstanten ausmacht.

Bezüglich der Problematik Affinität/Avidität stellt sich die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, thermodynamische und kinetische Größen (bzw. Mittelwerte auf die „ganze Menge“ bezogen) bei vollständigen Antikörpern anzugeben oder ob man dies nur bei monovalenten Rezeptoren wie z. B.  $F_{ab}$ - oder  $F_c$ -Fragmenten gestatten sollte. Dem steht gegenüber, daß man die immunologischen Nachweisverfahren meist mit den vollständigen Antikörpern durchführen möchte, ohne erst durch langwierige Verfahren  $F_c$ - bzw.  $F_{ab}$ -Fragmente herstellen zu müssen.

Obige Beispiele haben gezeigt, daß auch bei Bindungassays mit vollständigen Antikörpern Unterschiede zwischen den Systemen zu erkennen waren, sowohl in den Bindungskurven als auch bei der Auswertung. Die Auswertung der Bindungskurven führte zu durchaus sinnvollen Ergebnissen.

Messungen mit  $F_{ab}$ -Fragmenten (Piehler *et al.* 1997a) zeigten, daß bei dem Atrazin/K4E7-System die Ergebnisse der Bindungstests mit vollständigen K4E7-Antikörpern gut mit denen übereinstimmten, die mit  $F_{ab}$ -Fragmenten durchgeführt wurden. In beiden Fällen war  $K_{het}$  eine Größenordnung kleiner als  $K$ , und das, obwohl bei  $F_{ab}$ -Fragmenten die Avidität gleich der Affinität ist, allerdings

können Rückbindungseffekte auch hier auftreten. Die Beurteilung Affinität/Avidität bzw. der Einfluß der Rückbindung wurde bei den obigen Systemen, die jeweils kleine Analyten enthielten, durch den Vergleich der Affinitätskonstanten  $K$  der Reaktion in Lösung mit der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion an der Oberfläche  $K_{het}$  ermöglicht. In beiden Fällen waren diese Effekte nicht so ausgeprägt, daß  $K_{het} > K$  wurde. Die Ergebnisse aus den Messungen mit  $F_{ab}$ -Fragmenten würden eher für Rückbindungseffekte sprechen. Dies stimmt mit dem Oberflächenmodell, bei dem die immobilisierten Antigenmoleküle so weit auseinander liegen, daß die meisten Antikörper nur mit einer Bindungsstelle auf der Oberflächen binden, überein.

### **4.3 Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse zur Erweiterung des Konzentrationsbereichs bei der Affinitätstitation**

Die Fließ-Injektions-Analyse mit markierungsfreier Detektion wurde in einem Gradientenansatz verwendet, mit Hilfe dessen der Arbeitsbereich eines hochaffinen Antigen/Antikörper-Systems in der Affinitätstitation zu höheren Antigenkonzentrationen hin erweitert werden sollte.

#### **4.3.1 Wahl des Antigen/Antikörper-Systems**

Kalibrierkurven, wie sie in den Abschnitten 4.2.2.1 und 4.2.3.1 erstellt worden sind, können auch zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen verwendet werden. Der Nachteil bei diesem Verfahren ist, daß bei Verwendung hochaffiner Antikörper der 10 - 90 %-Arbeitsbereich unter einer Größenordnung liegt (Beispiel: System Atrazin/K4E7, Abbildung 4.5). Bei Antikörpern mittlerer Affinität zum Antigen ist der 10 - 90 %-Arbeitsbereich zwar größer als eine Größenordnung, aber kleine Antigenkonzentrationen können nicht mehr bestimmt werden (Beispiel: System BP/anti-BP, Abbildung 4.10). Ziel war es nun, einen Assay im Testformat des Bindungshemmtests zu entwickeln, mit dem der Konzentrationsbereich zu höheren Konzentrationen hin erweitert werden konnte, ohne den Bereich niedrigerer Konzentrationen einzuschränken. Es wurde das hochaffine Atrazin/K4E7-System ausgewählt, da hier der Nachweis kleiner Antigenkonzentrationen schon erfolgreich durchgeführt worden war (Mouvet *et al.* 1996, vgl. Abschnitt 4.2.2.1). Abschließend wurden die Bindungstests noch beim niedriger affinen Desethylatrazin/K4E7-System durchgeführt, um zu testen, in wieweit die Affinitätskonstante die Ergebnisse des Gradientenansatzes beeinflusst.

Die Festlegung des Arbeitsbereichs wurde jeweils mit der 10 - 90 % B/B<sub>0</sub>-Methode nach (Midgley *et al.* 1969) durchgeführt, da dies den Vergleich von Arbeitsbereichen aus verschiedenen Auswertemethoden allein aus dem Aussehen der Kalibrierkurve ermöglichte.

#### **4.3.2 Der Gradientenansatz: Unterschied zur Affinitätstitation**

Beim bisherigen Ansatz der Affinitätstitation wurden feste Volumina Atrazin- und K4E7-Lösung zusammengegeben, wobei die K4E7-Konzentration konstant

gehalten und die Atrazin-Konzentration variiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurde die Konzentration an freien K4E7-Bindungsstellen im Gleichgewicht analysiert. Damit wurde als einziges Konzentrationsverhältnis zwischen Atrazin und K4E7 das Gleichgewichtsverhältnis ausgewertet, welches durch die Ausgangskonzentrationen vorgegeben war.

Beim Gradientenansatz wurde analog zur Affinitätstitration immer noch mit gleichen Volumina K4E7- und Atrazinlösung gearbeitet, auch wurde die K4E7-Konzentration konstant gehalten und die Atrazin-Konzentration variiert. Bei beiden Ansätzen wird die Transduceroberfläche als Sonde für die Konzentration an freien Antikörperbindungsstellen verwendet, d. h. es wird unter massentransportlimitierten Bedingungen gemessen. Jedoch wurden beim Gradientenansatz die Lösungen nicht mehr zusammengegeben und nach einer gewissen Inkubationszeit untersucht, sondern die Lösungen wurden unmittelbar nacheinander in den Fluß gegeben, so daß sie erst während des Transportvorgangs zum Detektor sich durchmischen und miteinander reagieren konnten. Durchmischung und Reaktion führten in den Fluidelementen, die nacheinander den Detektor passierten, zu einem Bereich von Konzentrationsverhältnissen Antigen : Antikörper, d. h. die Konzentration an freien Antikörperbindungsstellen am Detektor hing zum einen von der physikalische Dispersion der Lösungen und zum anderen von der momentan erreichten Lage des Gleichgewichts ab und nicht allein von den Ausgangskonzentrationen der eingesetzten Atrazin- bzw. K4E7-Lösungen wie bei der Affinitätstitration.

Theoretische Berechnungen zeigten, daß dieses Verfahren bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen unterschiedliche Bindungskurven ergeben mußte, da der 90 %ige Umsatz unter den gegebenen Bedingungen vergleichsweise schnell erreicht wird (Abschnitt 2.3.3.2). Für diese Bindungskurven mußten neue Auswertemethoden entwickelt werden

Die Dispersion, die nun, im Gegensatz zur Affinitätstitration, ausdrücklich erwünscht war, wurde durch geeignete Wahl des Flußsystems sowie der Einstellungen im Meßprotokoll erreicht (s. Abschnitt 3.2.3.4). Aus praktischen Gründen wurden beim Bindungsassay mit Gradientenansatz erst die Atrazin- und dann die K4E7-Lösung in die Probenschleife geladen.

### 4.3.3 Erstellung von Konzentrationsprofilen

Damit sichergestellt war, daß sich die Atrazin- und die K4E7-Lösungen in ausreichendem Maß miteinander vermischen, wurden vorab Konzentrationsprofile dieser Lösungen aufgenommen.

#### 4.3.3.1 Konzentrationsprofile aus Farbstoffmessungen

Zunächst wurden mit Farbstofflösung die Konzentrationsprofile zweier Lösungen am Detektor, die nacheinander in die Probenschleife geladen wurden, aufgenommen. Zur Erhaltung des Konzentrationsprofils der ersten Lösung (Lösung 1) wurde für diese Farbstofflösung eingesetzt und für die nachfolgende Lösung (Lösung 2) PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung). Entsprechend wurde, um das Konzentrationsprofil von Lösung 2 zu erhalten, für Lösung 1 PBS eingesetzt und für Lösung 2 Farbstofflösung. Die so erhaltenen Konzentrationsprofile wurden anschließend übereinandergelegt. Das Volumen von Lösung 2 wurde jeweils aus Förderrate der Fixpumpe (Abschnitt 4.1.2), zurückgelegter Wegstrecke im Schlauch und Dauer des Pumpens berechnet, das Volumen von Lösung 1 aus Volumen der Probenschleife (540  $\mu\text{l}$ ) abzüglich des Volumens von Lösung 2. Im Bindungshemmtest mit Gradientenansatz wird Atrazinlösung anstelle von Lösung 1 und K4E7-Lösung anstelle von Lösung 2 eingesetzt.

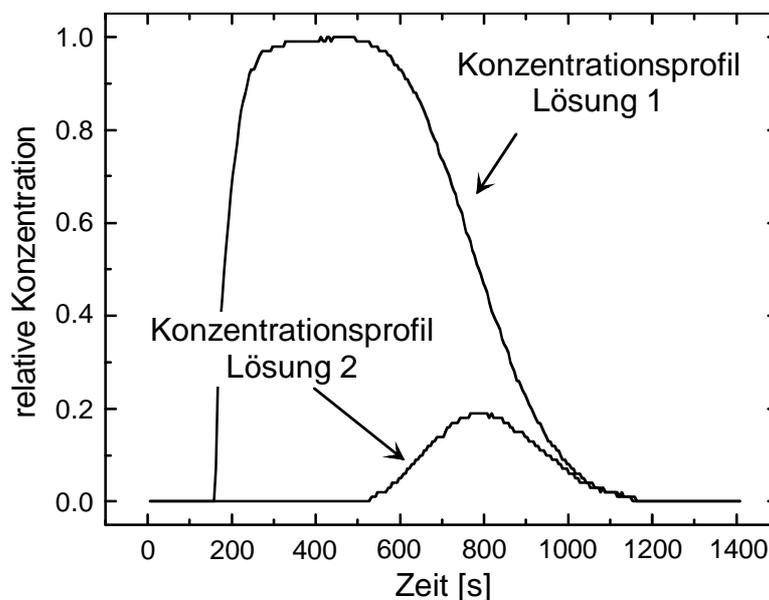


Abbildung 4.19: Konzentrationsprofile von Lösung 1 und Lösung 2 am Detektor mit  $V(\text{Lösung 1}) = 536 \mu\text{l}$ ,  $V(\text{Lösung 2}) = 4 \mu\text{l}$ .

Abbildung 4.19 zeigt die Konzentrationsprofile für ein großes Volumen Lösung 1 und ein kleines Volumen Lösung 2. Danach gibt es zwischen 160 s und 520 s einen Bereich, dem sich nur Lösung 1 am Detektor befindet. Im Bindungshemmtest wird anstelle von Lösung 1 die Atrazinlösung eingesetzt, d. h. dieser Bereich kann nicht ausgewertet werden, da der Transducer in der Flußzelle als Sonde für die Konzentration an freien Antikörper-Bindungsstellen verwendet wird und Antigenmoleküle nicht gleichzeitig direkt ausgewertet werden können. Nach obigen Konzentrationsprofilen liegen beide Lösungen lediglich im Zeitfenster von 520 s bis 1160 s gleichzeitig am Detektor vor.

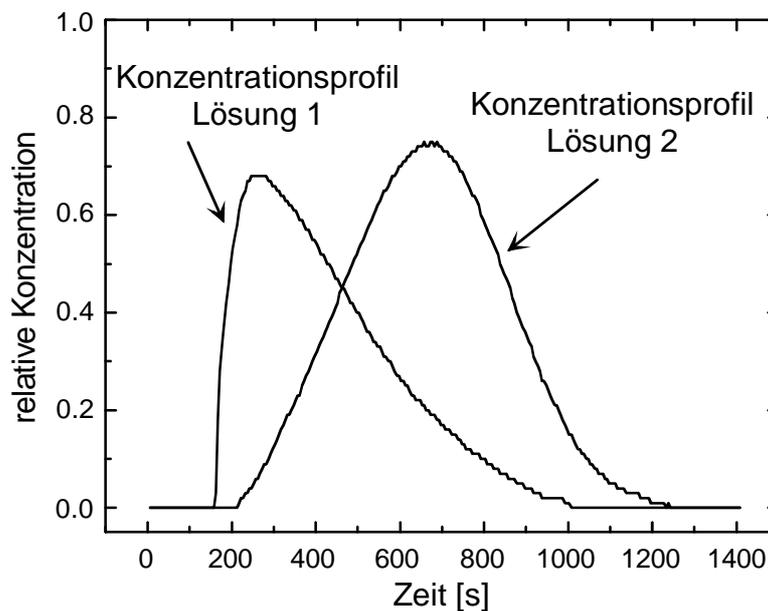


Abbildung 4.20: Konzentrationsprofile von Lösung 1 und Lösung 2 am Detektor mit  $V(\text{Lösung 1}) = 247 \mu\text{l}$ ,  $V(\text{Lösung 2}) = 293 \mu\text{l}$ .

Abbildung 4.20 zeigt die Konzentrationsprofile zweier Lösungen mittleren Volumens am Detektor, die nacheinander in die Probenschleife geladen wurden. Hier liegt nur zwischen 160 - 210 s Lösung 1 ohne Lösung 2 am Detektor vor. Der Bereich der Durchmischung ist nun länger, von 210 s bis 1000 s. Von 1000 - 1200 s befindet sich noch Lösung 2 am Detektor, die lediglich durch Trägerstrom verdünnt wird, nicht durch Lösung 1. Damit wäre das Zeitfenster für die Auswertung 800 s lang. Da die Lösungen sich außerdem schon vermischen können, bevor sie den Detektor erreichen, sollte dies nach den Simulationsrechnungen in Abschnitt 2.3.3.2 ausreichen.

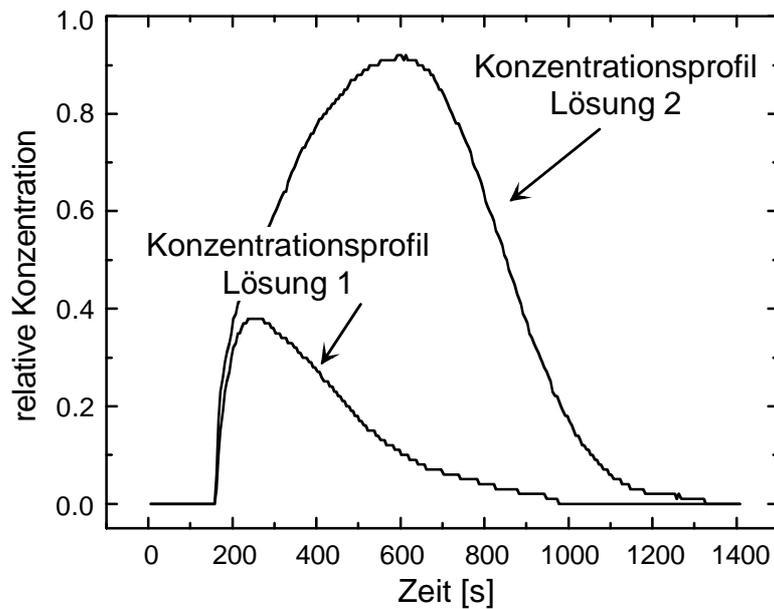


Abbildung 4.21: Konzentrationsprofile von Lösung 1 und Lösung 2 am Detektor mit  $V(\text{Lösung 1}) = 50 \mu\text{l}$ ,  $V(\text{Lösung 2}) = 490 \mu\text{l}$ .

Abbildung 4.21 schließlich zeigt die Konzentrationsprofile für ein kleines Volumen Lösung 1 und ein großes Volumen Lösung 2. Hier gibt es keinen Bereich mehr, in dem sich nur Lösung 1 am Detektor befindet. Nach obigen Konzentrationsprofilen liegen beide Lösungen jetzt im Zeitfenster von 160 s bis 1000 s gleichzeitig am Detektor vor. Nach 1000 s liegt nur durch Trägerpuffer verdünnte Antikörperlösung am Detektor vor. Das Zeitfenster der gleichzeitigen Durchmischung ist hier geringfügig größer als bei den Einstellungen, mit denen die Konzentrationsprofile in Abbildung 4.20 erstellt wurden, doch ist der Verbrauch an Lösung 2, d. h. der Verbrauch an Antikörperlösung im Bindungshemmtest, um 67 % höher. Dieser hohe Verbrauch rechtfertigt nicht ein lediglich 5 % längeres Zeitfenster. Deshalb wurden für den Bindungshemmtest mit Gradientenansatz die Einstellungen gewählt, mit denen die Konzentrationsprofile in Abbildung 4.20 erstellt wurden.

#### 4.3.3.2 Vergleich des Konzentrationsprofils der Farbstofflösung mit dem der Antikörperlösung

Mit den in Abschnitt 4.3.3.1 festgelegten Einstellungen (s. Abbildung 4.20) wurde zunächst eine Bindungskurve mit Atrazinlösung und K4E7-Lösung aufgenommen, wobei  $c(\text{Atrazin}) = 0 \mu\text{g/l}$  betrug. Da man bei Massentransportkontrollierter Bindung von Antikörpern an die Oberfläche aus der Steigung der Bindungskurve auf die momentane Konzentration der (aktiven) Antikörper am

Detektor schließen kann (Abschnitt 2.3.3.1), konnte damit ein zweites Konzentrationsprofil errechnet (Kalibriergerade s. Abbildung 4.11) und mit dem Farbstoffprofil verglichen werden. Abbildung 4.22 zeigt die auf diese beiden Arten berechneten Konzentrationsprofile für die K4E7-Lösung am Detektor sowie die zugehörige Bindungskurve.

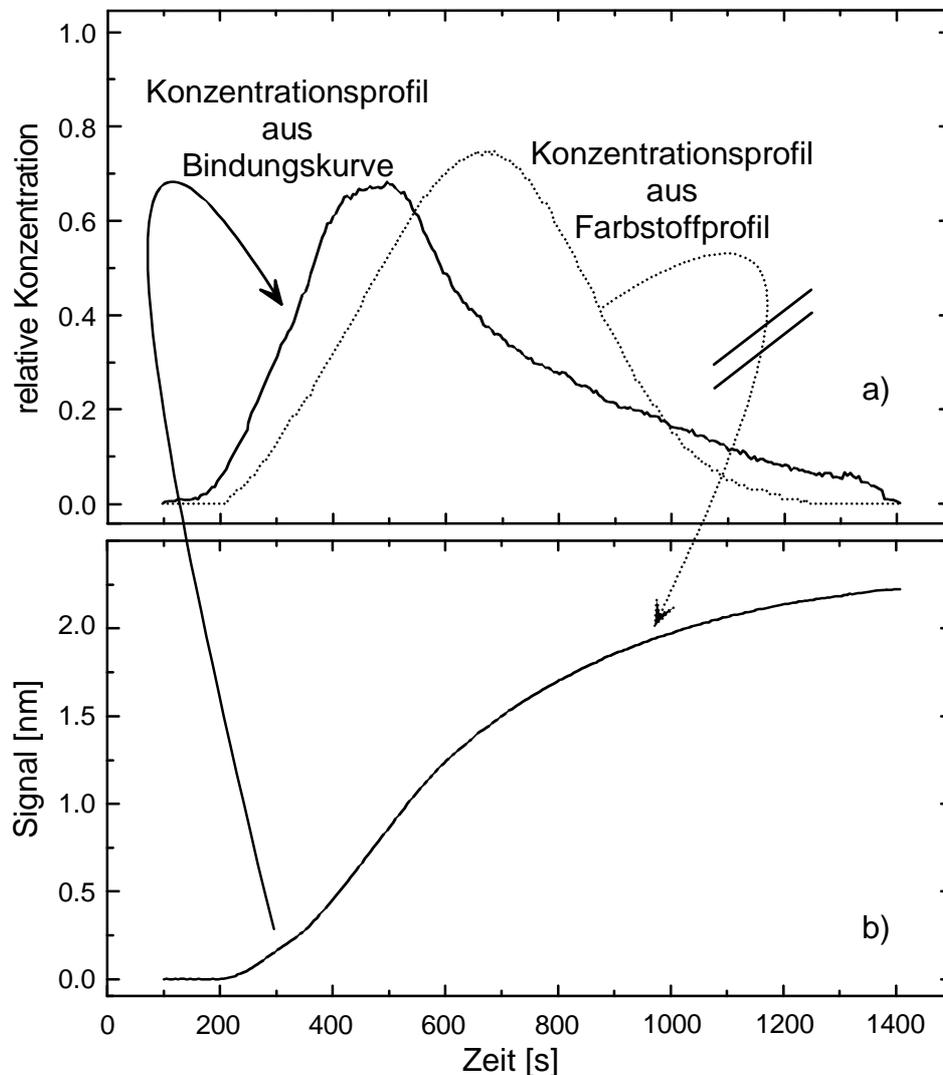


Abbildung 4.22: Vergleich von Konzentrationsprofilen mit der tatsächlichen Bindungskurve:

a): Konzentrationsprofil aus Farbstoffmessung (.....) und  
Konzentrationsprofil aus Bindungskurve (—).

b): Bindungskurve, aus der Konzentrationsprofil in a) errechnet wurde.

