

Einsatz optischer Biosensoren für die Protein- und Fermentationsanalyse

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Martin Mehlmann

Tag der mündlichen Prüfung:

16.07.2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. C. Ochsenfeld

Für Dany

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 danke ich ihm für seine stete Unterstützung und für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Für die Übernahme des Coreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Ochsenfeld.

Herr Professor Fiedler danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und den vielen Fermentationen, die in seiner Gruppe gelaufen sind.

Herrn Alex Garvin (Applied Biosystems) danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe – insbesondere der Biosensorgruppe – danke ich für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Rolf Tünnemann möchte ich für die Darstellung der Di- und Tripeptide, sowie für hilfreiche Diskussionen danken.

Allen die mich privat unterstützt haben – insbesondere Dany - kann ich gar nicht genug danken.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	MOTIVATION DER ARBEIT	4
1.2	ZIELSETZUNG UND GLIEDERUNG	6
2	THEORETISCHER TEIL	8
2.1	BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN	8
2.1.1	<i>Antikörper</i>	8
2.1.2	<i>Biomolekulare Wechselwirkungen</i>	10
2.1.3	<i>Glycopeptidantibiotika</i>	12
2.1.4	<i>Hirudin</i>	16
2.2	OPTISCHE GRUNDLAGEN	18
2.2.1	<i>Reflektometrische Interferenzspektroskopie</i>	18
2.2.2	<i>Mehrfachreflexion an dünnen Schichten</i>	19
2.2.3	<i>Mikroreflektometrie</i>	22
2.3	FERMENTERANALYTIK	24
2.4	MATRIX-UNTERSTÜTZTE-LASER-IONISATION-TIME-OF-FLIGHT-SPEKTROMETRIE	27
3	EXPERIMENTELLER TEIL	30
3.1	GERÄTE	30
3.2	MATERIALIEN	31
3.2.1	<i>Chemikalien</i>	31
3.2.2	<i>Lösungen</i>	32
3.2.3	<i>Bakterienstämme</i>	33
3.2.4	<i>Entsorgung</i>	33

3.3	MESSMETHODEN	34
3.3.1	<i>Messprotokolle</i>	34
3.3.2	<i>Hemmhoftest.....</i>	35
3.3.3	<i>HPLC-Parameter</i>	35
3.3.4	<i>Maldi-Messungen.....</i>	35
3.4	OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN.....	36
3.4.1	<i>Immobilisierung von Acetyl-L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin (AcKaa).....</i>	37
3.4.2	<i>Immobilisierung von Antikörpern.....</i>	38
3.4.3	<i>Herstellung ACA-BSA.....</i>	38
3.4.4	<i>Immobilisierung von Biotin.....</i>	39
3.4.5	<i>Immobilisierung von Avidin.....</i>	39
3.4.6	<i>Biotinylierung von Antikörpern</i>	39
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	ONLINE-ÜBERWACHUNG VON FERMENTATIONSPROZESSEN	40
4.1.1	<i>Online-Bestimmung der Vancomycinkonzentration während eines Fermentationsprozesses.....</i>	40
4.1.2	<i>Hemmhoftest.....</i>	46
4.1.3	<i>Hirudin</i>	49
4.1.4	<i>Online-Referenzierung von unspezifischen Wechselwirkungen</i>	53
4.1.5	<i>Aufbau und Charakterisierung eines Systems zur Online-Verdünnung.</i>	57
4.1.6	<i>Einsatz des Dilutorsystems für die Fermenteranalytik.....</i>	61
4.2	MIKROREFLEKTOMETRIE.....	63
4.2.1	<i>Abhängigkeit des Basislinienrauschens von der Zahl der Detektionspunkte.....</i>	64
4.3	KOPPLUNG RIFS-MS	67

4.3.1	<i>Allgemein</i>	67
4.3.2	<i>Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kopplung</i>	68
4.3.3	<i>RfS-Messungen</i>	71
4.3.4	<i>MALDI-TOF-MS-Messungen</i>	73
4.3.5	<i>Verwendung von leitenden Oberflächen (ITO-Schichten)</i>	74
4.4	IMMOBILISIERUNG VON ANTIKÖRPERN	79
4.4.1	<i>Immobilisierung von Antikörpern über freie Aminofunktionen</i>	79
4.4.2	<i>Immobilisierung über Avidin – Biotin Wechselwirkung</i>	85
4.4.3	<i>Vergleich der Beiden Immobilisierungsmethoden</i>	89
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	90
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
7	ANHANG	99
7.1	ABKÜRZUNGEN	99
7.2	VERÖFFENTLICHUNGEN	101
7.2.1	<i>Publikationen</i>	101
7.2.2	<i>Poster</i>	101
7.2.3	<i>Vorträge</i>	102
7.3	AKADEMISCHE LEHRER	103
7.4	LEBENS LAUF	104

1 Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Schätzungen gehen von einem Markt an biotechnologischen Produkten von über 500 Milliarden Dollar aus. Typische industrielle biotechnologische Prozesse sind die Herstellung von Proteinen und Peptiden, wie z.B. dem natürlichen Thrombininhibitor Hirudin, von Aminosäuren wie Lysin und Glutaminsäure, oder von Antibiotika wie z.B. Penicillinen oder Vancomycin.

In der biotechnologischen Herstellung von rekombinanten Proteinen wird der Bedarf aufgrund medizinischer Anwendungen und Forschungen erheblich zunehmen, da aus der Genom-Analyse und der Proteom-Analytik viele neue Targets resultieren. Im Forschungsbereich werden rekombinante Proteine aus diesem Grund bereits in größerem Maßstab produziert.

In der biotechnologischen Produktion werden Zellkulturen verwendet, die in der Regel nach gentechnischen Veränderungen der Zellen (*E. coli* für prokaryontische und Hefe für eukaryontische Systeme) in großvolumigen Fermentern angesetzt werden. Im Fall der Proteinproduktion wird die gentechnische Veränderung auf DNA-Ebene erreicht, indem zuerst ein Plasmid hergestellt wird. Dieses Plasmid enthält ein Gen des gewünschten Proteins sowie Überexpressionspromotoren und wird in den betreffenden Mikroorganismus inkloniert. So erhält man bei der Fermentation das Protein in hoher Ausbeute. Mikrobiologische Produktionsverfahren werden auch zur Herstellung niedermolekularer Verbindungen, wie z.B. Antibiotika bis hin zu Aminosäurebausteinen, eingesetzt.