In Abbildung 4.22 a) ist zunächst das entsprechend Abschnitt 4.3.3.1 aus Farbstoffmessungen erhaltene Konzentrationsprofil abgebildet. Beim Anstieg der Antikörperkonzentration am Detektor würde man einen Anstieg der Steigung der Bindungskurve erhalten. Bei maximaler Antikörperkonzentration ist die

Steigung der Bindungskurve maximal, man erhält einen Wendepunkt. Schließlich nimmt die Antikörperkonzentration am Detektor wieder ab und damit die Steigung der Bindungskurve, bis sie wieder flach verläuft. Zwar zeigt die in Abbildung 4.22b) abgebildete Bindungskurve das beschriebene Verhalten, jedoch stimmen Anstieg und Abfall der Steigungen sowie Lage des Wendepunkts nicht mit dem Farbstoffprofil überein. Ursache dafür ist das unterschiedliche Diffusionsverhalten von Molekülen unterschiedlicher Größe. Während als durchschnittliches Molekulargewicht von Antikörpern 150 000 g/mol angegeben wird, beträgt dasjenige des Farbstoffs Indigokarmin, mit dem die Farbstoffprofile aufgenommen wurden, lediglich 466.36 g/mol. Wie in (Abschnitt 2.1.2.3) beschrieben, nimmt der Diffusionskoeffizient mit zunehmender Molmasse ab und die Diffusion verläuft langsamer. Bei Farbstoffmessungen steigt aufgrund der Taylor-Dispersion, die der Dispersion durch Konvektion entgegen wirkt, die (relative) Farbstoffkonzentration am Detektor schneller an als die K4E7-Konzentration und fällt früher wieder ab. Der durchgestrichene Pfeil in Abbildung 4.22 soll symbolisieren, daß man aus dem Verlauf der Farbstoffkonzentrationen keineswegs auf die Antikörperkonzentrationen und damit die Bindungskurve schließen kann.

Bei der Flußzellenkalibrierung in Abschnitt 4.2.3.2, Abbildung 4.11 wurde ein Zusammenhang zwischen Steigung der Bindungskurve und aktiver K4E7-Konzentration ermittelt. Mit dieser Gleichung konnte aus der Bindungskurve der tatsächliche Verlauf der K4E7-Konzentration am Detektor berechnet werden. Nach Ermittlung der Ausgangskonzentration der eingesetzten K4E7-Lösung wurde der daraus ermittelte relative Konzentrationsverlauf ebenfalls in Abbildung 4.22a) dargestellt. Die Verknüpfung mit der Bindungskurve ist durch den durchgezogenen Pfeil markiert.

Nun wird auch deutlich, daß die relative Farbstoffkonzentration am Detektor höher ist als die relative Antikörperkonzentration. Die Flächen unter beiden Kurven stimmten wie erwartet überein, da in beiden Fällen, relativ gesehen, die gleiche Anzahl an Molekülen den Detektor passiert haben (100 %). Da das parabolische Geschwindigkeitsprofil immer weiter in die Länge gezogen wird, je länger der Fließvorgang dauert, nehmen die relativen K4E7-Konzentrationswerte bei höheren Zeiten entsprechend langsamer ab. Beim Konzentrationsprofil aus der Farbstoffmessung wird diesem Verlauf durch die Taylor-Dispersion entgegengewirkt.

Der Vorteil der Bestimmung von Konzentrationsprofilen durch Farbstoffmessungen ist, daß die Farbstoffe leicht zugänglich, preisgünstig und häufig toxikologisch unbedenklich sind. Zwar geben in diesem speziellen Fall Farbstoffprofile den Konzentrationsverlauf der Antikörper am Detektor nur ungenügend wieder, doch können sie zumindest zum Vergleich verschiedener Einstellungen im Meßprotokoll eingesetzt werden. Das Zeitfenster für  $c > 0$  ist dann im Fall der Antikörperlösung ohnehin größer als im Falle der Farbstofflösung, so daß es nicht falsch überschätzt werden kann.

#### 4.3.3.3 Simulation von Bindungskurven

Abbildung 4.23 zeigt die Konzentrationsprofile der in Abschnitt 4.3.3.1 ausgewählten Einstellungen, mit denen im folgenden die Bindungskurven simuliert wurden.

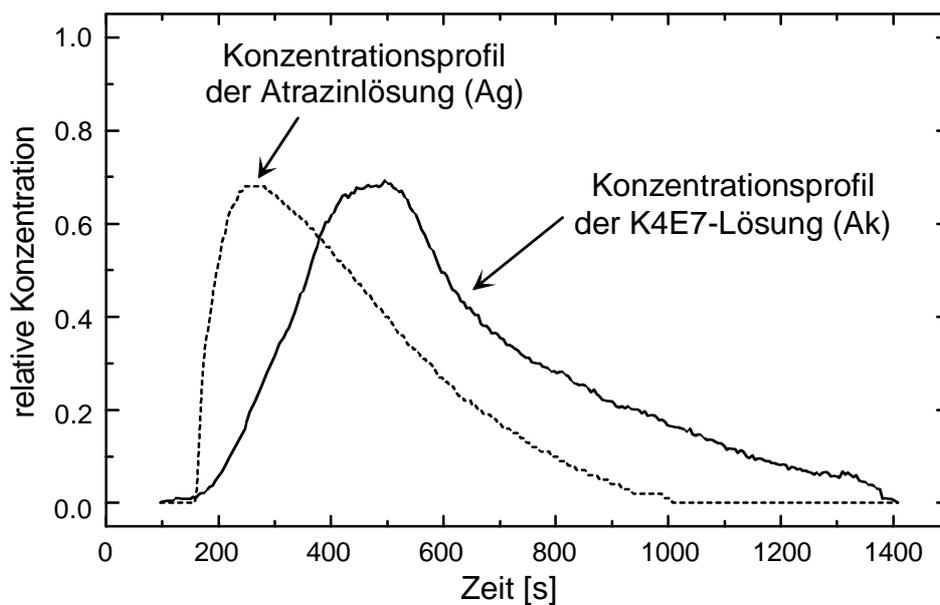


Abbildung 4.23: (.....): Konzentrationsprofil der Ag-Lösung, aus Farbstoffprofil errechnet.

(—): Konzentrationsprofil der Ak-Lösung, aus Bindungskurve errechnet.

Das Konzentrationsprofil der vorauslaufenden Atrazinlösung wird mit Farbstofflösung bestimmt. Atrazin hat ein Molgewicht von 215.69 g/mol, das Molgewicht des Farbstoffs Indigokarmin betrug, wie schon erwähnt, 466.36 g/mol. Es sollte u. a. geprüft werden, ob auch dieser Unterschied in den Molmassen einen Unterschied im Diffusionsverhalten bewirkt. Da die Atrazin-Konzentration mit dem gewählten Aufbau nicht direkt bestimmt werden kann, kann nur anhand des Vergleichs der simulierten Bindungskurve mit der aufgenommenen Bindungs-

kurve beurteilt werden, in wie weit Theorie und Realität übereinstimmen. Das Konzentrationsprofil der Antikörperlösung wurde, wie schon in Abbildung 4.22, aus der Bindungskurve berechnet.

Abbildung 4.24 stellt gemessene (aus Abschnitt 4.3.4) und simulierte Bindungskurven einander gegenüber. Die Konzentration der bindungsfähigen Antikörper und damit die Steigung der Bindungskurve wurde mit Hilfe von Gleichung (34) in Abschnitt 2.3.2.3.1 berechnet. Für die Ausgangskonzentrationen an Atrazin und K4E7 wurden mit Hilfe der entsprechenden Konzentrationsprofile momentan vorliegende Konzentrationen am Detektor berechnet. Für die Affinitätskonstante wurde  $K = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  eingesetzt (Abschnitt 4.2.2.1).

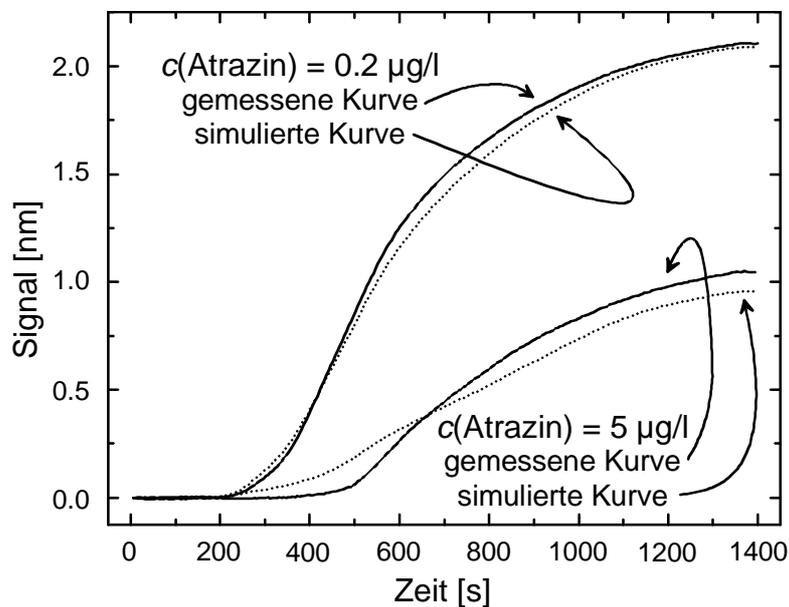


Abbildung 4.24: Bindungskurven aus Bindungsassay (—) und aus Simulation (.....) für zwei verschiedene Atrazin-Ausgangskonzentrationen.

In Abbildung 4.24 ist zu sehen, daß simulierte und gemessene Bindungskurven bei niedrigeren Konzentrationen besser übereinstimmen als bei hohen. In beiden Fällen liegt die simulierte Bindungskurve zunächst über der gemessenen, später darunter. Offenbar wird auch der Konzentrationsverlauf des Atrazins am Detektor durch das Farbstoffprofil nicht richtig wiedergegeben. Wie zuvor dargestellt, besitzt der Farbstoff Indigokarmin ungefähr die doppelte Molmasse als Atrazin, d. h. die Taylor-Dispersion ist bei Atrazin stärker ausgeprägt als bei Indigokarmin. Das würde zwar keinen merklich schnelleren Anstieg der Kurve bedeuten, da der Atrazinlösung wieder Luft vorausgeschickt wurde (vgl. Abschnitt 4.2.1), jedoch einen schnelleren Abfall der Atrazin-Konzentration. Ist die Atrazin-

Konzentration am Anfang höher als angenommen, reagiert mehr Antikörper zum Komplex als rechnerisch festgestellt und die tatsächliche Bindungskurve liegt unter der berechneten. Fällt nun nach einer gewissen Zeit aufgrund der Taylor-Dispersion die Atrazin-Konzentration rascher ab als von den Farbmessungen ausgehend angenommen, so steht mehr freier Antikörper für die Bindung an der Oberfläche zur Verfügung als berechnet und die tatsächliche Bindungskurve liegt über der berechneten, wie in Abbildung 4.24 festgestellt.

Als weitere Ursache für die Abweichung zwischen simulierter und gemessener Bindungskurve käme in Betracht, daß bei der Berechnung der Bindungskurve von Gleichgewichtseinstellung ausgegangen wurde. Allerdings wurde in Simulationsrechnungen in Abschnitt 2.3.3.2 gezeigt, daß 90 %iger Umsatz verhältnismäßig rasch erreicht wird (maximal 70 s), verglichen mit der Dauer des Bindungsassays (20 min), so daß dieser Umstand eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte.

Damit können die Farbstoffprofile zweier nacheinander eingespritzter Lösungen nur mit Einschränkungen für die Bestimmung der günstigen Parameter beim Bindungshemmtest mit Gradientenansatz herangezogen werden. Sie ermöglichen nicht die genaue Berechnung der Bindungskurven.

#### **4.3.4 Auswertung der Bindungskurven aus dem Gradientenansatz**

Mit den in Abschnitt 4.3.2 ausgewählten Parametern wurde, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, die Probenschleife mit einer Atrazinlösung variabler Atrazin-Konzentration, gefolgt von einer K4E7-Lösung festgelegter Konzentration geladen. Die Ausgangskonzentration an K4E7 wurde so gewählt, daß die maximal mögliche Konzentration am Detektor derjenigen der Affinitätstitration in Abschnitt 4.2.2.1 entsprach. Wie man aus dem aus der Bindungskurve gewonnenen Konzentrationsprofil in Abbildung 4.22 ersehen kann, beträgt aufgrund physikalischer Dispersion diese Konzentration beim Gradientenansatz maximal 70 % der Ausgangskonzentration. Um die 0.45 µg/ml K4E7 wie bei der Affinitätstitration am Detektor zu erhalten, mußte daher die Konzentration  $c(\text{K4E7}) = 0.64 \text{ µg/ml}$  eingesetzt werden. Es wurden die gleichen Atrazin-Konzentrationen wie bei der Affinitätstitration verwendet.

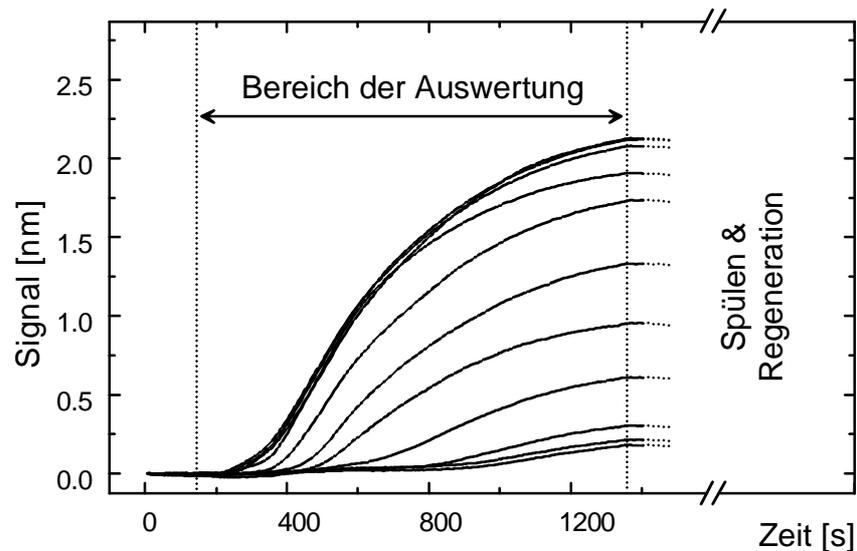


Abbildung 4.25: Bindungskurven des Gradientenansatzes, 1 Meßreihe.

Auswertebereich: 140 - 1360 s.

Abbildung 4.25 zeigt die Bindungskurven, die mit dem Gradientenansatz am System Atrazin/K4E7 erhalten wurden. Der sigmoidale Verlauf der Bindungskurven wurde schon in Abschnitt 4.3.3 erläutert. Mit zunehmender Analytkonzentration werden die Kurven flacher, da weniger freie Antikörperbindungsstellen für die Bindung an der Oberfläche zur Verfügung stehen. Die Wendepunkte verschieben sich zu höheren Zeiten hin und die Steigungen in den Wendepunkten nehmen ab. Bei gleichen Atrazin-Konzentrationen unterscheiden sich die Bindungskurven untereinander mehr als bei der Affinitätstitation.

#### 4.3.4.1 Wahl der Auswerteparameter

Während bei der Affinitätstitation mit Bindungshemmtest der lineare Bereich der Bindungskurve einfach durch lineare Regression ausgewertet werden kann, gibt es im Gradientenansatz keine passende Funktion für die Kurvenanpassung. Deshalb wurden charakteristische Parameter mit Hilfe numerischer Methoden aus den Bindungskurven berechnet. Diese Parameter sollten zwei Bedingungen erfüllen: Erstens mußten sie jede Bindungskurve eindeutig beschreiben, zweitens sollten sie einfach zugänglich sein.

Damit war eine Kurvenanpassung (z. B. Boltzmann-Funktion, Polynom 3. oder höherer Ordnung) ausgeschlossen, da die Kurven damit nicht genau beschrieben werden konnten: Sigmoidale Funktionen setzen eine symmetrische Bindungskurve voraus, was hier nicht gegeben war. Damit wurden besonders am An-

fangsbereich der Kurve große Fehler gemacht. Polynome verschiedener Ordnungen konnten ebenfalls nicht alle Bereiche der Bindungskurve ausreichend beschreiben. Die Anpassung komplizierter Funktionen widersprach der Forderung einfach zugänglicher Parameter.

Folgende Kurvenparameter wurden schließlich zur Auswertung herangezogen (Abbildung 4.26):

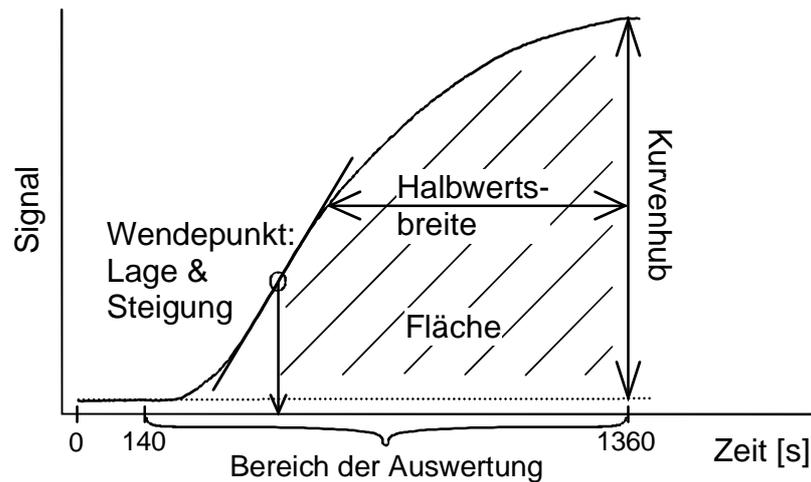


Abbildung 4.26: Auswerteparameter der Bindungskurven aus dem Gradientenansatz.

In Tabelle 4.3 ist aufgeführt, wie die einzelnen Auswerteparameter im Auswertebereich zwischen 140 s und 1360 s rechnerisch ermittelt wurden:

Parameter	Methode
Kurvenhub	Mittelwert der Basislinie vor und nach der Injektionsphase, erhalten aus numerischer Integration
Kurvenfläche	Fläche unter der Bindungskurve, erhalten aus numerischer Integration
Halbwertsbreite	Breite der Bindungskurve bei halbem Kurvenhub, erhalten aus numerischer Integration
Steigung im Wendepunkt	Maximale Steigung, erhalten aus erster Ableitung der Bindungskurve (nach Glätten)
Lage des Wendepunkts	Lage der maximalen Steigung, erhalten aus erster Ableitung der Bindungskurve (nach Glätten)

Tabelle 4.3: Ermittlung der Auswerteparameter aus Abbildung 4.26.