Jeder Fermentationsprozess muss laufend überwacht werden, um sicherzustellen, dass er in optimaler Weise verläuft. Dabei werden meist nur allgemeine Parameter wie pH-Wert, Temperatur oder Druck online verfolgt. Die Reaktionskontrolle bezüglich des Produkt- bzw. Nebenproduktgehalts wird meist offline durchgeführt. Das heißt, es

werden zu verschiedenen Zeiten Proben gezogen, die nacheinander aufgearbeitet und mit geeigneten analytischen Verfahren untersucht werden. Problematisch kann dabei die zeitliche Verzögerung zwischen Fermentationsprozess und dem Analysenergebnis sein. Eine solche offline-Kontrolle bedeutet einen hohen personellen, zeitlichen und instrumentellen Aufwand.

Ein optimal gefahrener Fermentationsprozess ist aus Kostengründen und zur Verringerung der Umweltbelastungen anzustreben. Insbesondere ist die Minimierung der Abfallmenge, die z.B. DNA-Partikel enthält, erforderlich. So darf bei der Expression des Gerinnungshemmers Hirudin in Hefen der Abfall nicht verfüttert oder anderweitig weiterverwendet, sondern muss einer Verbrennung zugeführt werden. Auch ist eine optimale Nutzung der teuren Fermentationsmedien anzustreben.

Zusammengefasst sind unter ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten folgende Aspekte von besonderer Relevanz und stellen eine Schwachstelle der bisherigen Prozesse dar.

- Zeitverzögerung zwischen Analysenergebnis und Fermentationsprozess,
- hoher personeller, zeitlicher und finanzieller Aufwand,
- im Vergleich zur Sensorik relativ hoher Lösungsmittelbedarf und große Abfallmengen.

Wie schon einleitend erwähnt, kommen diesen Punkten wegen des großen Potentials biotechnologischer Prozesse für die Zukunft große Bedeutung zu.

1.2 Zielsetzung und Gliederung

Zielsetzung

In dieser Arbeit soll vor dem oben aufgeführten Hintergrund ein Biosensor entwickelt werden, der das markierungsfreie Online-Monitoring biotechnologischer Synthesen erlaubt. Dabei soll die zeitliche Verzögerung zwischen Prozess und Analysenergebnis möglichst gering gehalten werden. Aus diesem Grund soll besonders die Möglichkeit evaluiert werden Messungen direkt im Fermenter, ohne aufwändige Probenvorbereitung durchführen zu können.

Die besondere Stärke von Biosensoren liegt darin, aus komplexen Systemen selektiv und sensitiv Zielsubstanzen in kurzen Zeitintervallen zu erfassen. Die Kulturbrühe aus dem Fermentationsprozess stellt mit ihrem Gehalt an verschiedensten Proteinen, DNA-Partikeln und weiteren Komponenten eine sehr komplexe Matrix dar. Optische Detektoren bieten sich hier deshalb an, weil sie unempfindlich sind gegen elektromagnetische Störfelder, wie sie unter realen Bedingungen anzutreffen sind. Modellhaft wird die biotechnologische Herstellung des Antibiotikums Vancomycin sensorisch erfasst.

Neben der Quantitativen Bestimmung der Fermentationsprodukte ist aufgrund der Komplexität der biotechnologischen Prozesse oftmals auch eine Identifizierung und Charakterisierung von Derivaten und Metaboliten notwendig. In einem zweiten Teil sollen deshalb auf die Grundlagen und Voraussetzungen einer Kopplung von RfS mit der Massenspektrometrie eingegangen und erste Messungen dazu gezeigt werden. Eine solche Kopplung würde dann, neben der Quantifizierung des Analytmoleküls mit RfS, eine eindeutige Identifizierung des Analyten erlauben.

Gliederung

In einem einführenden theoretischen Teil werden die Grundlagen folgender Themengebiete diskutiert:

- biomolekulare Grundlage der Antigen-Antikörperwechselwirkung
- Vorkommen, Struktur und Wirkmechanismus von Glycopeptidantibiotika
- Grundprinzipien der optischen Detektion
- allgemeine Fermenteranalytik
- eine kurze Einführung in die Maldi-TOF-Spektrometrie von Biomolekülen

Nach der Beschreibung von Materialien, Geräten und verwendeten Methoden wird im Ergebnisteil die Online-Überwachung eines modellhaften Fermentationsprozesses behandelt. Anschließend wird kurz auf die Möglichkeit einer vereinfachten Detektion mittels Mikroreflektometrie eingegangen. In einem weiteren Kapitel wird die Kopplung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit der Massenspektrometrie behandelt. Schließlich werden Strategien zur Immobilisierung von Antikörpern betrachtet. In einer abschließenden Zusammenfassung werden die Ergebnisse kritisch bewertet.

2 Theoretischer Teil

2.1 Biochemische Grundlagen

2.1.1 Antikörper

Eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung makromolekularer Fremdstoffen (Antigene) im Körper spielt die *humorale Immunität*, die durch *Antikörper* vermittelt wird. Antikörper sind eine Klasse von Proteinen, die synonym auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Sie sind eine der Haupt-Proteinkomponenten des Blutes und machen etwa 20% (m/m) aller Plasmaproteine aus (Alberts *et al.* 1995). Sie werden ausschließlich von B-Lymphozyten hergestellt.

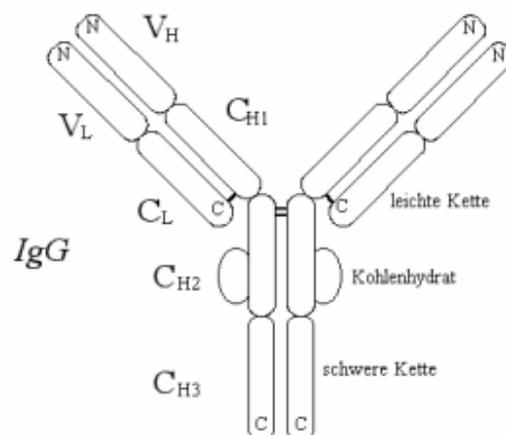


Abb. 2-1: Struktur eines IgG Antikörpers.

Die Grundstruktur eines Antikörpermoleküls besteht aus vier Polypeptidketten. Zwei identische leichte Ketten (L-Ketten) aus jeweils ca. 220 Aminosäuren und zwei identische schwere Ketten (H-Ketten) aus jeweils ca. 450-600 Aminosäuren. Diese vier Ketten werden durch nicht-kovalente und kovalente (Disulfid-Brücken) Wechselwirkungen zusammengehalten. Sowohl die H- als auch die L-Ketten beinhalten so genannte variable und konstante Regionen. Am N-terminalen Ende von leichter und schwerer Kette, den variablen Domänen (V) befindet sich die Antigenbindungsstelle. In jeder V-

Region gibt es drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz, den komplementaritätsbestimmenden Regionen (complementarity determining regions, CDR) (Price und Newman 1997).

Diese sechs CDRs, die aus ca. 50 Aminosäuren bestehen, bilden die Region des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird (*Paratop*). Die entsprechende komplementäre Region des Antigens, die spezifisch durch das Paratop erkannt wird, heißt *antigene Determinante* oder *Epitop*.

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: IgA; IgD, IgE, IgG und IgM, die sich im Wesentlichen durch die H-Ketten unterscheiden (α , β , γ , δ , ϵ und μ). Die Hauptklasse der Immunglobuline sind die IgG-Antikörper. Sie werden während der sekundären Immunantwort massenweise produziert. Es sind die einzigen Antikörper, die über die Plazenta von der Mutter auf den Fötus übertragen werden. Einige wichtige Eigenschaften der wichtigsten Antikörperklassen sind in Tab. 2-1 aufgeführt.

	Antikörperklasse				
	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
H-Kette	μ	δ	γ	α	ϵ
L-Kette	κ oder λ				
Zahl der 4 Ketten Einheiten	5	1	1	1 oder 2	1
% des gesamt IgG im Blut	10	< 1	75	15	<1
Molekulargewicht (1000 Da)	950	180	150	160	190

Tab. 2-1: *Eigenschaften von Antikörper-Klassen.*

2.1.2 Biomolekulare Wechselwirkungen

Bei der Annäherung zweier solvatisierter Proteine (Antigen und Antikörper) treten unspezifische Abstoßungskräfte aufgrund der hydrophilen Natur der beiden solvatisierten Moleküle auf. Diese repulsiven Kräfte haben eine Reichweite von ca. 2-3 nm. Damit eine Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper auftreten kann, müssen diese Kräfte durch entsprechend langreichweitige ($>30 \text{ \AA}$) Anziehungskräfte überwunden werden (van Oss 1995). Die wichtigsten Kräfte für eine primäre Anziehung zwischen Epitop und Paratop sind hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Die treibende Kraft für die hydrophobe Anziehung solvatisierter Verbindungen liegt in der freien Enthalpie der Kohäsion von Wasser, die durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des verdrängten Wassers hervorgerufen wird. Abhängig vom betrachteten Molekül kann dieser Effekt überwiegend ein entropischer, enthalpischer oder eine Mischung aus beiden Effekten sein (Mirejovski und Arnett 1983). Die Reichweite dieser Kräfte liegt dabei im Bereich von 3-10 nm.

Die elektrostatischen Coulombwechselwirkungen beruhen auf der elektrostatischen Anziehung zwischen gegensätzlich geladenen Gruppen des Epitops und Partops. Diese Wechselwirkungen sind abhängig vom Abstand der beiden Moleküle (Tab. 2-2) und der Dielektrizitätskonstante. Somit hängen sie auch von der Ionenstärke und dem pH-Wert des umgebenden Mediums (Tab. 2-2) ab.

Erst nachdem sich aufgrund der hydrophoben und der elektrostatischen Wechselwirkung die beiden Bindungspartner ausreichend angenähert haben, treten auch noch die kurzreichweitigen van-der-Waals-Kräfte ($\sim r^{-6}$) und Wasserstoffbrückenbindungen auf.

	$\overline{E_{\text{attr}}}$ (gemittelt über alle Orientierungen)
Monopol – Monopol	$\sim \frac{1}{\epsilon \epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r}$
Monopol – Dipol	$\sim \left(\frac{1}{\epsilon \epsilon_0} \right)^2 \frac{1}{T} \frac{q^2 \mu^2}{r^4}$
Dipol – Dipol	$\sim \left(\frac{1}{\epsilon \epsilon_0} \right)^2 \frac{1}{T} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6}$

Tab. 2-2: *Abhängigkeit der Orientierungskräfte von der Ladung (bzw. Dipolmoment) und dem Abstand.*

Die Bindung des Antigens an den Antikörper beruht also wie oben aufgeführt auf der Ausbildung vieler schwacher, nicht-kovalenter Bindungen, wie hydrophober Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücke, van der Waals-Kräfte und Ionenbindungen. Die Reaktion eines einzelnen Epitops eines Antigens mit einer einzelnen Antigenbindungsstelle des Antikörpers kann ausgedrückt werden als:



Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich damit für die Affinitätskonstante:

$$K_a = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} = \frac{[\text{AgAk}]}{[\text{Ag}][\text{Ak}]} \quad (2)$$

Dabei ist oftmals die Energie, die zur Dissoziation eines Antigen-Antikörper-Komplexes notwendig ist, größer, als die Energie, die aus der Assoziationsreaktion gewonnen werden kann. Dieses Phänomen wird als Hysterese bezeichnet und liegt an der Ausbildung von zusätzlichen sekundären Bindungen begründet (van Oss 1994).

Die Werte für die Affinitätskonstante liegen üblicherweise im Bereich zwischen 10^4 l/mol (niedrigaffin) und 10^{11} l/mol (hochaffin).

2.1.3 Glycopeptidantibiotika

Der bekannteste Vertreter der Substanzklasse der Glykopeptidantibiotika ist Vancomycin. Es wurde in den frühen 50er Jahren von der Firma Eli Lilly im Rahmen eines Naturprodukt-Screenings nach antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen entdeckt. Dieses Antibiotikum, das gegen Gram-positive Bakterien wirksam ist, wurde von einer neuen Art von Actinomyceten, die aus indonesischen Bodenproben isoliert wurden, gewonnen. Diese neue Kultur, ursprünglich als *Streptomyces orientalis* bezeichnet, wurde später in *Amycolatopsis orientalis* umbenannt.

Vancomycin wird in der Humanmedizin neben Teicoplanin seit über 40 Jahren eingesetzt (McCormick *et al.* 1959). Trotz anfänglicher Nebenwirkungen, die jedoch auf Unzulänglichkeiten bei der Reinigung zurückzuführen waren (Dutton 1959), gilt Vancomycin als ein wichtiges Werkzeug zur Bekämpfung von Infektionen und wird speziell als Notfallantibiotikum gegen Penicillin-resistente Problemkeime wie Enterokokken und Staphylokokken eingesetzt.