Im folgenden ist beschrieben, welche Ergebnisse nach Auswertung der einzelnen Kurvenparameter erhalten wurden. Die Parameter wurden pro Meßreihe jeweils auf den Nullwert (d. h.  $c(\text{Atrazin}) = 0 \mu\text{g/l}$ ) bezogen, um geringe Schwankungen in der Probenzusammensetzung auszugleichen. Aus den normierten Parametern wurden anschließend die Kalibrierkurven aufgetragen.

#### 4.3.4.1.1 Auswertung mit Hilfe der Integration

Bei verrauschten Bindungskurven haben Integrationsverfahren den Vorteil, daß sie glättend wirken (Gauglitz 1982). Durch Integration wurden die Fläche unter der Bindungskurve, der gesamte Kurvenhub sowie die Halbwertsbreite ermittelt.

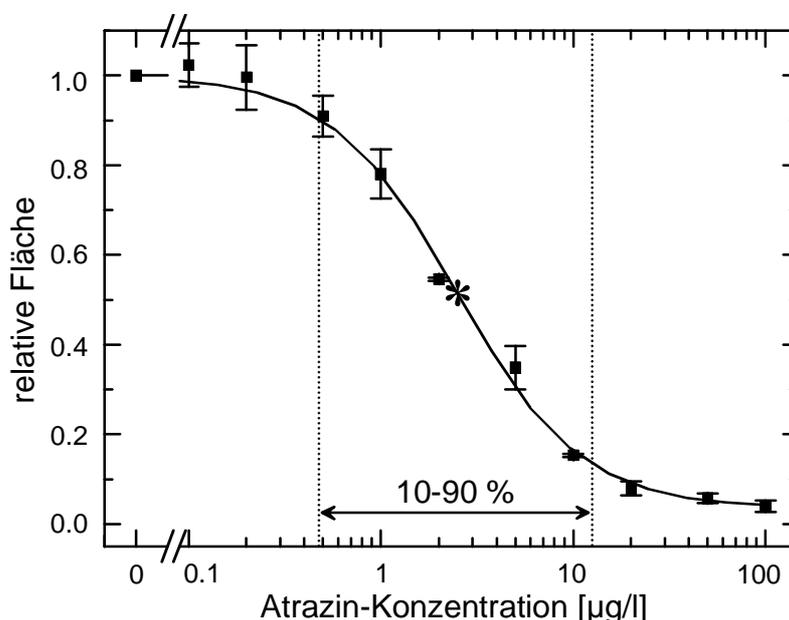


Abbildung 4.27: Auswerteparameter: Fläche unter der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

Abbildung 4.27 zeigt die Kalibrierkurve, die man bei Auswertung der Fläche unter der Bindungskurve erhält. In diesem Parameter sind Informationen über die gesamte Menge an freien Antikörperbindungsstellen, die den Durchflußdetektor passiert hat, enthalten. Dadurch kann der Parameter durch Änderungen in der Flußrate beeinflusst werden. Mit dieser Auswertung wird, wie beim Standardverfahren (Abschnitt 4.2.2.1), eine untere Nachweisgrenze von  $0.5 \mu\text{g/l}$  Atrazin erreicht, d. h. es tritt kein Verlust an Nachweisgrenze im Bereich niedriger Konzentrationen auf. Jedoch hat sich der Testmittelpunkt nach oben zur Atrazin-Konzentration  $2.5 \mu\text{g/l}$  verschoben, d. h. der 10 - 90 %-Arbeitsbereich geht von  $0.5 - 20 \mu\text{g/l}$ , ist also zu höheren Konzentrationen hin verschoben worden. Die Standardabweichungen nehmen mit steigender Analytkonzentration ab.

Dies läßt sich dadurch erklären, daß dieser Parameter bei niedrigen Atrazin-Konzentrationen sehr empfindlich auf Änderungen im zeitlichen Ablauf des Assays reagiert.

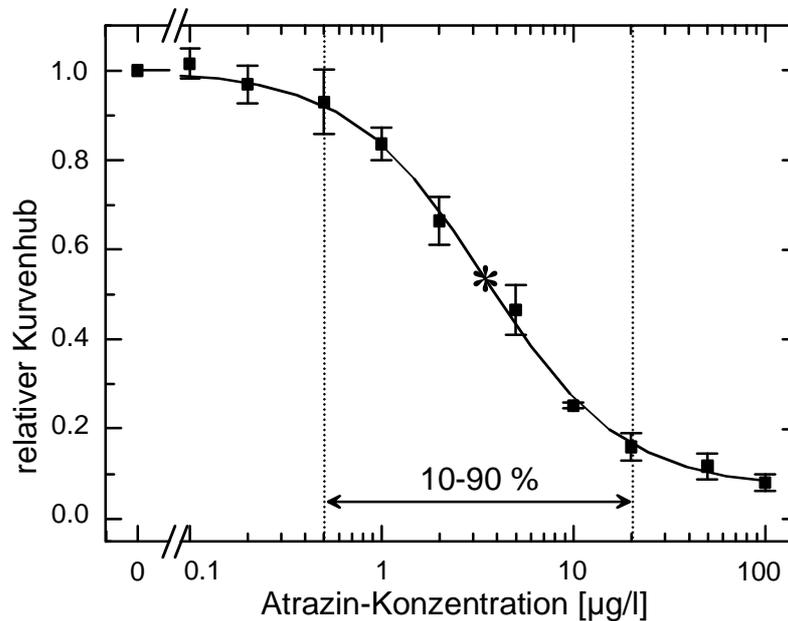


Abbildung 4.28: Auswerteparameter: Kurvenhub der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

In Abbildung 4.28 ist die Kalibrierkurve abgebildet, die man bei Auswertung des Kurvenhubs, d. h. der Differenz der Basislinien vor und nach der Injektionsphase, erhält. Auch dieser Parameter enthält Informationen über die Gesamtmenge an freien Antikörperbindungsstellen, die durch den Durchflußdetektor geflossen sind, wie schon der Parameter „Fläche unter der Kurve“, d. h. auch der Kurvenhub wird durch die Flußrate beeinflusst. Der 10 - 90 %-Arbeitsbereich geht ebenfalls von 0.5 - 20 µg/l, der Testmittelpunkt liegt bei 3.5 µg/l, d. h. auch hier hat sich der Arbeitsbereich zu höheren Konzentrationen hin erweitert, ohne an Nachweisgrenze zu verlieren. Die Standardabweichungen nehmen hier wieder zu höheren Atrazin-Konzentrationen hin ab. Die Entwicklung ist hier jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Auswertung der Fläche unter der Bindungskurve, da der Kurvenhub bei niedrigen Atrazin-Konzentrationen weniger empfindlich auf den zeitlichen Ablauf des Assays im Anfangsbereich reagiert.

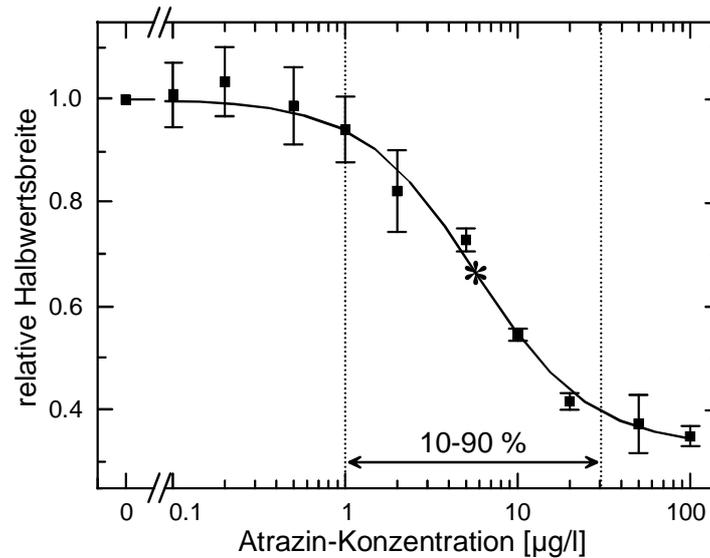


Abbildung 4.29: Auswerteparameter: Halbwertsbreite der Bindungskurve;

(\*) = Testmittelpunkt.

Abbildung 4.29 zeigt die Kalibrierkurve, die man beim Auswerten der Halbwertsbreite erhält. Dieser Parameter ermöglicht die Auswertung von Atrazin-Konzentrationen ab 1 µg/l. Der Testmittelpunkt liegt bei 5.7 µg/l, der Arbeitsbereich geht bis 30 µg/l, und geht damit zu höheren Konzentrationen als die bisher beschriebenen Parameter Fläche unter der Kurve und Kurvenhub, jedoch ist die Nachweisgrenze jetzt nach oben verschoben auf 1 µg/l. In Abbildung 4.25 ist zu sehen, daß für niedrigere Konzentrationen der Anstieg der Bindungskurven kaum beeinflußt wird, weshalb ein Abfall des Gesamtkurvenhubs nur einen geringen Effekt auf die Halbwertsbreite hat. Dies kann die Ursache für die zu höheren Konzentrationen verschobene Nachweisgrenze sein. Wie auch schon beim Parameter „Kurvenfläche“ ist die Reproduzierbarkeit für höhere Atrazin-Konzentrationen verbessert.

#### 4.3.4.1.2 Auswertung mit Hilfe der Differentiation

Die Größen aus dem Wendepunkt, die Lage des Wendepunkts sowie die Steigung im Wendepunkt, wurden aus der Ableitung der Bindungskurve ermittelt. Aufgrund des sog. Schichtdickenrauschens (Haake 2000) schwankten die einzelnen Werte der Ableitungen stark, weshalb die Bindungskurve zunächst geglättet wurden (Mittelwertbildung aus jeweils 11 Werten). Zwar wurde durch diese Glättung der Anfangsbereich des Auswertebereichs nicht genau beschrieben, bei höheren Zeitpunkten jedoch, bei denen der Wendepunkt erschien, wurde die Bindungskurve durch die Glättung kaum noch verfälscht.

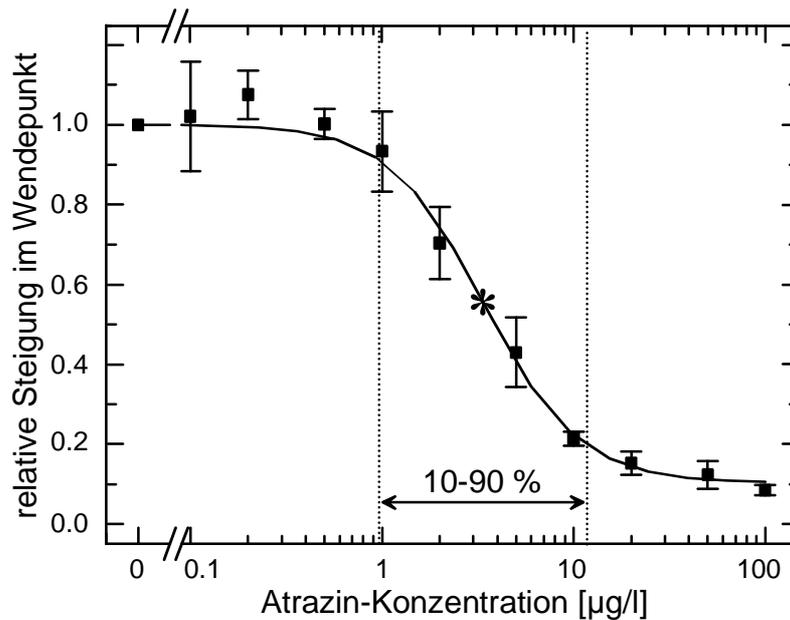


Abbildung 4.30: Auswerteparameter: Steigung im Wendepunkt der Bindungskurve;  
 (\*) = Testmittelpunkt.

In Abbildung 4.30 ist die Kalibrierkurve dargestellt, die man erhält, wenn man die Steigung im Wendepunkt auswertet. Dieser Parameter entspricht der Maximalkonzentration an freien Antikörperbindungsstellen. Er ermöglicht die Auswertung von 1 - 10 µg/l Atrazin, d. h. im mittleren Bereich des untersuchten Konzentrationsbereichs. Der Testmittelpunkt liegt bei 3.4 µg/ml. Für diesen Parameter werden signifikante Änderungen nur für solche Atrazin-Konzentrationen erwartet, die die Höhe der maximalen Antikörperkonzentration wesentlich beeinflussen.

Abbildung 4.31 zeigt die Kalibrierkurve, die man erhält, wenn man die Lage des Wendepunkts für die Auswertung heranzieht. Dieser Parameter gibt die zeitliche Lage der maximalen Antikörperkonzentration am Detektor wieder. Er ermöglicht ebenfalls nur die Auswertung von mittleren und höheren Atrazin-Konzentrationen, der 10 - 90 %-Arbeitsbereich geht von 3 - 30 µg/l, der Testmittelpunkt liegt bei 9.1 µg/l. Die Lage des Wendepunkts ist die einzige der bisher betrachteten Größen, die mit steigender Analytkonzentration ebenfalls ansteigt. Die Daten sind ziemlich fehlerbehaftet, was an der Auswertemethode liegen kann, die sich auf einen einzigen Punkt der ersten Ableitung der Bindungskurve bezieht. Dadurch könnte auch ein breiterer Auswertebereich verdeckt werden, der theoretisch den Nachweis von Konzentrationen bis 100 µg/l ermöglichen sollte.

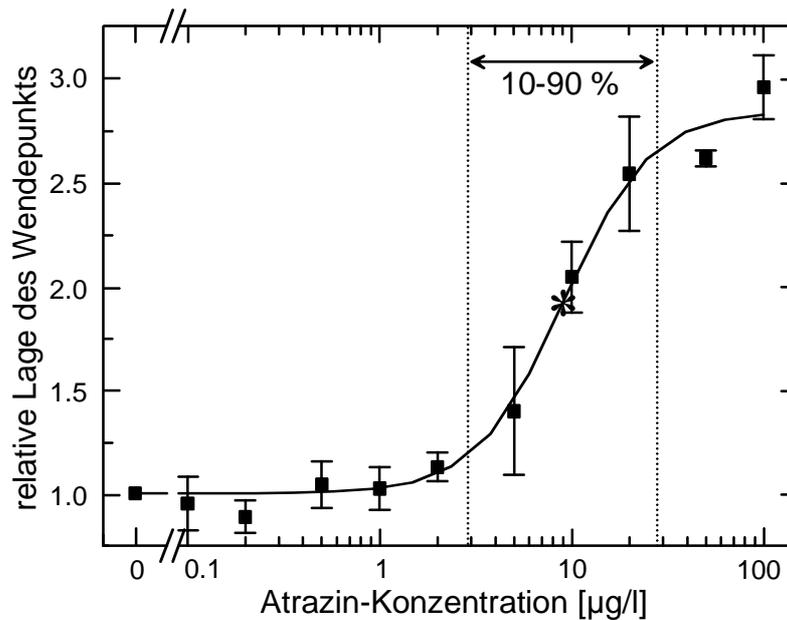


Abbildung 4.31: Auswerteparameter: Lage des Wendepunkts der Bindungskurve;

(\*) = Testmittelpunkt.

#### 4.3.4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der numerischen Auswertung

Es war mit keinem der ausgewerteten Parameter, der den Bindungskurven entnommen wurde, möglich, mit hoher Empfindlichkeit und guter Reproduzierbarkeit Konzentrationen über den ganzen getesteten Konzentrationsbereich auszuwerten. Außerdem wurden bei den meisten Parametern für viele Konzentrationen die Reproduzierbarkeit der Messungen, verglichen mit der Affinitätstitation, reduziert.

Die Lage des Testmittelpunkts, der 10 - 90 %-Arbeitsbereich, aber auch der Reproduzierbarkeit der einzelnen Parameter zeigten signifikante Unterschiede. Mit der Auswertung der Fläche unter der Bindungskurve sowie des Kurvenhubs wurde jeweils mit fast 2 Größenordnungen der größten Arbeitsbereich erhalten. Mit der Auswertung der Halbwertsbreite konnte ein mittlerer Arbeitsbereich von ca. 1.5 Größenordnungen erreicht werden. Der Arbeitsbereich bei Auswertung der Steigung im Wendepunkt sowie der Lage des Wendepunkts umfaßte jeweils lediglich eine Größenordnung.

Damit konnte jedoch für jeden Konzentrationsbereich wenigstens einer der Parameter mit guter Leistungsfähigkeit zur Konzentrationsauswertung herangezogen werden, weshalb eine kombinierte Auswertung der verschiedenen Parameter in Betracht gezogen wurde, um zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse zu kommen. Zur Kombination der verschiedenen Parameter kann entweder ein komplexes lineares Modell oder eine modellfreie Technik verwendet werden. Da mit multilinenaren Methoden (auch mit komplexen Modellen) kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte, wurde ein Neuronales Netz als eine nicht-lineare modellfreie Methode zur Auswertung herangezogen.

#### *4.3.4.1.4 Auswertung mit Neuronalem Netz*

Die verwendete Software basierte auf dem Stuttgarter Neuronale Netze Simulator (SNNS); das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben.

In die Eingabeschicht wurden als Proben für jede Konzentration die jeweiligen aus den numerischen Methoden erhaltenen Werte für Fläche, Kurvenhub, Halbwertsbreite, Steigung im Wendepunkt und Lage des Wendepunkts gegeben. Aufgrund der begrenzten Anzahl dieser Proben wurde ein Aufteilen der Daten in einen Trainings- und einen Testdatensatz vermieden und alle Daten für das Training des Neuronalen Netzes verwendet. Als Ausgabeschicht wurden die den Kurvenparametern zugrunde liegenden Atrazin-Konzentrationen erhalten.

Durch einen Pruning-Ansatz verringert sich die Anzahl der Neuronen und Verbindungen auf einen Wert, bei dem weitere Verringerung die Leistungsfähigkeit der Struktur herabsetzen würde. Damit wurden redundante und somit nicht relevante Informationen identifiziert und aus dem Netzwerk entfernt. Pruning wurde mit einem vollständig verbundenen Netzwerk mit 3 versteckten Einheiten in einer einzigen Schicht und Shortcuts begonnen (Abbildung 4.32). Wiederholte Pruning-Durchläufe resultierten aufgrund der heuristischen Natur dieses Prozesses in verschiedenen Topologien. Die Qualität des Neuronalen Netzes wurde deshalb zum einen durch die Korrelationskoeffizienten der Auftragung der vom Neuronalen Netz berechneten („predicted“) gegen die vorgegebenen („true“) Konzentrationen und zum anderen durch die Beobachtung der Konvergenz des Training-Prozesses, der in einer stabilen Lösung enden sollte, beurteilt,

Die optimierte Topologie mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten (0.999) besaß 8 Verbindungen und ist in Abbildung 4.32 graphisch dargestellt.

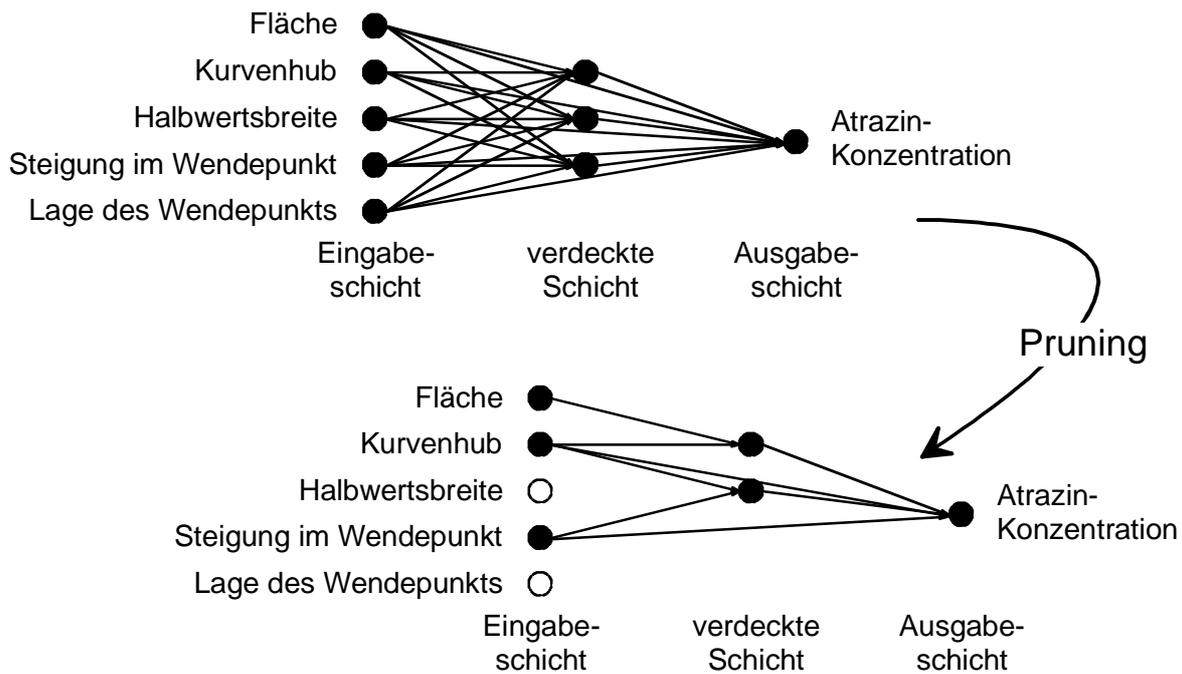


Abbildung 4.32: Topologien der Neuronalen Netze zu Beginn der Auswertung (oben) und nach Optimierung durch Pruning-Verfahren (unten).