Bisher sind mehr als 30 Antibiotika der Glycopeptidklasse bekannt (Nagarajan 1994).

2.1.3.1 Struktur der Glycopeptidantibiotika

Neben Vancomycin gibt es noch weitere strukturverwandte Verbindungen, die sich in verschiedene Untergruppen der Glycopeptidantibiotika einteilen lassen. Sie alle besitzen ein peptidisches Grundgerüst, das zum größten Teil aus aromatischen, nicht-proteinogenen Aminosäuren aufgebaut ist. Die aromatischen Seitenketten sind meistens oxidativ miteinander verknüpft, was zu einer verhältnismäßig starren Konformation der Peptide führt. Während die Aminosäuren 2 und 4-7, beginnend am N-Terminus, bei allen Glycopeptidantibiotika identisch sind, können sich an Position 1 und 3 aliphatische Aminosäuren (z.B. bei Vancomycin (Abb. 2-2)), aromatische Aminosäuren (z.B. bei Avoparcin) oder aromatische, über Etherbrücken miteinander verknüpfte Aminosäuren (z.B. bei Ristocetin A) befinden.

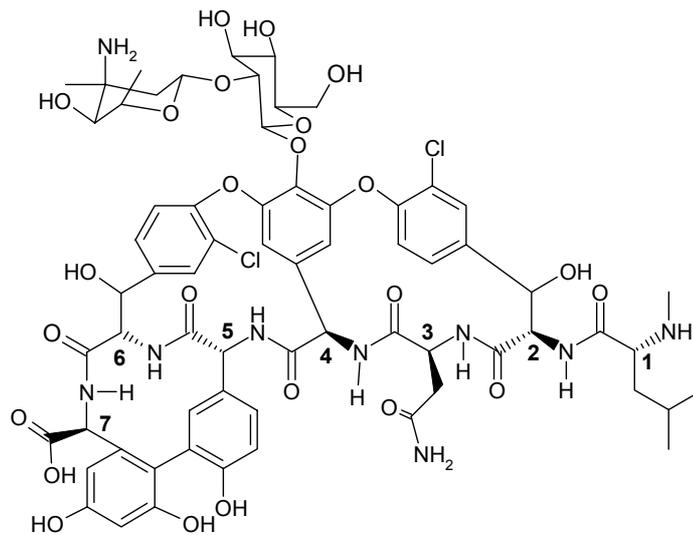


Abb. 2-2: Strukturformel von Vancomycin.

2.1.3.2 Antibiotischer Wirkmechanismus

Die Wirkung der Glycopeptidantibiotika beruht auf einer Wachstumshemmung der Zellwand grampositiver Bakterien, die im Allgemeinen zu einem Absterben der Zelle führt. Vancomycin (und andere Glycopeptidantibiotika) binden spezifisch an Zellwandvorstufen, die auf die Sequenz D-Alanin-D-Alanin enden. Diese Sequenz spielt bei einer Transpeptidierungsreaktion durch eine spezifische Transpeptidase eine wichtige Rolle, wobei eine Quervernetzung der Polysaccharidketten des Murein-Sacculus erreicht wird, um die mechanische Stabilität der Zellwand zu erhöhen. Durch die Anbindung von Vancomycin an diese Peptidsequenz wird die Quervernetzung blockiert. Die Zellwand kann sich nicht voll ausbilden, was je nach Umgebungsbedingungen zu einer osmotischen Lyse der Zellen führt.

Die eigentliche Interaktion findet dabei zwischen dem starren Heptapeptidrückgrat des Vancomycins und dem auf D-Alanin-D-Alanin endenden Peptid statt. Die Affinitätskonstante für diese Wechselwirkung liegt bei 10^6 M^{-1} (Nieto und Perkins 1971).

Die genaue Struktur des bimolekularen Komplexes zwischen Vancomycin und Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala (Ac-K(Ac)-a-a) erfolgte 1984 über NOE-NMR-Messungen (Williams 1984) und wurde später röntgenographisch bestätigt (Schäfer *et al.* 1996).

Im Wesentlichen sind dabei folgende Wechselwirkungen der Hauptgrund für die starke Bindung (Williams und Bardsley 1999):

1. Die Bindung des Carboxylat-Anions des C-terminalen D-Alanins mit den drei Amidprotonen der Aminosäuren 2-4 des Vancomycins (---);
2. Zwei Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Dipeptid und dem Antibiotikum (—);
3. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alanin-Methylgruppen und den Kohlenwasserstoffabschnitten des Antibiotikums.

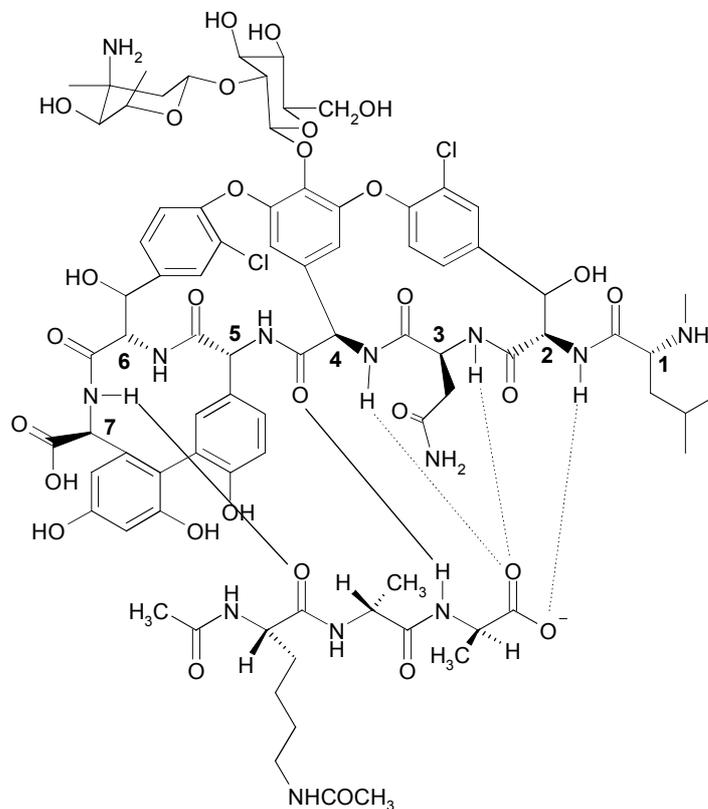


Abb. 2-3: Schema der Wechselwirkungen zwischen Vancomycin und der Mucopeptidvorstufe.