Abbildung 4.32 zeigt, daß während des Prunings zwei der Eingabevariablen sowie eine signifikante Anzahl der Verbindungen aus dem Netzwerk entfernt wurden. Die verbleibende Zahl der Verbindungen ist mit 8 niedriger als 11, der Zahl der Proben, was nach (Lawrence *et al.* 1997) aussagt, daß ein Auswendiglernen des Netzes unwahrscheinlich ist. Die Berechnung der Atrazin-Konzentration basiert also letztendlich auf Kurvenhub und -fläche sowie der Steigung im Wendepunkt.

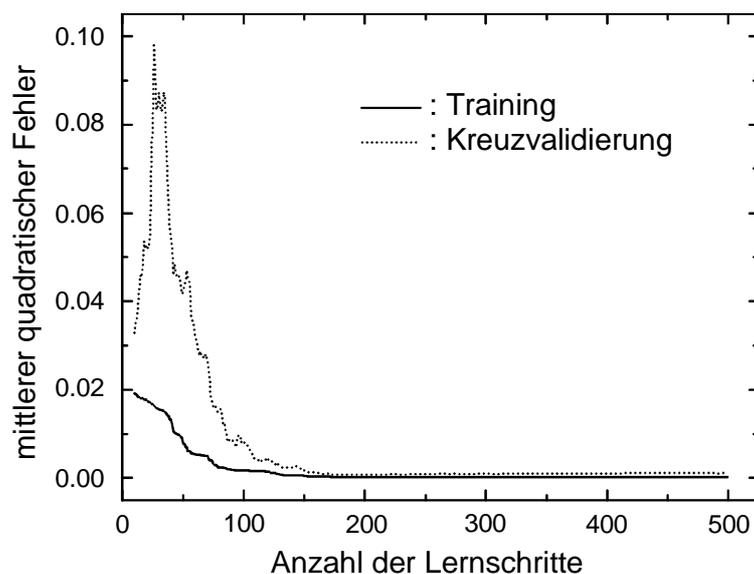


Abbildung 4.33: Konvergenz des Training-Prozesses.

In Abbildung 4.33 ist die Konvergenz des Trainingsprozesses des optimierten Netzes dargestellt. Die Lösung ist stabil. Zwar liegt die Kurve der Kreuzvalidierung leicht über der Trainings-Kurve, doch ist dies in diesem Ausmaß tolerabel (s. u.).

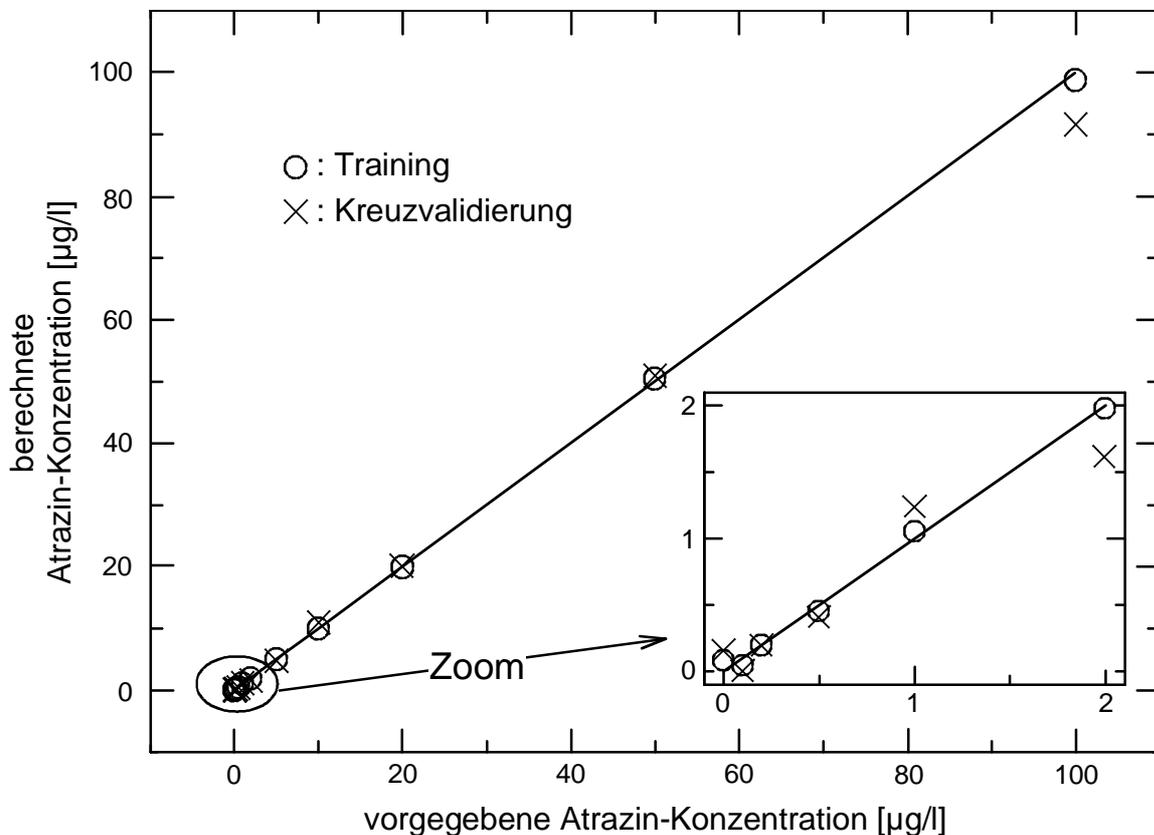


Abbildung 4.34: Auftragung der durch das neuronale Netz berechneten gegen die vorgegebenen Atrazin-Konzentrationen.

In Abbildung 4.34 ist die Auftragung der durch das neuronale Netz berechneten gegen die vorgegebenen Atrazin-Konzentrationen dargestellt („True-Predicted-Plot“). Da hier aufgrund der Linearität der Kalibriergeraden nicht der 10 - 90 %-Arbeitsbereich wie in den vorherigen Kalibrierkurven bestimmt werden kann, wurde als Kriterium die Abweichung zwischen vorgegebener Konzentration und Wert aus der Kreuzvalidierung gewählt. Der Arbeitsbereich sollte in dem Bereich liegen, in dem diese Abweichung weniger als 20 % beträgt und lag damit im Bereich 0.2 - 100 µg/l, d. h. der Arbeitsbereich wurde zu größeren Konzentrationen hin erweitert und die Nachweisgrenze sogar noch herabgesetzt. Durch die Kombination verschiedener Auswerteparameter waren nun auch die Fehler in den berechneten Werten vergleichbar denen des konventionellen Bindungshemmtests oder sogar kleiner.

Zur Abschätzung der Aussagekraft dieses Ergebnisses wurde das mit dem Pruning-Verfahren erhaltene Netzwerk (Abbildung 4.32) 50mal mit verschiedenen Gewichtungen trainiert. Die meisten der so erhaltenen Ergebnisse waren mit dem „True-Predicted-Plot“ aus Abbildung 4.34 vergleichbar, doch es wurden auch Abweichungen beobachtet. Der Median der Korrelationskoeffizienten aus diesen wiederholten Trainingsdurchgängen betrug 0.99.

#### 4.3.4.1.5 Zusammenfassung der Auswertemethoden

In nachfolgender Tabelle sind die einzelnen Testmittelpunkte und Arbeitsbereiche in  $\mu\text{g/l}$  Atrazin, die bei der Affinitätstitation sowie beim Gradientenansatz am System Atrazin/K4E7 erreicht wurden, zusammengefaßt.

<b>Auswertung der Affinitätstitation</b>		
	Testmittelpunkt [ $\mu\text{g/l}$ ]	10 - 90 % [ $\mu\text{g/l}$ ]
	1	0.5 - 2
<b>Auswertung des Gradientenansatzes</b>		
Parameter	Testmittelpunkt [ $\mu\text{g/l}$ ]	10 - 90 % [ $\mu\text{g/l}$ ]
Fläche unter der Kurve	2.5	0.5 - 20
Kurvenhub	3.5	0.5 - 20
Halbwertsbreite	5.7	1 - 30
Steigung im Wendepunkt	3.4	1 - 10
Lage des Wendepunkts	9.1	3 - 30
Neuronales Netz („alle“)	Arbeitsbereich 0.2 - 100 $\mu\text{g/l}$	

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Auswertungen bei den Bindungsassays für Atrazin/K4E7.

Die Auswertung nach dem Standardassay ergab einen 10 - 90 %-Arbeitsbereich unter einer Größenordnung. Mit den einzelnen Parametern des Gradientenansatzes konnten Arbeitsbereiche über eine bis nahezu zwei Größenordnungen zu höheren Konzentrationen hin erreicht werden, ohne Verlust der Nachweisgrenze bei niedrigeren Konzentrationen. Das Training eines Neuronalen Netzes mit den Parametern des Gradientenansatzes schließlich ergab ein Vorhersagemodell, in dem Konzentration und Rückantwort des Assays über einen Arbeitsbereich korrelierten, die nahezu ebenso groß war wie der vorgegebene Konzentrationsbe-

reich. Der Arbeitsbereich betrug jetzt 0.2 - 100  $\mu\text{g/l}$  und war so in beide Richtungen der Atrazin-Konzentration erweitert worden.

Obgleich die kleinen Fehlerwerte, die während der Kreuzvalidierung erhalten wurden, für die gute Qualität der Modellfunktion, die vom Neuronalen Netz gefunden wurde, sprechen, sollte für weitere Fragestellungen ein größerer Datensatz verwendet werden, der eine Aufspaltung in Trainings- und Testdatensatz ermöglicht.

### **4.3.5 Das System Desethylatrazin/K4E7**

Ziel der nächsten Messungen war, zu testen, ob obiger Gradientenansatz auch mit einem System geringerer Affinität gelingen würde. Dazu wurde das System Desethylatrazin/K4E7 gewählt: Der Antikörper und die Oberfläche blieben gleich, da die Transduceroberfläche weiterhin als Sonde für die noch freien Antikörper im Durchflußdetektor verwendet werden sollte. Die Messungen wurden analog Abschnitt 4.3.2 durchgeführt. Nach den Simulationsrechnungen in Abschnitt 2.3.3.2 wird hier der 90 %ige Umsatz rascher erreicht als beim System Atrazin/K4E7, vorausgesetzt, die geringere Affinität beruht allein auf einem größeren  $k_d$ -Wert, während  $k_a$  für beide Systeme gleich bleibt.

#### **4.3.5.1 Affinitätskonstante und Konzentrationsbestimmung**

Zunächst wurde die Affinitätskonstante der Reaktion in Lösung analog Abschnitt 4.2.2.1 bestimmt. Die Ausgangskonzentration an aktivem K4E7 betrug 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , die Desethylatrazin-Konzentrationen wurden zwischen 0 und 1000  $\mu\text{g/l}$  gewählt. Der lineare Bereich der Bindungskurven wurde mit Hilfe der linearen Regression ausgewertet, die normierten Steigungen gegen die Desethylatrazin-Konzentration als Kalibrierkurve aufgetragen.

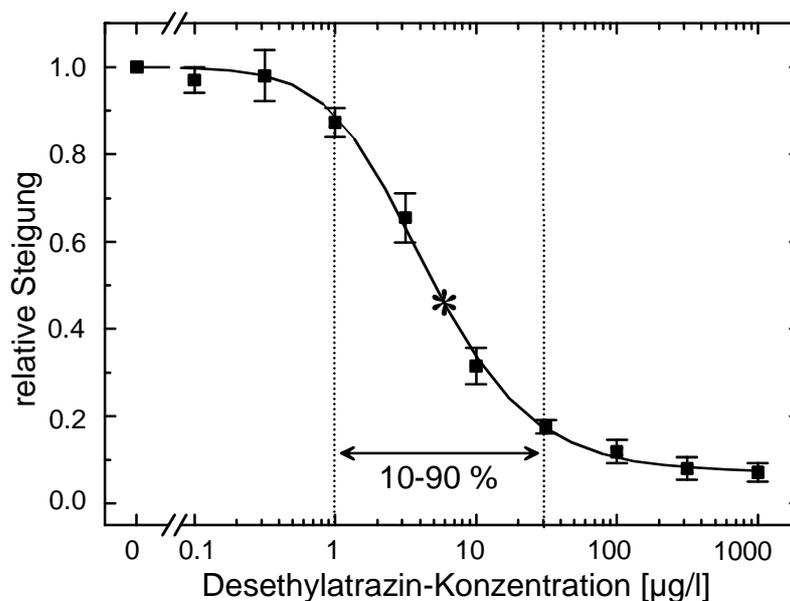


Abbildung 4.35: Affinitätskonstante des Systems Desethylatrazin/K4E7; (\*) = Testmittelpunkt.

In Abbildung 4.35 ist die Kalibrierkurve zur Berechnung der Affinitätskonstanten des Systems Desethylatrazin/K4E7 abgebildet. Es wurde durch Kurvenanpassung der Funktion „Bisect“ eine Affinitätskonstante  $K$  von  $(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  erhalten. Für die K4E7-Bindungsstellenkonzentration wurde  $(5.2 \pm 0.6) \text{ nM}$  berechnet, d. h.  $K \approx c_{0,Ak}$ , was sich darin äußert, daß die Standardabweichung 7 % bei  $K$  bzw. 12 % bei  $c_{0,Ak}$  betrug, d. h. beide Größen bestimmen die Lage der Kalibrierkurve.

Der 10 - 90 %-Arbeitsbereich lag bei 1 - 30 µg/ml und ist damit bei diesem System größer als eine Größenordnung. Dieses Verhalten wurde nach Abschnitt 2.3.3.1 aufgrund der niedrigeren Affinitätskonstanten erwartet. Der Testmittelpunkt lag bei 6 µg/l.

#### 4.3.5.2 Gradientenansatz

Mit dem Gradientenansatz sollte eine weitere Vergrößerung des Arbeitsbereichs erzielt werden. Wieder wurden sigmoide Bindungskurven erhalten. Die analog Abschnitt 4.3.4.1 durchgeführten Auswerteverfahren sind im folgenden aufgeführt. Für das Verhalten der Standardabweichungen und die Abhängigkeit der einzelnen Parameter gilt dasselbe wie in Abschnitt 4.3.4.1, sofern im folgenden nicht anders angemerkt.

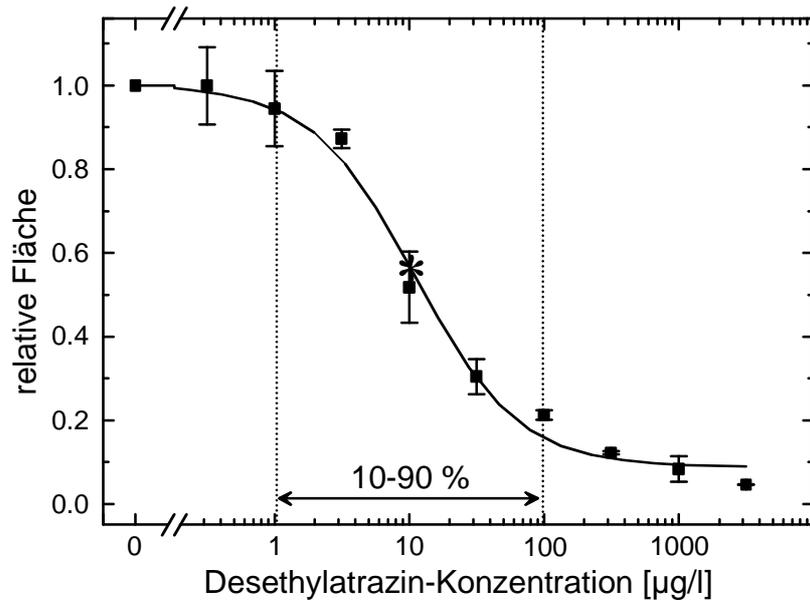


Abbildung 4.36: Auswerteparameter: Fläche unter der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

Abbildung 4.36 zeigt die Kalibrierkurve, die man bei Auswertung der Fläche unter der Bindungskurve erhält. Mit dieser Auswertung wird eine untere Nachweisgrenze von 1 µg/l Desethylatrazin wie bei der Affinitätstitration erreicht. Der Testmittelpunkt hat sich zu 10 µg/ml hin verschoben, der gesamte Arbeitsbereich geht nun von 1 - 100 µg/l und umfaßt 2 Größenordnungen, ohne daß die Nachweisgrenze zu höheren Werten verschoben wurde. Wieder sind im Bereich kleinerer Konzentrationen die Fehler größer, der Zusammenhang ist in Abschnitt 4.3.4.1.1 ausführlich erläutert.

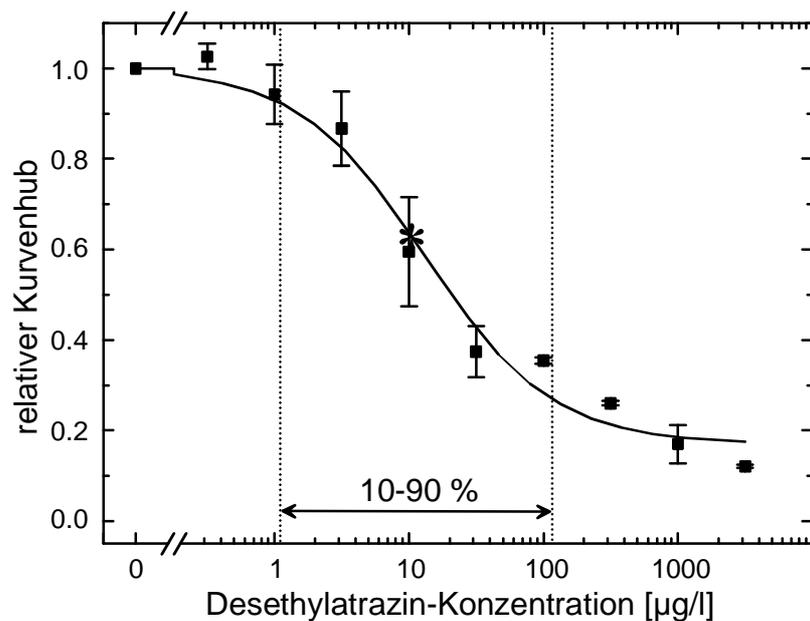


Abbildung 4.37: Auswerteparameter: Kurvenhub der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

In Abbildung 4.37 ist die Kalibrierkurve abgebildet, die man bei Auswertung des Kurvenhubs, d. h. der Differenz der Basislinien vor und nach der Injektionsphase, erhält. Der 10 - 90 %-Arbeitsbereich geht von ca. 1 - 100  $\mu\text{g/l}$ , der Testmittelpunkt liegt bei 11  $\mu\text{g/l}$ . Damit hat sich der Arbeitsbereich wieder zu höheren Konzentrationen hin erweitert, ohne an Nachweisgrenze zu verlieren. Er beträgt 2 Größenordnungen.

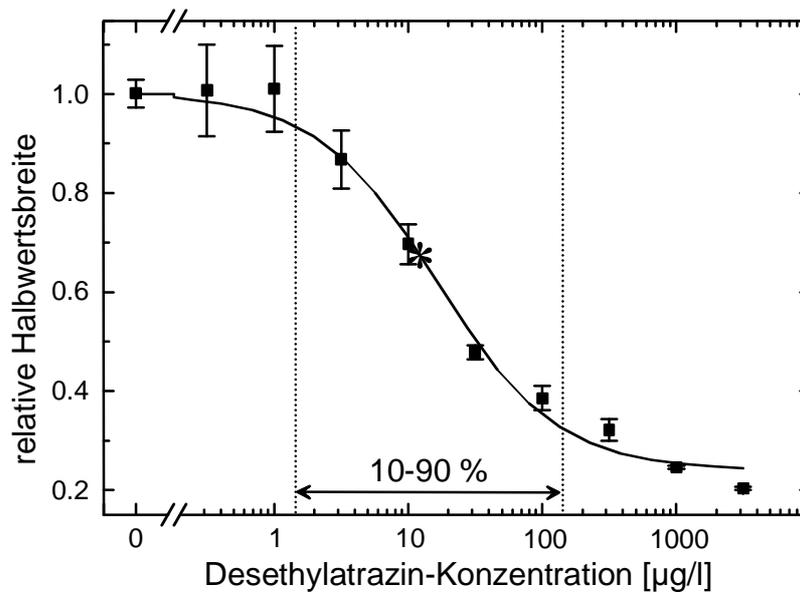


Abbildung 4.38: Auswerteparameter: Halbwertsbreite der Bindungskurve;

(\*) = Testmittelpunkt.

Abbildung 4.38 zeigt die Kalibrierkurve, die man beim Auswerten der Halbwertsbreite erhält. Dieser Parameter ermöglicht die Auswertung von Desethylatrazin-Konzentrationen ab 1,3  $\mu\text{g/l}$ . Der Testmittelpunkt liegt bei 16  $\mu\text{g/l}$ , der Arbeitsbereich geht bis 130  $\mu\text{g/l}$ . Im Vergleich zu den Arbeitsbereichen, die durch Auswertung von Fläche unter der Kurve und Kurvenhub erhalten wurden, ist der Arbeitsbereich zwar wie in Abschnitt 4.3.4.1.1 zu höheren Antigenkonzentrationen hin verschoben, doch ist diese Verschiebung zum einen weniger ausgeprägt und zum anderen beträgt der Arbeitsbereich weiterhin 2 Größenordnungen, d. h. die Verschiebung ging nicht, wie beim hochaffinen Antikörper, mit einer Verkleinerung des Arbeitsbereichs einher.

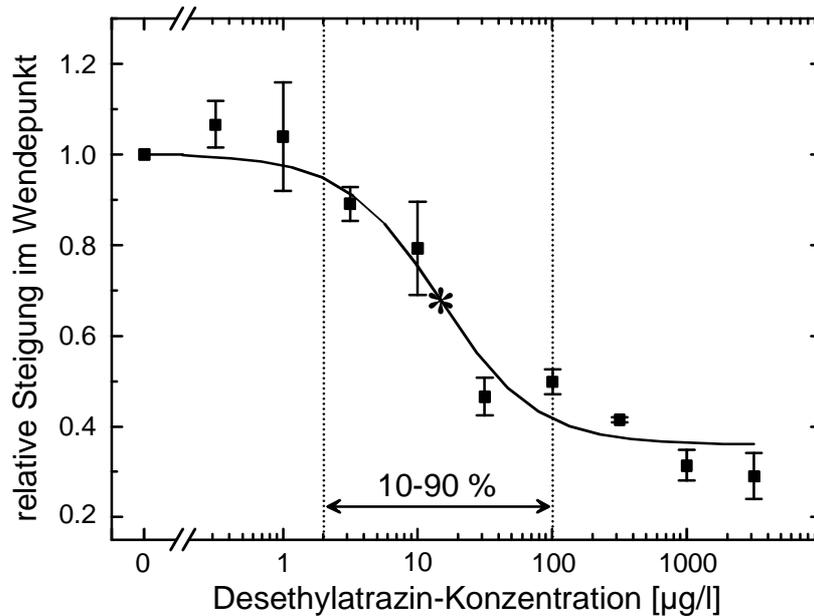


Abbildung 4.39: Auswerteparameter: Steigung im Wendepunkt der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

In Abbildung 4.39 ist die Kalibrierkurve dargestellt, die man erhält, wenn man die Steigung im Wendepunkt auswertet. Dieser Parameter ermöglicht die Auswertung von 2 - 100 µg/l Desethylatrazin, der Testmittelpunkt liegt bei 15 µg/l. Der Arbeitsbereich beträgt nun weniger als 2 Größenordnungen, allerdings schwanken die Werte sehr stark und werden durch die Kalibrierkurve nicht vollständig beschrieben.

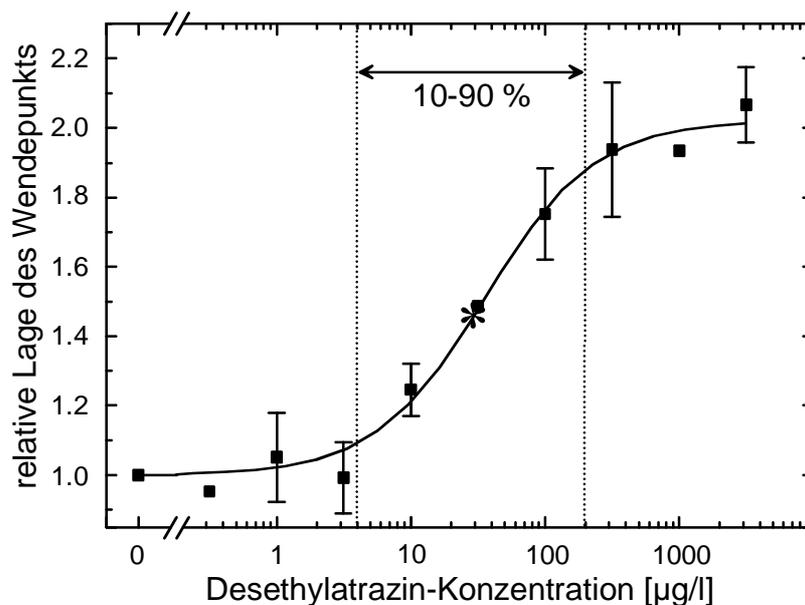


Abbildung 4.40: Auswerteparameter: Lage des Wendepunkts der Bindungskurve; (\*) = Testmittelpunkt.

Abbildung 4.40 zeigt die Kalibrierkurve, die man erhält, wenn man die Lage des Wendepunkts für die Auswertung heranzieht. Es wird die Auswertung innerhalb des Arbeitsbereichs von 4 - 200  $\mu\text{g/l}$  ermöglicht, der Testmittelpunkt liegt bei 36  $\mu\text{g/l}$ . Wie schon in Abschnitt 4.3.4.1.2 erläutert, ist dies der einzige der ausgewerteten Kurvenparameter, der bei höheren Analytkonzentrationen zunimmt.

Wieder konnte allein durch Anwendung des Gradientenansatzes der Arbeitsbereich zu höheren Analytkonzentrationen hin vergrößert werden, ohne daß die Nachweisgrenze bei allen angewandten Auswerteverfahren schlechter wurde. Die einzelnen Kurvenparameter waren wieder unterschiedlich im Bereich ihres Ansprechverhaltens. Die Tendenz der Lage der Arbeitsbereiche der einzelnen Parameter war gleich der der Parameter in Abschnitt 4.3.4.1.1, jedoch sind die Unterschiede hier nicht so ausgeprägt. Das liegt möglicherweise daran, daß sich das Gleichgewicht aufgrund der höheren Dissoziationskonstanten schneller einstellt. Wie in Abschnitt 2.3.2.3.3 ermittelt, kann bei gleichbleibender Assoziationsgeschwindigkeitskonstante allein der Unterschied der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten zu einer anderen Affinitätskonstanten führen.

Beim Vergleich der in Abschnitt 4.3.4.1.1 erhaltenen Kalibrierkurven mit denen der entsprechenden Kurvenparameter in diesem Abschnitt fällt beim System Desethylatrazin/K4E7 ein höherer „Offset“ auf. Bei der Affinitätstitation (Abschnitt 4.2.2.1 bzw. 4.3.5.1) war dieser Unterschied noch nicht so ausgeprägt. Dies würde für eine höhere Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Systems Desethylatrazin/K4E7 gegenüber dem System Atrazin/K4E7 sprechen und damit obige Vermutungen bestätigen.

Auch beim System Desethylatrazin/K4E7 sollte durch Einsatz eines Neuronalen Netzes der Arbeitsbereich noch weiter ausgedehnt werden. Es wurde analog Abschnitt 4.3.4.1.4 vorgegangen. Mit denselben Einstellungen wurden wieder die besten Netze ausgewählt, jedoch wurden diesmal andere Kurvenparameter als diejenigen mit dem größten Informationsgehalt herangezogen. Am häufigsten waren Netze, die nur die Parameter Fläche und Halbwertsbreite zur Auswertung heranzogen, das mit dem besten Korrelationskoeffizienten ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

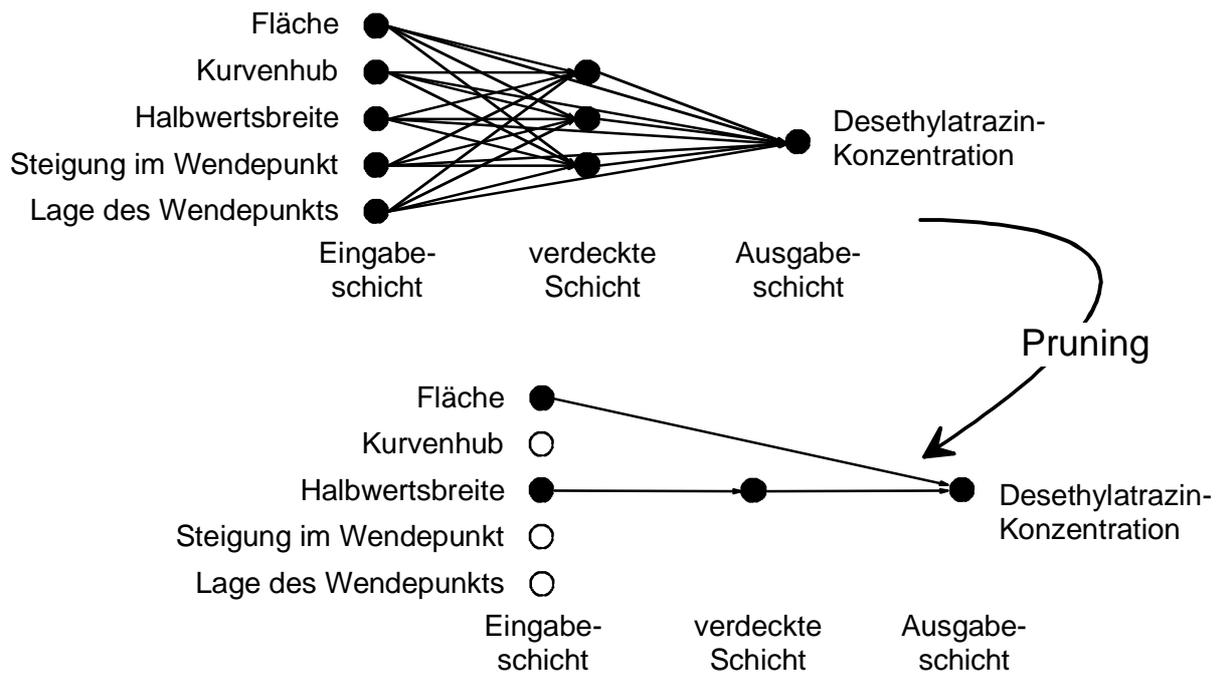


Abbildung 4.41: Topologien der Neuronalen Netze zu Beginn der Auswertung (oben) und nach Optimierung durch Pruning-Verfahren (unten).

Abbildung 4.41 zeigt, daß nun während des Prunings sogar 3 der Eingabevariablen und eine signifikante Anzahl der Verbindungen aus dem Netzwerk entfernt wurden. Die „Endanzahl“ der Verbindungen ist mit 3 beträchtlich niedriger als 10, die Anzahl der Proben, was wieder gegen ein Auswendiglernen des Netzes spricht (Lawrence *et al.* 1997). Die Berechnung der Desethylatrazin-Konzentration basiert also letztendlich auf Kurvenfläche sowie Halbwertsbreite. Den Parametern Kurvenfläche und Kurvenhub kann man schon allein von der numerischen Auswertung her den gleichen Informationsgehalt entnehmen. Insofern ist es eher nachzuvollziehen, daß nur einer dieser Parameter für das Netz herangezogen wird. Dagegen beinhaltet nun die Halbwertsbreite, die vorher ausschied, für die Auswertung wichtige Informationen, während Steigung im Wendepunkt sowie Lage des Wendepunkts wegfallen.

In Abbildung 4.42 ist die Konvergenz des Trainingsprozesses des optimierten Netzes dargestellt. Die Lösung ist stabil. Zwar liegt die Kurve der Kreuzvalidierung über der Trainings-Kurve, doch ist das in diesem Ausmaß tolerabel (vgl. Abschnitt 4.3.4.1.4): Verglichen mit der Konvergenz des Trainingsprozesses beim System Atrazin/K4E7 (Abbildung 4.33) ist die des Systems Desethylatrazin/K4E7 unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Skalierung nur geringfügig schlechter.

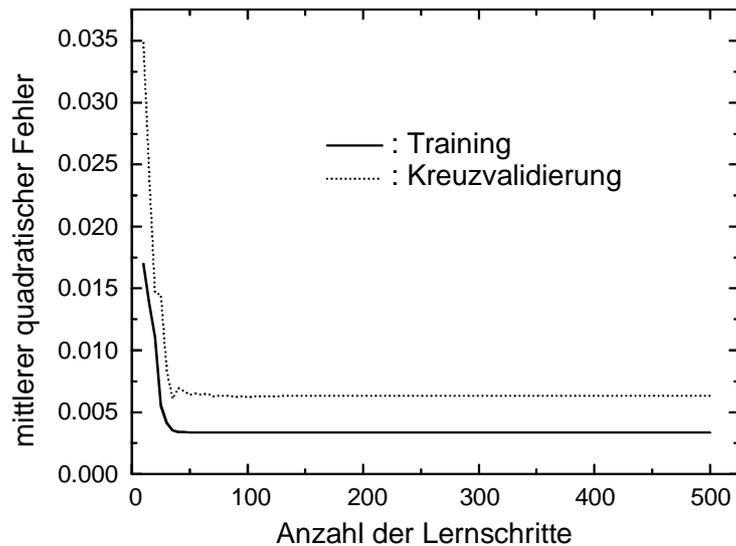


Abbildung 4.42: Konvergenz des Training-Prozesses.

In Abbildung 4.43 ist die Auftragung der durch das neuronale Netz berechneten gegen die vorgegebenen Desethylatrazin-Konzentrationen dargestellt („True-Predicted-Plot“).

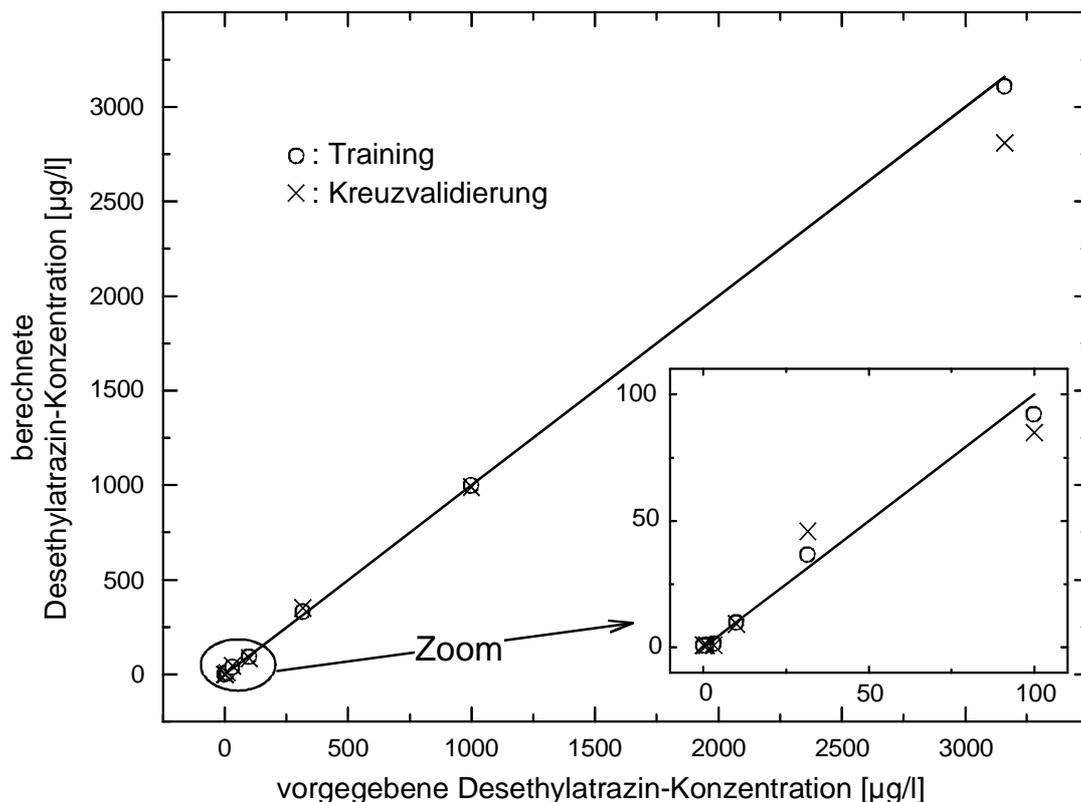


Abbildung 4.43: Auftragung der durch das neuronale Netz berechneten gegen die vorgegebenen Desethylatrazin-Konzentrationen.

Als Kriterium für den Arbeitsbereich wurde wie schon zuvor (Abschnitt 4.3.4.1.4) der Bereich gewählt, in dem die Abweichung zwischen vorgegebener

Konzentration und Wert aus der Kreuzvalidierung weniger als 20 % betrug. Damit lag dieser Bereich zwischen 1 und 3160  $\mu\text{g/l}$ , d. h. er wurde zu größeren Konzentrationen hin erweitert, ohne daß die Nachweisgrenze verschlechtert wurde. Die Erweiterung zu niedrigeren Konzentrationen gelang hier zunächst nicht. Weitere Bindungsassays mit mehr Proben im Bereich niedrigerer Desethylatrazin-Konzentrationen könnten auch zu einer Erweiterung des Arbeitsbereichs in diesen Konzentrationsbereich führen. Allerdings wird diese Erweiterung durch die niedrigere Affinitätskonstante des Systems eingeschränkt. Sie führt dazu, daß sich bei geringen Konzentrationsänderungen im Bereich niedriger Analytkonzentrationen die Gleichgewichtslage nur wenig ändert. Damit sind auch die Änderungen in der Gleichgewichtskonzentration der freien Antikörper nur gering, so daß die dadurch hervorgerufenen Signaländerungen aufgrund des sog. Schichtdickenrauschens (Haake 2000) nicht mehr nachgewiesen werden können.

Durch die Kombination verschiedener Auswerteparameter waren nun auch die Fehler in den berechneten Werten vergleichbar denen des konventionellen Bindungshemmtests oder sogar kleiner. Zur Abschätzung der Aussagekraft dieses Ergebnisses wurde auch dieses mit dem Pruning-Verfahren erhaltene Netzwerk (Abbildung 4.43) 50mal mit verschiedenen Gewichtungen trainiert. Die meisten der so erhaltenen Ergebnisse waren mit dem „True-Predicted-Plot“ aus Abbildung 4.34 vergleichbar, doch es wurden auch Abweichungen beobachtet. Der Median der Korrelationskoeffizienten aus diesen wiederholten Trainingsdurchgängen betrug 0.999 und lag damit sogar über dem beim System Atrazin/K4E7. Allerdings waren hier noch weniger Samples und noch weniger Verbindungen gegeben, d. h. das Netz war sehr klein und insofern ist es fraglich, ob in diesem Fall eine Kombination von Auswerteparametern tatsächlich zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens beiträgt.