Dimerisierung von Glycopeptiden

Viele Glycopeptide neigen zur Dimerisierung. Dadurch kann eine *intramolekulare* Bindung an die Bakterienoberfläche erleichtert werden, was zu einer kooperativen Verstärkung der Affinität zu den Peptidendungen der Zellwandvorstufe und somit zu

einer erhöhten antibakteriellen Aktivität führt (Beauregard *et al.* 1995, Beauregard *et al.* 1997). Dabei zeigt sich, dass die Dimerisierungskonstante bei fast allen bislang untersuchten Glycopeptiden größer wird, wenn Analoge der Zellwandvorstufen gebunden sind. Das heißt, die Dimerisierung und die Ligandenbindung verlaufen kooperativ (Mackay *et al.* 1994). Z. B. ist die Dimerisierungskonstante des Chloreremomycin in Gegenwart von Ac-K(Ac)-a-a ca. hundertmal größer als bei Abwesenheit des Liganden. In ähnlicher Weise binden auch Antibiotika-Dimere die Liganden stärker als die Monomere. Ein ähnlicher kooperativer Effekt tritt bei hydrophob substituierten Glycopeptiden (z. B. Teicoplanin) auf. Hier kann durch eine Insertion des hydrophoben Rests in die Zellmembran das Antibiotikum an seinem Wirkungsort fixiert werden.

2.1.3.3 Resistenzmechanismen gegen Glycopeptidantibiotika

Erst mehr als 30 Jahre nach der Markteinführung von Vancomycin erschien 1988 der erste Bericht über vancomycinresistente Enterokokken (VRE) (LeClerq *et al.* 1988). Diese Enterokokken sind zwar gewöhnlich nicht pathogen, können jedoch bei immungeschwächten Patienten tödliche Infektionen verursachen. Auch besteht die Gefahr, dass die Gene, die diese Resistenzen kodieren, auf tödlichere Bakterienarten übertragen werden. Soweit heute bekannt ist, beruht die Vancomycinresistenz nur auf der Veränderung von Vorstufen bei der Zellwandsynthese, die an der Bindung von Glycopeptidantibiotika beteiligt sind. Durch den Austausch des terminalen D-Alaninrestes durch einen D-Lactatrest in der Pentapeptid-Peptidoglycanvorstufe der Zellwand kann eine der fünf für die Bindung von Glycopeptiden wichtige Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr ausgebildet werden. Dadurch sinkt die Affinität gegenüber Vancomycin um etwa den Faktor 1000. Wegen dieser erniedrigten Bindungskonstanten ist Vancomycin kaum mehr aktiv und müsste in sehr hohen Dosen verabreicht werden. In diesem Fall ist Vancomycin kein brauchbares Antibiotikum.

Nach dem Auftreten der glycopeptidresistenten Enterokokken wurde 1996 erstmals in Japan eine Resistenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) gegen Glycopeptidantibiotika festgestellt (Hiramatsu *et al.* 1997). Dieses Vancomycin-resistente *Staphylokokkus aureus* (VRSA) blieben jedoch nicht nur auf Japan beschränkt, son-

dern es konnte eine weltweite Verbreitung gezeigt werden (Hiramatsu 2001). Bei den VRSA zeigte sich, dass hier kein Austausch des terminalen D-Alanins erfolgt war. Dennoch war es zu einer deutlichen Resistenz gegen Vancomycin im Vergleich zu Vancomycin-sensitiven *Staphylokokkus aureus* gekommen. Genauere Untersuchungen zeigten, dass hier eine Verdickung der Zellwand zu beobachten war. Da bei der Zellwandbiosynthese ca. 20% der Pentapeptide nicht quervernetzen (Hiramatsu 1998), kommt es auch bei Vancomycin sensitiven Organismen, zu einem teilweisen Abfangen der Vancomycinmoleküle („affinity trapping“). Durch die Verdickung der Zellwand können bis zu einer bestimmten Konzentration sämtliche Glycopeptidmoleküle bereits in den äußeren Zellwandschichten abgefangen werden und nicht mehr den Ort der Zellwandsynthese erreichen.

2.1.4 Hirudin

Hirudin ist ein Thrombininhibitor, der ursprünglich aus medizinischen Blutegeln stammt. Medizinische Blutegel wurden seit der Antike bis Mitte des 20. Jahrhunderts zum Blutschröpfen verwendet. Man hoffte, mit dem Blut würden die Egel auch die krankmachenden Stoffe aus dem Körper eines Patienten ziehen. Aus wissenschaftlicher Sicht ist dabei besonders interessant, dass es den Blutegeln irgendwie gelingen muss, das Blut flüssig zu halten. Im späten 19ten Jahrhundert isolierte Sir Alexander Haycraft einen Gerinnungshemmer aus dem Speichel von Blutegeln, der über mehrere Jahre von verschiedenen Wissenschaftlern untersucht, charakterisiert und Hirudin genannt wurde (Walenga *et al.* 1989). Die Struktur von nativem Hirudin wurde erstmals in den 50er Jahren aufgeklärt (Fink 1989). Hirudin ist keine einzelne, homogene Substanz, sondern beinhaltet verschiedene Varianten oder Isoformen. Diese Varianten unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz (Henschen *et. al* 1988).

Hirudine sind kleine Proteine mit einer hohen Affinität und Spezifität gegenüber Thrombin. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt bei ungefähr 7000. Die drei Hauptvarianten des Hirudins (HV-1, HV-2 und HV-3) bestehen aus 65 bzw. 66 Aminosäuren (Abb. 2-4).

HV-1 vvYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGqGNKCILGSdGekNQCVTGEGTPkPqSHNdGDFEEIPEE_YLQ
 HV-2 ITYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGKGNKCILGSnGKgNQCVTGEGTPnPeSHNnGDFEEIPEE_YLQ
 HV-3 ITYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGKGNKCILGSqGKdNQCVTGEGTPkPqSHNqGDFEPIPEdaYde

Abb. 2-4: Aminosäuresequenzen der drei Hauptvarianten des Hirudin (aus Johnson et al. 1989)

Während in der alternativen Medizin das Blutschröpfen mit gezüchteten medizinischen Blutegeln nach wie vor ein bewährtes Behandlungsverfahren gegen viele Beschwerden ist, wird in der Schulmedizin gentechnisch hergestelltes Hirudin, das sogenannte Lepirudin eingesetzt. Auf diese Weise wird eine Übertragung von Krankheitserregern durch den Blutegel vermieden. Lepirudin ist seit 1998 als therapeutisches Antikoagulanz zugelassen, wird aber bis jetzt nur in der Klinik verabreicht. Es wird entweder intravenös oder subcutan appliziert. Für eine dauerhafte Therapie sind Lepirudin-Injektionen aufgrund fehlender Langzeitstudien noch nicht in der Apotheke erhältlich.