Man kann demnach nicht von vornherein für alle Antigen/Antikörper-Systeme die für das Neuronale Netz wichtigen Parameter aussuchen und nur noch diese auswerten, sondern muß erst alle ermitteln und kann dann mit Hilfe des Prunings entscheiden, welche Parameter für dieses System wichtig sind.

In nachfolgender Tabelle sind die einzelnen Testmittelpunkte und Arbeitsbereiche in  $\mu\text{g/l}$  Desethylatrazin, die bei der Affinitätstitration sowie beim Gradientenansatz am System Desethylatrazin/K4E7 erreicht wurden, zusammengefaßt.

<b>Auswertung der Affinitätstitation</b>		
	Testmittelpunkt [ $\mu\text{g/l}$ ]	10 - 90 % [ $\mu\text{g/l}$ ]
	6	1 - 30
<b>Auswertung des Gradientenansatzes</b>		
Parameter	Testmittelpunkt [ $\mu\text{g/l}$ ]	10 - 90 % [ $\mu\text{g/l}$ ]
Fläche unter der Kurve	10	1 - 100
Kurvenhub	11	1 - 100
Halbwertsbreite	16	1.3 - 130
Steigung im Wendepunkt	15	2 - 100
Lage des Wendepunkts	36	4 - 200
Neuronales Netz („alle“)	Arbeitsbereich 1 - 3160 $\mu\text{g/l}$	

*Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Auswertungen bei den Bindungsassays für Desethylatrazin /K4E7.*

Die Auswertung nach dem Standardassay ergab einen 10 - 90 %-Arbeitsbereich knapp über einer Größenordnung. Mit den einzelnen Parametern des Gradientenansatzes konnten Arbeitsbereiche bis zu zwei Größenordnungen zu höheren Konzentrationen hin erreicht werden, z. T. ohne Verlust der Nachweisgrenze bei niedrigeren Konzentrationen. Das Training eines Neuronalen Netzes mit den Parametern des Gradientenansatzes schließlich ergab ein Vorhersagemodell, in dem Konzentration und die „Resonanz“ des Assays über einen Arbeitsbereich korrelierten, die nahezu ebenso groß war wie der vorgegebene Konzentrationsbereich. Der Arbeitsbereich betrug jetzt 1 - 3160  $\mu\text{g/l}$  und war so in Richtungen höherer Desethylatrazin-Konzentrationen hin erweitert worden.

Ogleich die kleinen Fehlerwerte, die während der Kreuzvalidierung erhalten wurden, für die gute Qualität der Kalibrierfunktion, die vom Neuronalen Netz gefunden wurde, sprechen, sollte auch hier für weitere Fragestellungen ein größerer Datensatz verwendet werden, der eine Aufspaltung in Trainings- und Testdatensatz ermöglicht.

## 4.4 Quantifizierung der Adsorption von Proteinen auf TiO<sub>2</sub>-Oberflächen ohne und mit kovalent gebundenen Proteinen

Die Adsorption von Proteinen auf unmodifizierten und die auf biofunktionalisierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen wurden untersucht und miteinander verglichen.

### 4.4.1 Flußprofil und Auswertung der Bindungskurve

Zwar liegt später im Mund kein ständiger Fluß sondern eine eher statische Umgebung um das eingepflanzte Implantat vor, doch besteht bei einer Messung im Stopped-Flow-Aufbau die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse durch Sedimentation der Proteine. Außerdem könnte so eine Messung beliebig lange dauern, Ziel war aber eine schnelle Beurteilung der Schichten und damit eine kurze Meßzeit. Desweiteren ermöglicht die Arbeit im FIA-System zusätzlich die gesonderte Beobachtung der Dissoziation der adsorbierten Proteine.

Es wurde ein Fließschema analog zu dem in Abschnitt 4.2.1 eingesetzt, damit eine möglichst lange Zeit die maximale Konzentration an Protein über den Transducer geleitet wird.

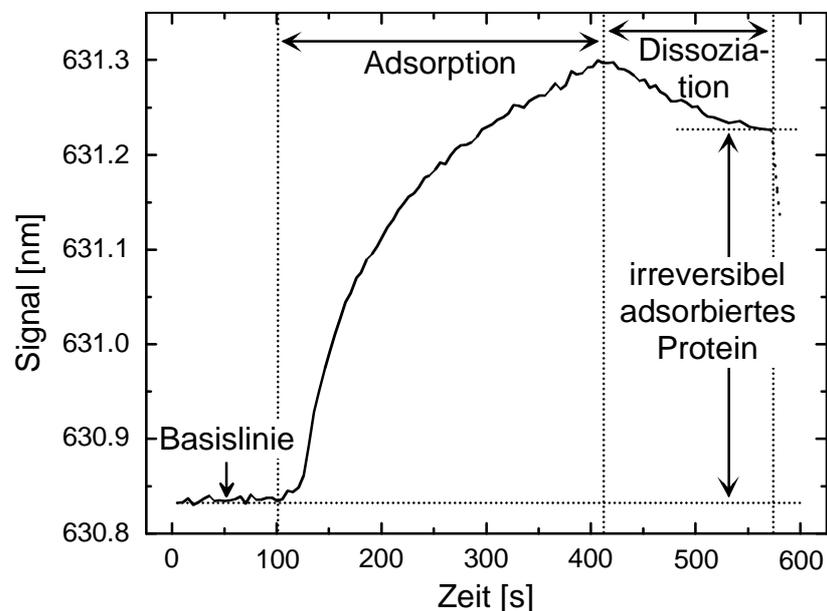


Abbildung 4.44: Bindungskurve für die Adsorption von 1 mg/ml BSA auf TiO<sub>2</sub>.

Abbildung 4.44 zeigt exemplarisch die Bindungskurve für die Adsorption einer 1 mg/ml BSA-Probe auf einer unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberfläche. Die Bindungskurven von BSA auf modifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen sahen vergleichbar aus.

Die Injektion der Proteinlösung wird durch Einsetzen der Spülphase (nach ca. 420 s) abgebrochen. Zu dieser Zeit ist meist das Adsorptions-/Dissoziations-Gleichgewicht noch nicht erreicht, d. h. bei ausreichender Probenmenge würde die Signalverschiebung weiter zunehmen. Bei unterschiedlich schneller Einstellung des Adsorptions-/Dissoziations-Gleichgewichts würden so in gleichen Zeiträumen unterschiedliche Gleichgewichtslagen ausgewertet werden, ohne die Gesamt-Proteinadsorption zu ermitteln, da der Zeitraum zu kurz ist. Damit statt dessen bei den Proteinadsorptionen auf den verschiedenen modifizierten Oberflächen eine vergleichbare Auswertung getroffen werden kann, ohne Berücksichtigung der momentanen Gleichgewichtslage, wurde als Maß für die Proteinadsorption die Signalverschiebung zwischen der Basislinie vor der Proteinadsorption und der Basislinie nach dem Spülvorgang (Dissoziation) gewählt. Die Zeit des Spülens war ausreichend lang, so daß die Lage des Extremums danach als Maß für das irreversibel gebundene Protein angesehen werden konnte. Damit sollte dieser Bindungszustand eine vergleichbare Größe für alle Proteinadsorptionen auf allen Schichtmodifikationen sein.

Die Schwierigkeit bei der Berechnung der physikalischen Schichtdicke der adsorbierten Proteine ist die Tatsache, daß die TiO<sub>2</sub>-Schicht einen höheren Brechungsindex als die Schicht der adsorbierten Proteine hatte. Damit mußte die Schichtdicke mit Hilfe eines Zweischichtsystem-Modells berechnet werden, das in (Abschnitt 2.2.2.3, Gleichungen (15) und (16)) beschrieben ist. Die Schichtdicken konnten damit auf 100 pm genau berechnet werden, Signaländerungen < 50 pm konnten nicht ausgewertet werden.

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung ohne die umständliche Berechnung aus dem Mehrschichtsystem-Modell in Anspruch zu nehmen, ist das Bilden des Verhältnisses aus Höhe des Signals bei irreversibler Bindung der Proteine zu Höhe des Signals bei maximaler Bindung. Dieses Verhältnis gibt das Ausmaß für die Dissoziation an: Je größer es ist, umso weniger wird wieder heruntergespült, d. h. umso geringer ausgeprägt ist die Dissoziation. Zwar verfälschen auch hier nicht vollständig eingestellte Gleichgewichtslagen das Ergebnis, doch genügen die erhaltenen Werte für den Vergleich des unterschiedlichen Dissoziationsverhaltens.

#### 4.4.2 Kontrolle und Regeneration der Oberflächen

Die Laminin- die EGF- und die (Laminin + EGF)-Oberflächen wurden mit Antikörpern gegen Laminin bzw. EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) überprüft. Dazu wurde die Bindung dieser Antikörper auf den modifizierten  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen zeitaufgelöst mit RIfS (Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie) verfolgt und anhand des Aussehens der Bindungskurven die Spezifität der Bindung und damit der Erfolg der Modifikation beurteilt.

Auf eine Regeneration der Schichten wurde verzichtet. Durch die Modifikation der Schichten mit Aktivester (Abschnitt 3.2.1.4) sind diese relativ empfindlich gegen Regenerationslösungen. Da nicht gewährleistet werden kann, daß die Schichten nach der Regeneration wieder im selben Zustand wie vor der Proteinadsorption vorliegen, wurde darauf verzichtet und jeder modifizierte  $\text{TiO}_2$ -beschichtete Glasträger nur einmal für einen Bindungsassay mit einer Proteinlösung verwendet.

Es wurde auch festgestellt, daß beim Versuch, die unmodifizierten  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen mehrmals zu verwenden, die Regeneration mit Piranha die Schichten abhängig von der Einwirkungsdauer unterschiedlich veränderte. Diese Veränderungen gingen so weit, daß teilweise keine Proteine mehr auf  $\text{TiO}_2$  adsorbierten, obwohl dies zuvor noch der Fall war. Da dieses Verhalten auch anderweitig schon beobachtet worden war (Thull 1994), wurden die  $\text{TiO}_2$ -Schichten wenige Tage nach dem Aufdampfen ohne zusätzlichen Reinigungsschritt verwendet, und ebenfalls nur einmal für einen Bindungsassay mit einer Proteinlösung eingesetzt.

#### 4.4.3 BSA auf $\text{TiO}_2$ und modifizierten $\text{TiO}_2$ -Schichten

Als preisgünstiges Modellprotein für die Proteinadsorptionen wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Der Vergleich mit späteren Speichelmessungen sollte zeigen, ob es schon mit diesem leicht zugänglichen Protein, mit dem reproduzierbar Lösungen hergestellt werden können, möglich ist, Vorhersagen über das Adsorptionsverhalten von Proteinen allgemein zu treffen. Neben unmodifizierten  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen und Oberflächen mit kovalent gekoppeltem Laminin und/oder EGF wurden auch Oberflächen untersucht, auf denen ledig-

lich Dicarboxy-Polyethylenglycol (DC-PEG) immobilisiert war. Dies diente vor allem zur Kontrolle der darauf aufbauenden Oberflächenmodifikation.

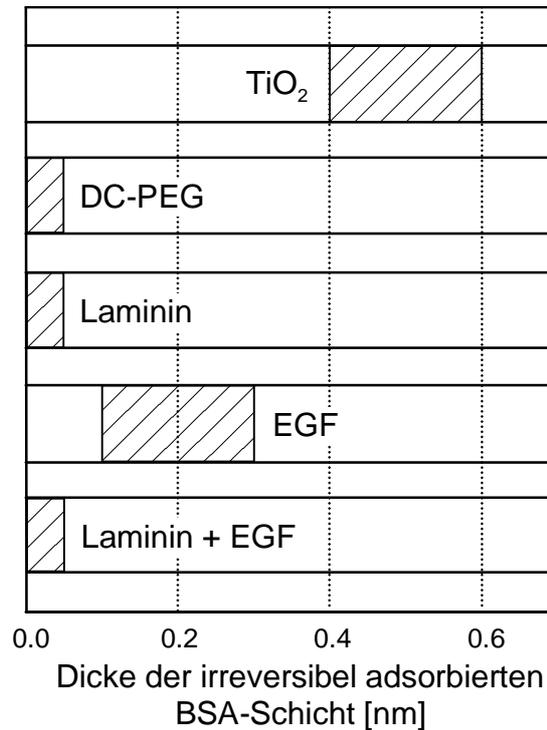


Abbildung 4.45: Adsorption von 1 mg/ml BSA auf modifizierten und unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen; schraffiert: Bereiche der erhaltenen Schichtdicken.

Abbildung 4.45 zeigt die Schichtdickenzunahmen, die bei der Adsorption von BSA auf modifizierten und unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Schichten erhalten wurden. Die Adsorptionen auf einer Oberflächenart unterschieden sich von Charge zu Charge. Innerhalb einer Charge blieben die Tendenzen innerhalb der Oberflächen gleich. Daher sind in Abbildung 4.45 die Bereiche der erhaltenen Schichtdicken anstelle eines Mittelwerts aller Schichtdicken mit Standardabweichung angegeben.

Die größte Menge wird auf unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen abgeschieden. Auch auf den mit EGF modifizierten Schichten ist eine Adsorption erkennbar. Bei DC-PEG-Oberflächen ist kein Effekt durch Proteinadsorption erkennbar, da Effekte unter 50 pm nicht ausgewertet werden konnten. Dies wurde erwartet, schließlich ist dies einer der Spacer, der unspezifische Adsorptionen bei heterogenen Immunoassays verhindern soll. Allerdings wurden auch bei Laminin- und (Laminin + EGF)-Oberflächen keine Effekte festgestellt. Die niedrige Laminin-Konzentration der käuflichen Lösung sowie deren Salzgehalt (Abschnitt 3.2.1.4) wären mögliche Ursachen für die unvollständige Modifikation der

Oberfläche. Mit Hilfe der spezifischen Bindung von Antikörpern gegen Laminin könnte jedoch nachgewiesen werden, daß auf der Oberfläche Laminin gebunden war. Dies war auch bei den (Laminin + EGF)-Oberflächen der Fall: Sowohl anti-Laminin als auch anti-EGF zeigten spezifische Bindung. Hier konnte die geringe EGF-Konzentration bei der Modifikation (Abschnitt 3.2.1.4) Ursache für eine geringere Oberflächendichte an EGF als bei der reinen EGF-Oberfläche sein, weshalb der Proteinadsorption-fördernde Effekt des EGF hier nicht zum Tragen kam. Diese Konzentration wurde gewählt, um äquimolare Konzentrationen von EGF und Laminin einzusetzen, da bei der Modifikation keines der Proteine bevorzugt gegenüber dem anderen sein sollte.

Auf Kinetik-Messungen wurde hier verzichtet, da das BSA nur als Modell-Protein dienen sollte und als solches zunächst im menschlichen Körper ohnehin nicht vorkommt. Es wurde jedoch vergleichend gegenübergestellt, ob man bei den Oberflächen, bei denen man eine meßbare Adsorption von BSA auf der Oberfläche bestimmen konnte, einen Unterschied im Ausmaß der Dissoziation erkennen konnte. Dazu wurde das Verhältnis aus Signal bei irreversibler Proteinadsorption zu Signal bei maximaler Proteinadsorption gebildet. Für die reine  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche betrug die Schichtdicke des irreversibel bindenden Proteins ( $84 \pm 3$ ) % der maximal adsorbierten Proteine, d. h. der größte Teil des BSAs, der auf der Schicht adsorbierte, wurde nicht wieder abgespült. Für die mit EGF modifizierte Oberfläche wurde nach Spülen eine Abnahme auf ( $74 \pm 13$ ) % des maximalen Werts erhalten. Dieser Werte liegt unter dem, der bei der unmodifizierten Oberfläche erhalten wurde, doch ist diese Aussage durch die hohe Standardabweichung eingeschränkt.

#### **4.4.4 Speichel auf $\text{TiO}_2$ und modifizierten $\text{TiO}_2$ -Schichten**

Im menschlichen Speichel sind außer Albuminen weitere Proteine zu finden (König 1987). Daher wurden analog Abschnitt 4.4.3 modifizierte  $\text{TiO}_2$ -beschichtete Glasträger zusätzlich für Bindungsassays mit Speichel eingesetzt. Die Speichelproben waren steril filtriert, portioniert, eingefroren und wurden erst direkt vor Verwendung aufgetaut.

Für die Adsorption von Speichel auf diesen Oberflächen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

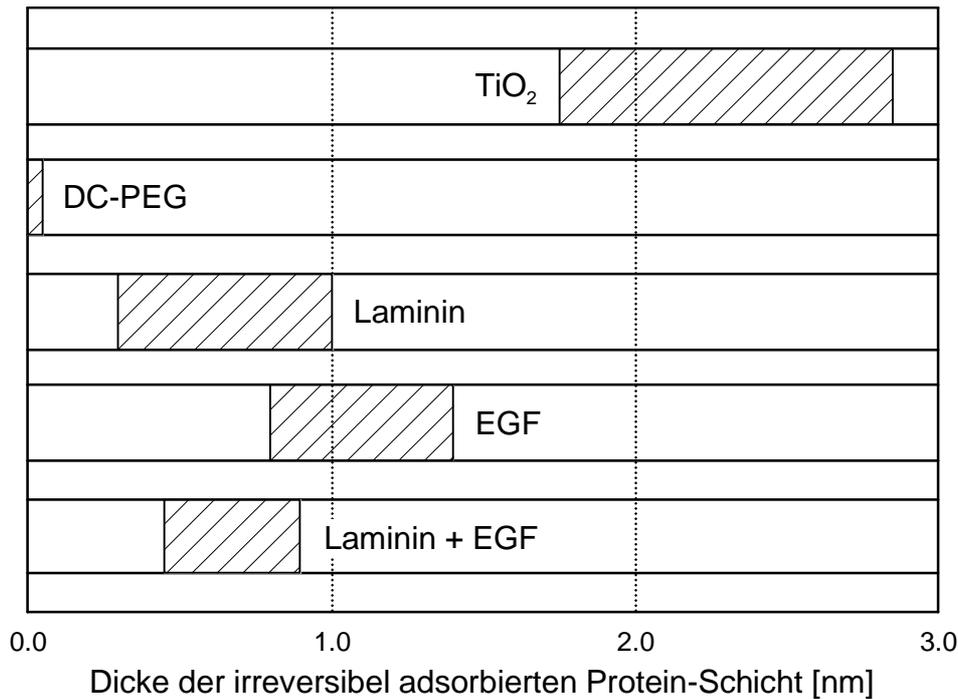


Abbildung 4.46: Adsorption von Speichelproteinen auf modifizierten und unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen; schraffiert: Bereiche der erhaltenen Schichtdicken.

Abbildung 4.46 zeigt analog Abbildung 4.45 Bereiche der Schichtdicken, die durch Adsorption von Speichelproteinen auf modifizierten und unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen erhalten wurden. Wieder ist auf der unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberfläche die meiste Adsorption zu erkennen. Sie ist ungefähr doppelt so hoch wie die auf der nächsten Beschichtung. Auf den mit DC-PEG modifizierten Schichten wurde nichts abgeschieden, d. h. der wirksame Schutz dieser Oberfläche gegen unspezifische Wechselwirkung konnte erneut nachgewiesen werden. Auf den EGF-Oberflächen wurden ebenfalls Proteine abgeschieden, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie auf unmodifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen. Auf Laminin-Oberflächen wurden nun auch Proteine abgeschieden, zwar weniger als auf den EGF-Oberflächen, aber der Effekt war deutlich erkennbar.