Wirkmechanismus

Die gerinnungshemmende Wirkung von Hirudin beruht auf einer Inhibierung der Protease Thrombin. Thrombin katalysiert als Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und führt zu einer ausgeprägten Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Im Gegensatz zu Heparin, einem anderen Medikament zur Bekämpfung von Blutgerinnseln, benötigt der direkte Thrombininhibitor Hirudin nicht Antithrombin III als Kofaktor. Hirudin wird deshalb vor allem bei Patienten angewendet, die auf Heparin negativ reagieren.

Für die Bindung und Inaktivierung des Thrombins sind dabei nur die zehn letzten Aminosäuren am Carboxylrest notwendig. (Krstenansky *et al.* 1987, Mao *et al.* 1988). Die Affinitätskonstante für die Wechselwirkung liegt dabei bei $K = 10^{13} - 10^{14}$ l/mol (Rydel *et al.* 1990).

2.2 Optische Grundlagen

2.2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie ist eine markierungsfreie, direkt optische Detektionsmethode, die auf der Mehrfachreflexion (Weißlichtreflexion nach Fabry-Pérot, Hecht 1989) an dünnen Schichten beruht. Mit ihr können zeitaufgelöst Bindungsvorgänge an der Sensoroberfläche beobachtet werden. Das Prinzip ist in Abb. 2-5 dargestellt.

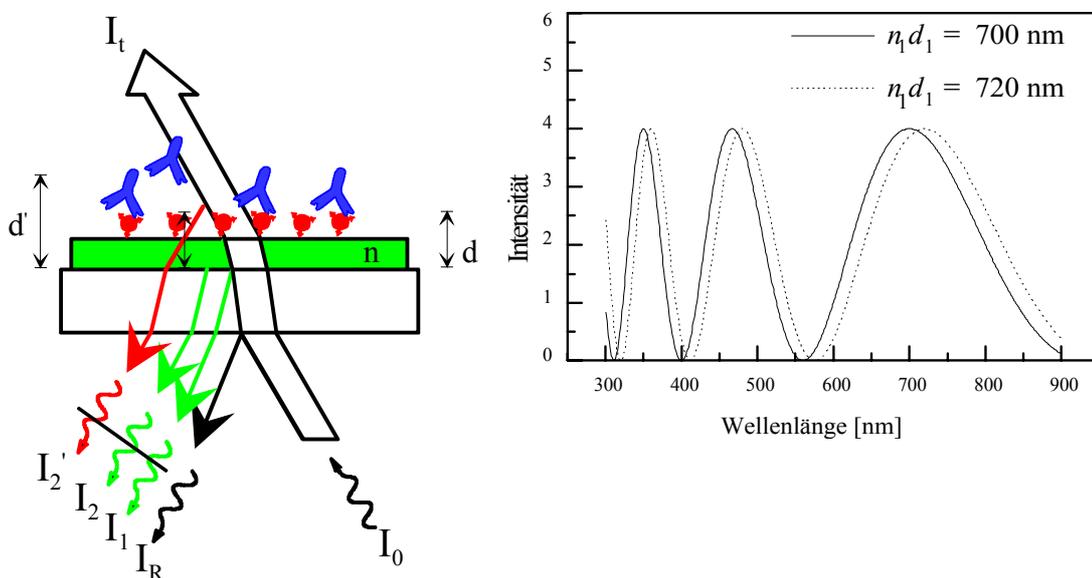


Abb. 2-5: *Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Links: symbolischer Strahlengang im RIFS-Transducer; rechts: Interferenzmuster bei zwei verschiedenen optischen Schichtdicken.*

Weißlicht wird von der Rückseite eingestrahlt, und das reflektierte Licht spektral detektiert. Durch eine Überlagerung der an den verschiedenen Phasengrenzen partiell reflektierten Teilstrahlen erhält man ein charakteristisches Interferenzspektrum. Durch Bindungsvorgänge an der Oberfläche verändert sich die optische Schichtdicke des Systems, was zu einer Verschiebung des Reflexionsspektrums führt (bei Zunahme der optischen Schichtdicke verschiebt sich das Spektrum zu höheren Wellenlängen hin). Beobachtet man die Lage eines Extrempunktes des Interferenzspektrums während des

Bindungsvorgangs, so können aus deren Verschiebung Informationen über den Bindungsvorgang gewonnen werden (Brecht *et al.* 1992). Eine ausführliche Diskussion über die Theorie der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) findet sich in (Gauglitz und Nahm 1991) und in den Dissertationen von G. Kraus 1993 und A. Brecht 1993.

2.2.2 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten

Betrachtet man einen Lichtstrahl, der unter einem Winkel Θ_i auf eine ebene Grenzfläche fällt, so wird ein Teil des Lichtes unter dem Winkel Θ_r reflektiert und der andere Teil tritt unter Brechung in das zweite Medium ein. Für die Transmission gilt das Gesetz von Snellius:

$$n_i \cdot \sin \Theta_i = n_t \cdot \sin \Theta_t \quad (3)$$

n_i und n_r bezeichnen dabei die Brechungsindices der beiden Medien.

Für die Reflexion gilt: $\Theta_i = \Theta_r$

Mit Hilfe der aus den *Maxwellschen Gleichungen* ableitbaren *Fresnelschen Gleichungen* lässt sich der Einfall von Licht auf eine Grenzfläche beschreiben (Hecht 1989, Bergmann und Schäfer 1993).

Damit Interferenzeffekte reflektierter Teilstrahlen beobachtet werden können, müssen kohärente Lichtstrahlen auf planparallele Schichten fallen, deren Schichtdicken wiederum im Bereich der Kohärenzlänge liegen. Auf Grund der sehr kleinen Kohärenzlänge von Weißlicht ist dies nur dann zu erwarten, wenn die Schichtdicke einige μm nicht überschreitet (Gauglitz 1996).

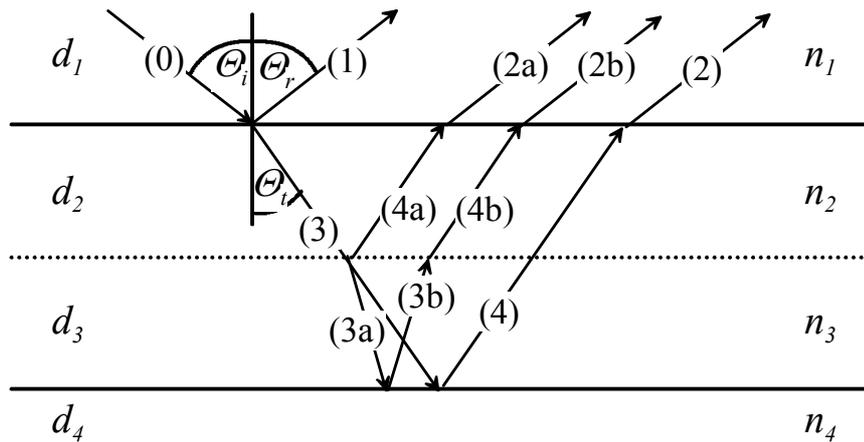


Abb. 2-6: Mehrfachreflexion an dünnen Schichten der Schichtdicke d_j und des Brechungsindex n_j . Nach Reflexion (1) und Brechung (3) des einfallenden Strahls (0) an der ersten Phasengrenze gelten für den weiteren Verlauf der Teilstrahlen die durchgezogenen Linien für $n_2 = n_3$ (Einschichtsystem) und die gestrichelten Linien für $n_2 < n_3$ (Zweischichtsystem).

2.2.2.1 Einschichtsysteme (Substrat/Interferenzschicht/Superstrat)

Für den Fall, dass bei senkrechtem Lichteinfall gemessen wird, entspricht der Gangunterschied der beiden reflektierten Teilstrahlen der zweifachen Schichtdicke. Wenn keine Phasensprünge an den Grenzflächen auftreten, so ergibt sich für die reflektierte Intensität bei Interferenz der reflektierten Strahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2

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

Die Intensität des reflektierten Lichts ist somit abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes (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 Reflektivität R gibt dabei den Anteil der eingestrahnten Intensität an, der reflektiert wird an. An der Phasengrenze zweier unendlicher Halbräume a und b gilt:

$$R = \left(\frac{n_a - n_b}{n_a + n_b}\right)^2 \quad (5)$$

Aus Gl.(4) folgt als Bedingung für das Auftreten von Extrempunkten:

$$\frac{2nd}{\lambda} = 1, 2, 3, \dots \quad \text{bzw.} \quad \frac{2nd}{\lambda} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \quad (6)$$

Bei Kenntnis der Ordnung m_i eines Extrempunktes kann mit Hilfe des gemessenen Reflexionsspektrums die optische Schichtdicke berechnet werden (Krauss 1992).

2.2.2.2 Theorie von Multischichtsystemen

An den Phasengrenzen verschiedener Schichten gilt, dass die elektrischen und magnetischen Felder stetig sind. Für den Spezialfall des senkrechten Lichteinfalls lässt sich für das im vorherigen Kapitel beschriebene Einschichtsystem die Abhängigkeit des Reflexionsverhältnisses r vom Transmissionskoeffizienten t wie folgt beschreiben:

$$\begin{bmatrix} 1 \\ n_{\text{Substrat}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -n_{\text{Substrat}} \end{bmatrix} r = M \begin{bmatrix} 1 \\ n_{\text{Superstrat}} \end{bmatrix} t \quad (7)$$

(Eine detaillierte Beschreibung der Reflektivität und Transmission von Multischichtsystemen findet sich in Fowles 1989)

M wird dabei als Transfermatrix des Interferenzfilmes bezeichnet. Sie lässt sich beschreiben als:

$$M = \begin{bmatrix} \cos(kd) & -\frac{i}{n_{\text{Schicht}}} \sin(kd) \\ -in_{\text{Schicht}} \sin(kd) & \cos(kd) \end{bmatrix} \quad (8)$$

$$\text{mit } k = \frac{2\pi n_{\text{Schicht}}}{\lambda}, \quad d = \text{physikalisch Schichtdicke}$$

Für den Fall mehrerer planparalleler Schichten lässt sich die Gesamttransfermatrix M als Produkt der einzelnen Transfermatrices M_i darstellen:

$$M_1 M_2 M_3 \dots M_N = M = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \quad (9)$$

Löst man nun Gl. (7) nach dem Reflexionsverhältnis r auf, so kann daraus die Reflexivität $R = |r|^2$ für das Multischichtsystem berechnet werden:

$$R(\lambda) = \left(\frac{An_{\text{Substrat}} + Bn_{\text{Superstrat}}n_{\text{Substrat}} - C - Dn_{\text{Superstrat}}}{An_{\text{Substrat}} + Bn_{\text{Superstrat}}n_{\text{Substrat}} - C - Dn_{\text{Superstrat}}} \right)^2 \quad (10)$$

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

$$IFS(\lambda) = \frac{R(\lambda)_{\text{mit Interferenzfilm}}}{R(\lambda)_{\text{ohne Interferenzfilm}}} \quad (11)$$

2.2.3 Mikroreflektometrie

Bei der reflektometrischen Interferenzspektroskopie werden Änderungen im Reflexionsspektrum, die durch Wechselwirkungsprozesse zwischen dem zu messenden Analyten und der Oberfläche zustande kommen, gemessen und ausgewertet. Dabei erfolgt eine spektrale Detektion über einen geeigneten Wellenlängenbereich (abhängig von den auftretenden Brechungsindices und Schichtdicken der Interferenzschichten). Bei dem im Arbeitskreis Gauglitz verwendeten „Standard“-Aufbau wird als Anregungsquelle eine Halogenlampe verwendet, und das Reflexionsspektrum wird spektral über ein Diodenzeilenspektrometer im Bereich zwischen 400 – 750 nm detektiert. Anschließend wird über eine Polynomanpassung 2ter Ordnung die Lage des Interferenzminimums bestimmt und daraus auf die optische Schichtdicke zurückgerechnet.

Alternativ zur Anregung mit Weißlicht kann die spektrale Information auch durch eine sequenzielle, monochromatische Anregung bei mehreren Wellenlängen gewonnen werden. Als möglicher „Monochromator“ kann hier z. B. ein Filtrerrad verwendet werden, über das einzelne, geeignete Wellenlängen aus dem Anregungsspektrum ausge-

wählt werden können. Ein solcher Aufbau wird z. B. für die parallele RfS-Detektion verwendet (Rothmund 1999) (Abb. 2-7).