Die Oberflächen, die mit Laminin und EGF beschichtet waren, zeigten wie schon zuvor in Abschnitt 4.4.2 das gleiche Verhalten wie die ausschließlich mit Laminin beschichteten Oberflächen. Damit konnte das EGF in der eingesetzten Konzentration wieder keinen ebenso großen Effekt wie auf der reinen EGF-Oberfläche, bei deren Modifikation EGF in höherer Konzentration eingesetzt wurde, hervorrufen. Messungen mit anti-EGF ließen zwar spezifische Bindung der Antikörper auf der (Laminin + EGF)-Oberfläche erkennen, allerdings besteht hier die Möglichkeit, daß das EGF, das mit  $MG = 6\ 045$  g/mol viel kleiner

war als das Laminin mit  $MG = 850\,000$  g/mol, durch dieses auf der Oberfläche so abgedeckt wurde, daß die Proteine vor allem die Laminin-Strukturen erkannten. Auch eine spezifisch erscheinende Bindung von EGF-Antikörpern an einige Laminin-Strukturen konnte nicht ausgeschlossen werden, da die Spezifität der Bindung lediglich durch lineares Verhalten der Bindungskurve überprüft werden konnte. Zur Inhibierung der Antikörper war nicht genügend Substanz vorhanden.

Auf Kinetik-Messungen wurde verzichtet, da aufgrund der verschiedenen im Speichel vorhandenen Proteine ohnehin nur mittlere Geschwindigkeitskonstanten für mittlere Konzentrationen bestimmt werden könnten. Doch wurde auch hier das Ausmaß der Dissoziation der Proteine durch Vergleich der Verschiebungsverhältnisse vor und nach der Spülphase berechnet.

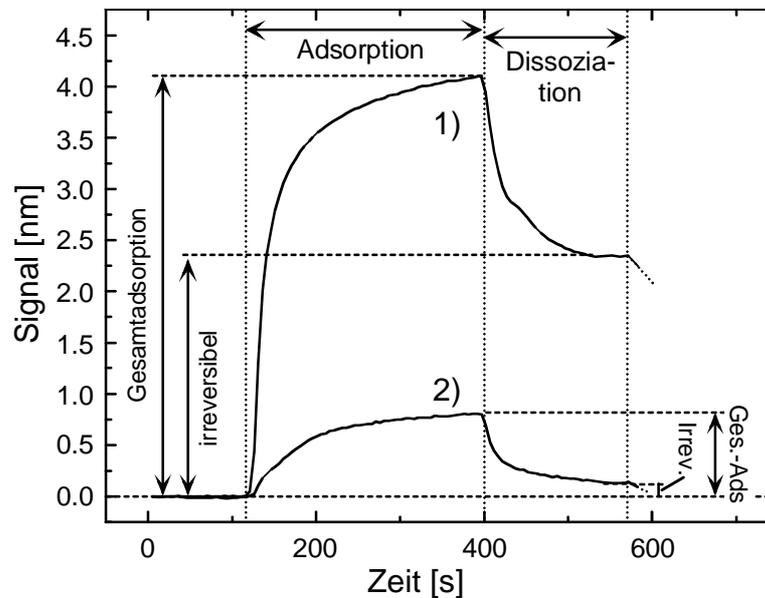


Abbildung 4.47: Adsorption von Speichelproteinen auf

1) einer  $TiO_2$ -Oberfläche und 2) einer (Laminin + EGF)-Oberfläche.

In Abbildung 4.47 sind exemplarisch die Bindungskurven der Adsorption und Dissoziation von Speichelproteinen auf einer unmodifizierten  $TiO_2$ -Oberfläche (Bindungskurve 1) sowie auf einer mit (Laminin + EGF) modifizierten Oberfläche (Bindungskurve 2) abgebildet. Sowohl die unterschiedlichen Proteinadsorptionen insgesamt als auch die verschiedenen Anteile, die nach dem Spülen noch auf der Oberfläche haften, sind gut zu erkennen. Abbildung 4.48 zeigt eine Übersicht des Dissoziationsverhaltens von Speichelproteinen auf allen eingesetzten Oberflächenmodifikationen.

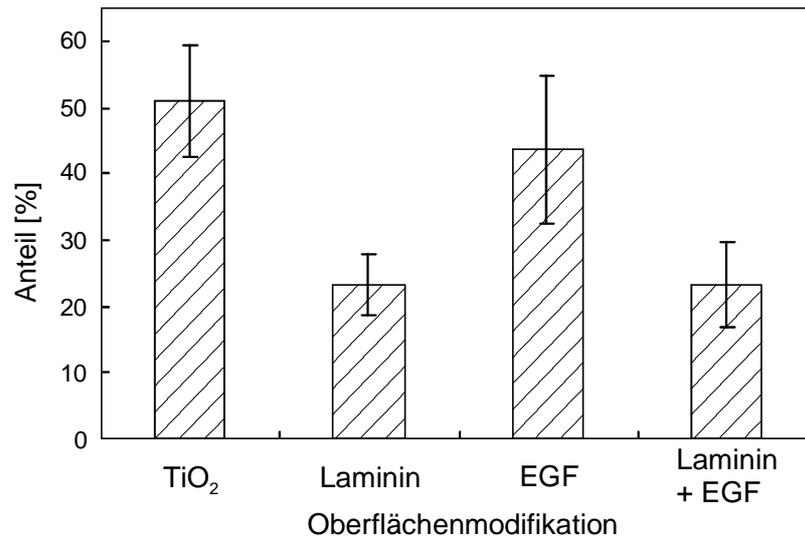


Abbildung 4.48: Anteil der irreversibel gebundenen Speichelproteine im Verhältnis zu den kurzfristig insgesamt gebundenen Proteinen.

Abbildung 4.48 zeigt graphisch veranschaulicht, welcher Anteil der kurzfristig insgesamt gebundenen Proteine nach dem Spülen noch auf den verschiedenen Schichten hält. Diese Anteile spiegeln das Verhältnis der Mengen der irreversibel gebundenen Proteine auf den verschiedenen Oberflächen zueinander wieder: Auf den TiO<sub>2</sub>- und den EGF-Oberflächen, auf denen die größten Mengen Protein irreversibel binden, sind auch die Anteile der kurzfristig insgesamt gebundenen Proteine am größten. Auf den Laminin- sowie den (Laminin + EGF)-Oberflächen hingegen binden irreversibel am wenigsten Proteine, und das Dissoziationsverhalten ist hier am ausgeprägtesten.

Wie schon bei den BSA-Messungen ist der Anteil der dissoziierten Proteine bei den EGF-Oberflächen geringfügig kleiner als bei den TiO<sub>2</sub>-Oberflächen, doch sind genaue Aussagen durch die hohe Standardabweichung eingeschränkt. Auch sind die Anteile der nach dem Spülen noch adsorbierten Speichelproteine geringer als bei BSA. Dagegen waren die Schichtdicken der irreversibel adsorbierten Speichelproteine insgesamt höher als die BSA-Schichtdicken.

Auf Schichten, auf denen BSA adsorbierte, adsorbierten auch Speichelproteine, der Umkehrschluß war jedoch nicht zulässig. Nach diesen Messungen wird die Proteinadsorption auf TiO<sub>2</sub>-Oberflächen durch Beschichtung mit Laminin, (Laminin + EGF) sowie EGF vermindert, wobei die reine EGF-Beschichtung den geringsten Einfluß zeigte. Die Proteinadsorption auf DC-PEG-Oberflächen war nicht nachweisbar.

Diese Messungen fanden im Rahmen des Projekts „Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate und deren Wirkung auf humorale, zelluläre und bakterielle Interaktionen in-vitro“ statt. Danach sollte übermäßige Proteinadsorption auf Implantatoberflächen vermieden werden, um die unmittelbar damit zusammenhängende Anlagerung von Bakterien zu unterdrücken (Abschnitt 2.4.3) und so entzündliche Prozesse, die den Implantationserfolg beeinträchtigen, zu verhindern (Abschnitt 2.4.2). Dafür wäre die Beschichtung von Titan-Implantaten mit DC-PEG zwar am besten geeignet, doch besitzt diese Schicht keine Eigenschaften, die die Zellanlagerung in dem Maße fördern wie Laminin oder das Zellwachstum wie EGF, d. h. das Einwachsen des Implantats könnte durch diese Oberfläche ebenfalls gestört werden. Demzufolge wäre die Beschichtung der Implantate mit Laminin oder (Laminin + EGF) der Beschichtung mit DC-PEG vorzuziehen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Zentraler Baustein eines Fließ-Injektions-Analyse-Systems (FIA = Fließ-Injektions-Analyse) ist die Pumpe, die den Trägerstrom antreibt. Deshalb wurden zunächst die Förderraten der Peristaltik-Pumpen des FIA-Systems bestimmt und mit den Herstellerangaben verglichen (Abschnitt 4.1). Zwar stimmte die Förderrate der Fixpumpe mit den Herstellerangaben überein, die der Variopumpe jedoch nicht. Hauptgrund für diese Abweichung dürfte das unterschiedliche Einspannen der Schläuche in die zugehörige Kassette sein, was dann bei der Fixpumpe zufällig mit den Gegebenheiten beim Hersteller übereinstimmte. Daraus folgt, daß die Förderraten der Peristaltik-Pumpen insbesondere dann überprüft werden müssen, wenn ein neuer Schlauch eingebaut wird. Ist man auf genau vorgegebene Förderraten angewiesen, sollte man den Einsatz von Spritzenpumpen anstelle von Peristaltik-Pumpen in Betracht ziehen (Hoffmann 1996).

Zunächst sollten die Antigen/Antikörper-Systeme Atrazin/K4E7 und Benz(a)pyren/anti-Benz(a)pyren charakterisiert werden. Für die Charakterisierung von Antigen/Antikörper-Systemen mit Hilfe von thermodynamischen und kinetischen Konstanten eignet sich das Fließschema des Bindungshemmtests, d. h. längere Zeit fließt eine konstante Probenkonzentration durch den Detektor, so daß dieser konstante Zustand ausgewertet wird (Abschnitt 4.2.1). Bei der Affinitätstitration sind dies sich im Gleichgewicht befindliche Mischungen aus Antikörper und Antigen (bzw. Analyt), bei kinetisch kontrollierter Bindung an die Oberfläche werden unterschiedlich konzentrierte Antikörperlösungen (bei auf der Oberfläche immobilisiertem Analyt) eingesetzt. Zur Ermittlung der Affinitätskonstanten aus der Affinitätstitration hat sich die Kurvenanpassung durch das entsprechende Modell an die aus den Bindungskurven erhaltene Kalibrierkurve durchgesetzt (vgl. Abschnitt 4.2.2.1 bzw. 4.2.3.1). Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten aus den unter kinetisch kontrollierten Bedingungen aufgenommenen Bindungskurven werden in der Literatur hauptsächlich drei Möglichkeiten erwähnt: Linearisierung nach Karlsson, Kurvenanpassung und numerische Integration. Es wurde gezeigt, daß bei Linearisierung und Kurvenanpassung für die Geschwindigkeitskonstanten im Rahmen der Fehlerbereiche die gleichen Ergebnisse erzielt wurden. Bei der numerischen Integration wurden aufgrund des gesondert ermittelten Auswertebereichs der Bindungskurven teilweise größere Abweichungen der Ergebnisse erhalten, die jedoch so gering wa-

ren, daß die Werte aus allen drei Verfahren immer noch im selben 98 %-Vertrauensbereich lagen. Damit können die Werte aus allen drei Auswertemethoden zur gegenseitigen Kontrolle der berechneten Geschwindigkeitskonstanten verwendet werden (Abschnitte 4.2.2.3 und 4.2.3.3).

Insbesondere bei der Bestimmung kinetischer Konstanten ist die Konzentration aktiver, auf der Oberfläche bindender Bindungspartner wichtig. Diese kann zwar auch aus der Affinitätstitration ermittelt werden, jedoch nur bei hochaffinen Systemen mit einer akzeptablen Genauigkeit. Um nun schnell die Konzentration aktiver Antikörper in einer beliebigen Probe zu ermitteln, wurde diese daher mit Hilfe der Flußzellenkalibrierung berechnet (Abschnitt 4.2.3.2). Es wurde gezeigt, daß auf diese Weise die aktive Konzentration von Antikörpern bestimmt werden kann, die zu einem Antigen/Antikörper-System mittlerer Affinität gehören, was mit der Affinitätstitration nur mit hoher Standardabweichung möglich ist. Falls nur die Konzentration aktiver Antikörper in einer Probe ermittelt werden soll und auf die Bestimmung der Affinitätskonstanten verzichtet werden kann, kann sich mit Hilfe der Flußzellenkalibrierung sogar die Durchführung einer Affinitätstitration erübrigen.

Die Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Größen der biomolekularer Wechselwirkungen mit Hilfe der Kombination von FIA mit RfS (Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie) könnte dahingehend ausgebaut werden, daß zusätzlich ein Thermostat integriert wird. Dann könnten thermodynamische und kinetische Größen gezielt unter verschiedenen Temperaturen bestimmt werden. Unter bestimmten Voraussetzungen könnten dann einerseits mit Hilfe der Van't Hoff'schen Reaktionsisobaren weitere thermodynamische Größen wie Wärmekapazität, Reaktionsenthalpie und -entropie sowie Freie Enthalpie ermittelt werden (Naghbi *et al.* 1995), andererseits ist die Bestimmung der Aktivierungsenergie aus der Arrhenius-Gleichung möglich (Roos *et al.* 1998).

Die Affinitätstitration im Testformat des Bindungshemmtests eignet sich außer zur Bestimmung der Affinitätskonstanten oder der Antikörperkonzentration im eingesetzten Antigen/Antikörper-System auch für den Nachweis niedermolekularer Verbindungen. Wie jedoch in (Piehler 1997 bzw. Abschnitt 2.3.3.1) erläutert, müssen dazu hochaffine Antigen/Antikörper-Systeme eingesetzt werden, damit die Nachweisgrenze nicht zu groß wird. Allerdings verringert sich dann der Arbeitsbereich. Er kann dann weniger als eine Größenordnung umfassen

(Abschnitt 4.2.2.1). Daher wurde mit Hilfe der FIA ein Gradientenansatz getestet: Während sich bei der herkömmlichen Affinitätstitration die Antigen-Antikörper-Reaktion vor der Detektion im Gleichgewicht befand, so daß am Detektor nur die Gleichgewichtskonzentration der Antikörper ausgewertet wurde, wurden beim Gradientenansatz Antigen- und Antikörperlösung erst im Fluß zum Detektor vermischt, so daß am Detektor die Fluidelemente zu einem verschiedenen Grade der Durchmischung erreicht hatten und zum anderen zu unterschiedlichen Zeiten am Detektor ankamen, so daß das Gleichgewicht zwischen den Bindungspartnern verschieden lange Zeit hatte, sich einzustellen.

Beim hochaffinen Atrazin/K4E7-System brachte die numerische Auswertung der Bindungskurven für einzelne Auswerteparameter zwar schon Kalibrierkurven mit einem bis zu fast zwei Größenordnungen erweiterten Arbeitsbereich, doch erst durch die Kombination aller Parameter mit Hilfe von Neuronalen Netzen wurde eine Erweiterung bis hin zu drei Größenordnungen erreicht. Der Arbeitsbereich wurde dabei sogar nicht nur zu höheren Konzentrationen, sondern auch zu niedrigeren Konzentrationen hin vergrößert (Abschnitt 4.3.4). Die Anwendung dieses Gradientenansatzes auf ein System mit niedrigerer Affinitätskonstanten in der homogenen Phase, dem System Desethylatrazin/K4E7, erbrachte ebenfalls einen erweiterten Arbeitsbereich, diesmal jedoch nur zu höheren Analytkonzentrationen hin, vermutlich aufgrund der niedrigeren Affinitätskonstanten (Abschnitt 4.3.5.2).

Obgleich die kleinen Fehlerwerte, die während der Kreuzvalidierungen erhalten wurden, für die gute Qualität der Modellfunktionen, die von den Neuronalen Netzen gefunden wurde, sprechen, sollten für weitere Fragestellungen größere Datensätze verwendet werden, die eine Aufspaltung in einen Trainings- und einen Testdatensatz gestatten. Die Auswertung mit Neuronalen Netzen könnte zudem noch weiter ausgebaut werden, indem man zum einen mit einer höheren Probenzahl arbeitet, gerade im Bereich höherer Analytkonzentrationen, und zum anderen die Konzentrationsabstände für die Auswertung mit Neuronalen Netzen linear und nicht mehr logarithmisch wählt, wie das für die halblogarithmische Darstellung der Kalibrierkurven beim herkömmlichen Bindungshemmtest Standard war. Beim System Desethylatrazin/K4E7 könnten zusätzlich mehr Proben im Bereich niedrigerer Konzentrationen möglicherweise doch noch zu einer Erweiterung des Arbeitsbereichs in beide Richtungen führen.

Ein weiterer Fortschritt für den Gradientenansatz wären kürzere Injektionszeiten, da ein Bindungsassay mit diesem Verfahren im Moment aufgrund der Dispersionsvorgänge doppelt so lange dauert wie ein Bindungsassay bei der herkömmlichen Affinitätstitration. Hier könnten Ansätze zur Miniaturisierung Verbesserungen schaffen. Das Leistungsvermögen des Assays könnte zusätzlich durch Einsatz von exakten Spritzenpumpen verbessert werden.

Ebenfalls ein größerer Arbeitsbereich, schon bei der herkömmlichen Affinitätstitration, könnte durch den Einsatz preisgünstigerer polyklonaler Antikörper erreicht werden. Allerdings würden bei unterschiedlichen Seren unterschiedliche Kreuzreaktivitäten vorliegen, so daß die Antikörper jedesmal neu kalibriert werden müßten.

Die Kombination aus FIA-System und RfS-Detektion wurde außerdem noch im Rahmen des Projekts „Biofunktionalisierung dentaler Titan-Implantate und deren Wirkung auf humorale, zelluläre und bakterielle Interaktionen in-vitro“ (Förd.-Nr. GE 505/9) zur Kontrolle der Oberflächenbeschichtung TiO<sub>2</sub>-beschichteter Glasträger angewandt. Dazu wurde das Adsorptionsverhalten von Proteinen in Lösung auf unmodifizierten und auf modifizierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen beobachtet. Neben der Auswertung der Bindungskurven durch Berechnung der Schichtdicke an irreversibel gebundenem Protein wurde auch das Verhältnis aus Schichtdicke an irreversibel adsorbiertem Protein zur Schichtdicke an (kurzfristig) maximal adsorbiertem Protein berechnet. Beide Auswertemethoden kamen zu derselben Einteilung der Schichtqualität bezüglich der Proteinadsorption (Abschnitt 4.4), nur daß die Bildung des Schichtdickenverhältnisses wesentlich weniger aufwendig als die Berechnung der tatsächlichen Schichtdicke nach dem Modell des Zweischichtsystems war.

Durch die Modifikationen der TiO<sub>2</sub>-Oberflächen mit den adhäsiven Glycoproteinen Laminin und EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) konnte die Adsorption von Proteinen aus BSA- und Speichelproben (BSA = Rinderserumalbumin) vermindert werden. Die kinetische Untersuchung des Adsorptions- und des Dissoziationsverhaltens dieser Proteine kann dann durchgeführt werden, wenn eine Möglichkeit zur Regeneration der Schichten gefunden wird.

Für die Auswahl einer Beschichtung für ein Zahnimplantat muß allerdings noch berücksichtigt werden, daß eine ideale Oberfläche zwar die übermäßige Adsorption von Proteinen und damit auch die Bakterienadhäsion herabsetzt, jedoch

---

gleichzeitig das Einwachsen des Implantats im Zahnfleisch durch Anlagerung von Zellen und Förderung des Zellwachstums unterstützt. Damit können die modifizierten Schichten mit Hilfe von Experimenten, die die Anlagerung und das Wachstum von Zellen auf diesen Oberflächen untersuchen, weiter optimiert werden.

## 6 Literatur

- Adell R., Eriksson B., Lekholm U., Branemark P.I., Jemt T., Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **5** (4) (1990), 347-359.
- Albrektsson T., The response of bone to titanium implants, *CRC Crit. Rev. Biocompat.* **1** (1984), 53-84.
- Arys A., Philippart C., Dourov N., He Y., Le Q.T., Pireaux J.J., Analysis of Titanium Dental Implants after Failure of Osseointegration: Combined Histological, Electron Microscopy, and X-ray Photoelectron Spectroscopy Approach, *J. Biomed. Mater. Res.* **43** (3) (1998), 300-312.
- Baquey C., Palumbo F., Porte-Durrieu M.C., Legeay G., Tressaud A., d'Agostino R., Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B: Beam Interaction with materials and atoms* **151** (1-4) (1999), 255-262.
- Barnett N.W., Lenehan C.E., Lewis S.L., Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* **18** (5) (1999), 346-353.
- Bergmann L., Schäfer C., Niedrig H. (Hrsg.), Lehrbuch der Experimentalphysik Band 3 - Optik, 9. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1993.
- Bio-Rad Application Note, Antibody Purification Using the Econo-Pac<sup>®</sup> Protein A Cartridge and the Econo System, Bulletin 1836 US/EG.
- Birkert O., Haake H.-M., Schütz A., Mack J., Brecht A., Jung G., Gauglitz G., A Streptavidin Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, *Anal. Biochem.* **282** (2) (2000), 200-208.
- Björck Å., Dahlquist G., Numerische Methoden, 2. Auflage, R. Oldenbourg Verlag, München 1979.
- Brdička R., Grundlagen der Physikalischen Chemie, 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1982.
- Brecht A., Gauglitz G., Nahm W., Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors, *Analisis* **20** (3) (1992), 135-140.

- Brecht A., Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen, Dissertation Universität Tübingen 1993.
- Brecht A., Piehler J., Lang G., Gauglitz G., A direct optical immunosensor for atrazine detection, *Anal. Chim. Acta* **311** (3) (1995), 289-299.
- Brecht A., Gauglitz G., Label free optical immunoprobes for pesticide detection, *Anal. Chim. Acta* **347** (1/2) (1997), 219-233.
- Cerdà V., Estela J.M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P., Flow techniques in water analysis, *Talanta* **50** (1999), 695-705.
- Cole T., Kathman A., Koszelak S., McPherson A., Determination of Local Refractive Index for Protein and Virus Crystals in Solution by Mach-Zehnder Interferometry, *Anal. Biochem.* **231** (1) (1995), 92-98.
- Cooper T.G., Biochemische Arbeitsmethoden, 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1981.
- Creech H.J., Isocyanates of 3,4-Benzpyrene and 10-Methyl-1,2-benzanthracene, *J. Am. Chem. Soc.* **63** (2) (1941), 576-578.
- Cussler E.L., Diffusion: mass transfer in fluid systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Cambridge University Press, 1997.
- DAB, Deutsches Arzneibuch Band 1 - X. 1 Sterilisationsmethoden, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1991.
- Dean J.W., Culbertson K.C., D'Angelo A.M., Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **10** (6) (1995), 721-728.
- Eddowes M.J., Direct Immunochemical Sensing: Basic Chemical Principles and Fundamental Limitations, *Biosensors* **3** (1) (1987), 1-15.
- EG, Richtlinie des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, 98/83/EG, Amtsblatt L 330, 05.12.1998, S. 0032-0054.
- Eisenbarth E., Meyle J., Nachtigall W., Breme J., Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts, *Biomaterials* **17** (14) (1996), 1399-1403.
- EWG, Richtlinie des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, 80/778/EWG, Amtsblatt L 229, Brüssel 30.08.1980, S. 11.

- Fernández-Romero J.M., Stiene M., Kast R., Luque de Castro M.D., Bilitewski U., Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems, *Biosens. Bioelectron.* **13 (10)** (1998), 1107-1115.
- Fintschenko Y., Wilson G.S., Flow injection immunoassay: a review, *Mikrochim. Acta* **129** (1998), 7-18.
- Fluka Chemie AG, Laborchemikalien und analytische Reagenzien 1999-2000.
- Fowles G.R., Introduction to modern optics, 2<sup>nd</sup> Edition, Dover Publications Inc., New York 1989.
- Fránek M., Deng A., Kolár V., Performance characteristics for flow injection immunoassay using monoclonal antibodies against s-triazine and 2,4-D herbicides, *Anal. Chim. Acta* **412 (1/2)** (2000), 19-27.
- François P., Vaudaux P., Taborelli M., Tonetti M., Lew D.P., Descouts P., Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium: 2. Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin, *Clin. Oral Implants Res.* **8 (3)** (1997), 217-225.
- Gauglitz G., Möglichkeiten der kinetischen Untersuchung von thermischen und photochemischen Reaktionen, Teil II: Aufstellen der Konzentrations-Zeit-Gesetze, Bestimmung der Reaktionsordnung, *GIT Fachz. Lab.* **26** (1982), 597-609.
- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, in: Baltes H., Göpel W., Hesse J. (Hrsg), *Sensors Update*, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996.
- Gersten K., Einführung in die Strömungsmechanik, 6. Auflage, Vieweg, Braunschweig 1991.
- Glaser R.W., Antigen-Antibody Binding and Mass Transport by Convection and Diffusion to a Surface: A Two-Dimensional Computer Model of Binding and Dissociation Kinetics, *Anal. Biochem.* **213 (1)** (1993), 152-161.
- González-Martínez M.A., Morais S., Puchades R., Maquieira A., Marco M.P., Barceló D., Automation of a heterogeneous enzyme immunoassay for atrazine. Comparison of three immobilization supports, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **361 (2)** (1998), 179-184.

- Guyon E., Hulin J.-P., Petit L., Hydrodynamik, 1. Auflage, Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden 1997.
- Haake, H.-M., Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation Universität Tübingen 2000.
- Hecht E., Optik, 2. Auflage, Addison-Wesley, Bonn 1989.
- d'Hoedt B., Handmann S., Gomez-Roman G., Axmann D., Jahn M., Schulte W., Verweildauer nach Kaplan-Meier und Cutler-Ederer für enossale Implantate verschiedener Systeme - Langzeitergebnisse bis zu 18 Jahren, *Z. Zahnärztl. Implantol.* **12** (1996), 110-120.
- Hoffmann W., Computer controlled titration with burette or peristaltic pump - a comparison, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **356 (3/4)** (1996), 303-305.
- Holtzhauer M., Biochemische Labormethoden, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 1997.
- Ismatec, Automated Sample Injection Analyser - Manual Version 1.51, Ismatec Wertheim, 30.01.1995.
- Jung A., Brecht A., Gauglitz G., Kinetic Inhibition Assays - KIA, *in Vorbereitung*.
- Juroš S., Pučar Z., Pokrić B., Quantitative and qualitative characterization of virus envelope proteins and specific polyclonal antibodies, *J. Biochem. Biophys. Methods* **27 (1)** (1993), 65-75.
- Karlberg B., Pacey G.E., Flow Injection Analysis - A Practical Guide, 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier, Amsterdam 1989.
- Karlsson R., Michaelsson A., Mattsson L., Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system, *J. Immunol. Methods* **145 (1/2)** (1991), 229-240.
- Klein J., Immunologie, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
- König K.G., Karies und Parodontopathien, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1987.
- Kohlrausch F., Praktische Physik, 24. Auflage, B. G. Teubner, Stuttgart 1996.

- Krämer P., Schmid R., Flow Injection Immunoanalysis (FIIA) - a new immunoassay format for the determination of pesticides in water, *Biosens. Bioelectron.* **6 (3)** (1991), 239-243.
- Kuban P., Engstrom A., Olsson J.C., Thorsen G., Tryzell R., Karlberg B., New interface for coupling flow-injection and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* **337 (2)** (1997), 117-124.
- Länge K., Rapp F.-R., Gauglitz G., Brecht A., Flow injection immunotitration: extended working range for inhibition type immunodetection, *Anal. Chim. Acta* **399 (3)** (1999), 275-286.
- Lang G., Brecht A., Gauglitz G., Low molecular analytes in water by spectral interferometry using a competitive immunoassay, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **348 (8/9)** (1994), 602-605.
- Lang G., Brecht A., Gauglitz G., Characterisation and optimisation of an immunoprobe for triazines, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **354 (7/8)** (1996), 857-860.
- Lassen B., Malmsten M., Structure of protein layers during competitive adsorption, *J. Colloid Interface Sci.* **180 (2)** (1996), 339-349.
- Lawrence S., Giles C.L., Tsoi A.C., Lessons in Neural Network Training: Overfitting May be Harder than Expected, Proc. 14<sup>th</sup> Nat. Conf. of Artificial Intelligence, AAAI Press, CA 1997, 540-545.
- Leonhardt H., Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1990.
- Lide D.R., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 80<sup>th</sup> Edition 1999-2000, Chemical Rubber Publishing Company, Florida 1999.
- Liddell E., Weeks I., Antikörpertechniken, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996.
- Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.), Bioanalytik, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998.
- Mallat E., Barzen C., Klotz A., Brecht A., Gauglitz G., Barcelo D., River analyzer for chlorotriazines with a direct optical immunosensor, *Environ. Sci. Technol.* **33 (6)** (1999), 965-671.

- Mattes M.J., Binding parameters of antibodies - a reappraisal, *Tumor Targeting* **4** (1999), 63-69.
- Mauser H., Formale Kinetik, 1. Auflage, Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf 1974.
- Merritt K., Edwards C.R., Brown S.A., Use of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of proteins on the surface of materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **22** (2) (1988), 99-109.
- Midgley A.R., Niswender G.D., Rebar R.W., Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity), *Acta Endocrinol. Suppl.* **142** (1969), 163-184.
- Morton T.A., Myska D.G., Chaiken I.M., Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation and Numerical Integration, *Anal. Biochem.* **227** (1) (1995), 176-185.
- Mouvet C., Amalric L., Broussard S., Lang G., Brecht A., Gauglitz G., Reflectometric Interference Spectroscopy for the Determination of Atrazine in Natural Water Samples, *Environ. Sci. Technol.* **30** (6) (1996), 1846-1851.
- Murphy R.M., Yarmush M.L., Colton C.K., Determining Molecular Weight Distributions of Antigen-Antibody Complexes by Quasi-Elastic Light Scattering, *Biopolymers* **31** (11) (1991), 1289-1295.
- Naghibi H., Tamura A., Sturtevant J.M., Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** (12) (1995), 5597-5599.
- Niemann H.-J., Mauser H., Zur kinetischen Analyse von Photoreaktionen Teil I, *Z. Phys. Chem. (Neue Folge)* **82** (5/6) (1972), 295-308.
- O'Shannessy D.J., Brigham-Burke M., Soneson K.K., Hensley P., Brooks I., Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods, *Anal. Biochem.* **212** (2) (1993), 457-468.
- O'Shannessy D.J., Winzor D.J., Interpretation of deviations from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior in the Characterization of Ligand Binding by Biosensor Technology, *Anal. Biochem.* **236** (2) (1996), 275-283.

- Otto M., Chemometrie, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1997.
- Oudshoorn R.G.C., Kooyman R.P.H., Greve J., Refractive index and layer thickness of an adsorbing protein as reporters of monolayer formation, *Thin Solid Films* **284-285** (1996), 836-840.
- Piebler J., Brecht A., Geckeler K.E., Gauglitz G., Surface modification for direct immunoprobes, *Biosens. Bioelectron.* **11 (6/7)** (1996), 579-590.
- Piebler J., Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation Universität Tübingen, Shaker Verlag, Aachen 1997.
- Piebler J., Brecht A., Giersch Th., Hock B., Gauglitz G., Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *J. Immunol. Methods* **201 (2)** (1997a), 189-206.
- Piebler J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin M., Maul C., Thiericke R., Grabley S., Label-Free Monitoring of DNA-Ligand Interactions, *Anal. Biochem.* **249 (1)** (1997b), 94-102.
- Pingoud A., Urbanke C., Arbeitsmethoden der Biochemie, 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1997.
- Quirynen M., Naert I., Steenberghe D. van, Fixture design and overload influence marginal bone loss and fixture success in the Branemark system, *Clin. Oral Implants Res.* **3 (3)** (1992), 104-111.
- Rickert J., Brecht A., Göpel W., Quartz crystal microbalances for quantitative biosensing and characterizing protein multilayers, *Biosens. Bioelectron.* **12 (7)** (1997), 567-575.
- Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K., Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995.
- Roos H., Karlsson R., Nilshans H., Persson A., Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology, *J. Mol. Recognit.* **11 (1-6)** (1998), 204-210.
- Rothmund M., Brecht A., Berthel G., Gräfe D., Schütz A., Gauglitz G., Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **359 (1)** (1997), 15-22.

- Rupp F., Grenzflächenanalytische Untersuchungen des beschichteten und unbeschichteten dentalen Implantatwerkstoffs Titan, Dissertation Universität Tübingen, Shaker Verlag, Aachen 2000.
- Růžička J., Hansen E.H., Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis, *Anal. Chim. Acta* **78** (1) (1975), 145-152.
- Růžička J., Marshall G.D., Sequential Injection - A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays, *Anal. Chim. Acta* **237** (2) (1990), 329-336.
- Růžička J., Hansen E.H., Flow Injection Analysis, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, New York 1988.
- Sadana A., Ram A.B., Fractal Analysis of Antigen-Antibody Binding Kinetics: Biosensor Applications, *Biotechnol. Prog.* **10** (3) (1994), 291-298.
- Saurina J., Hernandez-Cassou S., Tauler R., Izquierdo-Rodorsa A., Spectrophotometric determination of pK<sub>a</sub> values based on a pH gradient flow injection system, *Anal. Chim. Acta* **408** (1/2) (2000), 135-143.
- Scheller F., Schubert F., Biosensoren, 1. Auflage, Birkhäuser, Basel 1989.
- Schmid R.D. (Hrsg.), Flow Injection Analysis (FIA) Based on Enzymes or Antibodies, GBF Monographs, Volume 14, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
- Schmitt H.-M., Brecht A., Piehler J., Gauglitz G., An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosens. Bioelectron.* **12** (8) (1997), 809-816.
- Schwedt G., Analytische Chemie, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995.
- Schwetlick K., Dunken H., Pretzschner G., Scherzer K., Tiller H.-J., Chemische Kinetik, 5. Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1989.
- Seemann J., Rapp F.-R., Zell A., Gauglitz G., Classical and modern algorithms for the evaluation of data from sensor-arrays, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **359** (1) (1997), 100-106.
- Shoup D., Szabo A., Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound receptors, *Biophys. J.* **40** (1) (1982), 33-39.

- Shukla J.B., Pariphar R.S., Rao B.R.P., Gupta S.P., Effects of peripheral-layer viscosity on peristaltic transport of a bio-fluid, *J. Fluid Mech.* **97** (2) (1980), 225-237.
- Silva E.C., Araújo M.C.U., Honorato R.S., Lima J.L.F.C., Zagatto E.A.G., Brienza S.M.B., Standard additions in flow injection analysis based on merging zones and gradient exploitation: application to copper determination in spirits, *Anal. Chim. Acta* **319** (1/2) (1996), 153-158.
- Skeggs L.T., New Dimensions in Medical Diagnoses, *Anal. Chem.* **38** (6) (1966), 31A-44A.
- Späth K., Brecht A., Gauglitz G., Studies on the biotin-avidin multilayer adsorption by spectroscopic ellipsometry, *J. Colloid Interface Sci.* **196** (2) (1997), 128-135.
- Spieckermann H., Donath D., Jovanovic S.A., Richter J., Implantologie (Farbatlantent der Zahnmedizin 10, Hrsg. Rateitschak K.H., Wolf H.F.), 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994.
- Tamura R.N., Oda D., Quaranta V., Plopper G., Lambert R., Glaser S., Jones J.C., Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants, *J. Periodontal Res.* **32** (3) (1997), 287-294.
- Taylor G., Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **219** (1953), 186-203.
- Thull R., Trautner K., Karle E., Modell zur immunologischen Prüfung von Biomaterialien, *Biomed. Tech.* **37** (7/8) (1992), 162-169.
- Thull R., Naturwissenschaftliche Aspekte von Werkstoffen in der Medizin, *Naturwissenschaften* **81** (11) (1994), 481-488.
- Vassilakos N., Arnebrant T., Glantz P.-O., Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH, *Scand. J. Dent. Res.* **100** (6) (1992), 346-353.
- Watzek G., Enossale Implantate in der oralen Chirurgie, 1. Auflage, Quintessenz, Berlin 1993.
- Wedler G., Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 1997.

- Weller M., Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden, Dissertation TU München 1992.
- Wells A., Miller C.E., Nadel M.K., Rapid Fluorescin and Protein Assay Method for Fluorescent-Antibody Conjugates, *Appl. Microbiol.* **14 (2)** (1965), 271-275.
- Wilson R., Barker M.H., Schiffrin D.J., Abuknesha R., Electrochemiluminescence flow injection immunoassay for atrazine, *Biosens. Bioelectron.* **12 (4)** (1997), 277-286.
- Wintermantel E., Suk-Woo H., Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 1998.
- Zell A., Mamier G., Vogt M., Mache N., Hübner R., Döring S., Hatzigeorgiu A., Posselt D., Schreiner T., Kett B., Clemente G., Stuttgart Neural Network Simulator (SNNS), User Manual, Version 4.1, Universität Stuttgart 1995.
- Zell A., Simulation Neuronaler Netze, 1. Nachdruck d. 1. Auflage, Addison-Wesley, Bonn 1996.
- Zeng H., Chittur K.K., Lacefield W.R., Analysis of bovine adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces, *Biomaterials* **20 (4)** (1999), 377-384.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ACA	Atrazincapronsäure (2-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-2-(6'-amino)hexansäure
Ag	Antigen, Analyt
Ak	Antikörper
AMD	Aminodextran
BP	Benz(a)pyren
BP-6-NCO	Benz(a)pyren-6-Isocyanat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglykol
DC-PEG	Dicarboxy-Polyethylenglykol
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
FIA	Fließ-Injektions-Analyse (flow injection analysis)
GOPTS	3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan
IgG	Immunglobulin G
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
OVA	Ovalbumin
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PS	Probenschleife
RiFS	Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie
SNNS	Stuttgarter Neuronale Netze Simulator

## 7.2 Veröffentlichungen

### 7.2.1 Publikationen

Länge K., Rapp F.-R., Gauglitz G., Brecht A., Flow injection immunotitration: extended working range for inhibition type immunodetection, *Anal. Chim. Acta* **399** (3) (1999), 275-286.

Länge K., Herold M., Scheideler L., Geis-Gerstorfer J., Wendel H.P., Gauglitz G., Quantification of protein adsorption on titanium dioxide layers as model system for dental titanium implants, *eingereicht*.

### 7.2.2 Poster

Länge K., Brecht A., Gauglitz G.:  
Extended Working Range for Binding Inhibition Type Immunoprobes  
*Europtode*, Münster 1998

Länge K., Vo-Dinh T., Gauglitz G.:  
Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen Benzo(a)pyren  
*Anakon*, Konstanz 1999

### 7.2.3 Vorträge

Länge K., Brecht A., Gauglitz G.:  
Fließ-Injektions-Analyse in der Biosensorik:  
Erweiterung des Konzentrationsbereichs  
*Incom*, Düsseldorf 1998

### 7.3 Akademische Lehrer

K. Albert, E. Bayer, M. Brendle, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, K.E. Geckeler, W. Göpel<sup>†</sup>, G. Häfelingen, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack<sup>†</sup>, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, H.A. Mayer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, A. Rieker, K.-D. Schierbaum, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, H.U. Siehl, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.P. Zeller, C. Ziegler

## 7.4 Lebenslauf

- Name: Kerstin Länge
- Geburtsdatum: 28.09.1970
- Geburtsort: Reutlingen
- Schulbildung: 1977-1981 Hermann-Kurz-Grundschule Reutlingen  
1981-1990 Johannes-Kepler-Gymnasium Reutlingen  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
- Studium: 1990-1997 Studium der Chemie an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Diplomprüfung: Juli 1996
- Diplomarbeit: August 1996 - Februar 1997  
bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische  
Chemie, Universität Tübingen.  
Titel: Immuntitration an Fließ-Injektions-Analyse-Systemen  
zum Pestizidnachweis mit erweitertem Konzentrations-  
bereich
- Promotion: März 1997 - Dezember 2000  
unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut  
für Physikalische Chemie, Universität Tübingen.  
Titel: Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse in markierungs-  
freien Bindungsassays.