Ein anderer Ansatz zur Generierung einer spektralen Information ist die Verwendung von mehreren monochromatischen Lichtquellen. Als Beispiel ist hier der Einsatz von verschiedenfarbigen Leuchtdioden zu nennen. Der in Abb. 2-8 gezeigte $4\text{-}\lambda$ -Aufbau wird bereits erfolgreich im Bereich der Gasphasendetektion eingesetzt und ist sehr ausführlich in (Reichl 2000) beschrieben. Dabei werden sequenziell aus vier verschiedenfarbigen Leuchtdioden Lichtimpulse auf die Detektionsfläche eingestrahlt und das reflektierte Licht über eine Photodiode detektiert. Der Vorteil dieses Aufbaus gegenüber dem Standard-RfS-Aufbau liegt darin, dass auf ein teures Diodenzeilenspektrometer verzichtet werden kann und somit eine ausgesprochen kostengünstige Detektionseinheit zur Verfügung steht. Gegenüber einem Aufbau mit Filterrad kann auf jegliche bewegliche Teile verzichtet werden, was zu einer deutlich höheren Robustheit des Gerätes führt.

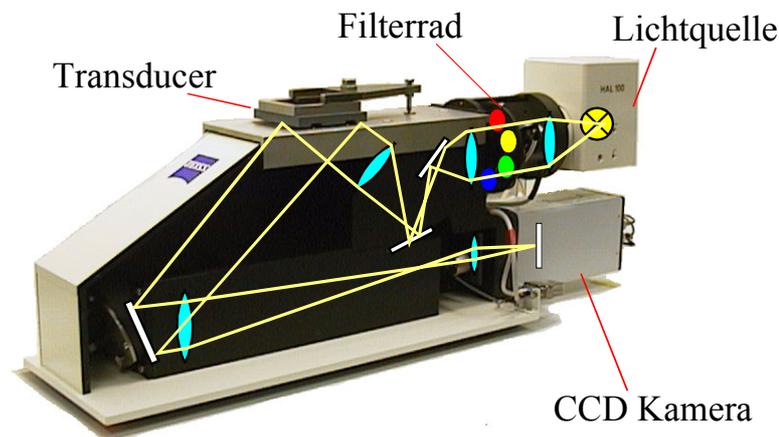


Abb. 2-7: „Demonstrator-Null“ zur parallelen RfS-Detektion. Die spektrale Information wird durch das eingesetzte Filterrad erzeugt.

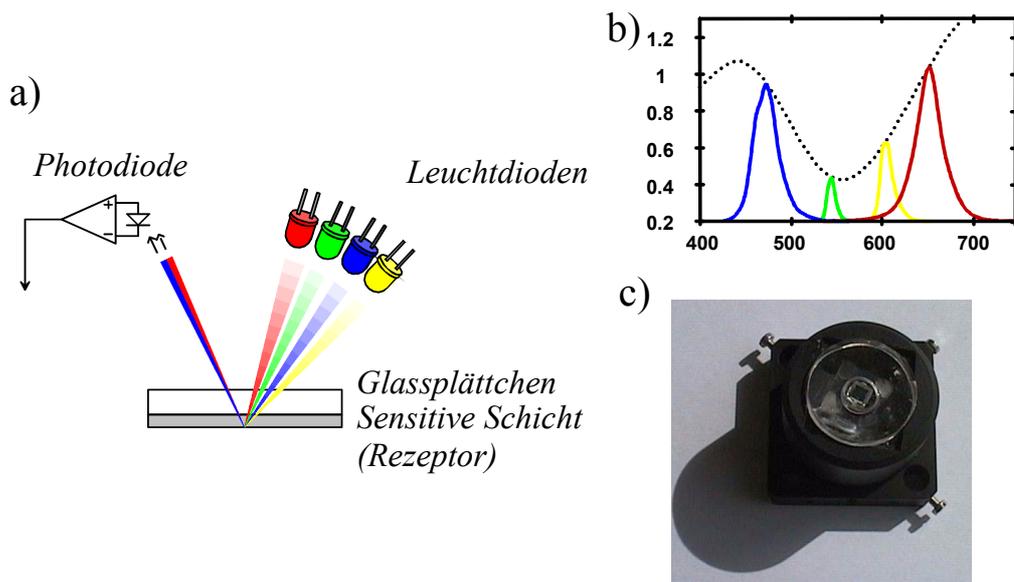


Abb. 2-8: Schema des 4-Lambda Aufbaus (a) und eines daraus resultierenden Spektrums (b), ein Funktionsmuster ist in (c) zu erkennen.

2.3 Fermenteranalytik

Die Online-Überwachung von Bioprozessen gewinnt zunehmend an Bedeutung. Ziel dabei ist es, in „Echtzeit“ Informationen über möglichst viele Variablen des beobachteten Prozesses zu erhalten. Diese Informationen sind, insbesondere zur Entwicklung und Regelung dieser Prozesse im Hinblick auf eine optimale Produktausbeute, von großer Bedeutung. Heutzutage stehen nur wenige Online-Analysensysteme zur Verfügung, die nicht-invasiv kontinuierlich und hinreichend schnell Daten liefern, und dabei den besonderen Anforderungen im Zusammenhang mit einem Fermentationsprozess genügen. Die meisten dieser Systeme sind entweder in-situ Sensoren oder Analysensysteme, die die Abluft des Prozesses überwachen. Dabei werden meistens physikalische Parameter, wie Temperatur oder Druck sowie chemische Parameter wie pH-Wert, gelöster Sauerstoff oder die Zusammensetzung der Abluft bestimmt. Zusätzlich können noch weitere Mess- und Analysensysteme zur Bestimmung des Redoxpotentials des gelösten CO_2 im Medium, der Trübung (Nepheleometrie; Turbidimetrie) als Maß für das Wachstum der Organismen, der NADH-abhängigen Fluoreszenz als indirektes

Maß für die Biomasse bzw. O₂-Versorgung oder des O₂- und CO₂-Gehalts im Abgas angeschlossen werden. Diese Messungen werden sowohl in der Industrie als auch in den Hochschulen routinemäßig durchgeführt. Allerdings liefern diese Messungen, mit Ausnahme der Abluftanalytik, wenig Informationen zum Verständnis des Prozesses.

Um detailliertere Informationen zu erhalten, ist im Allgemeinen eine manuelle Probenahme, gefolgt von einer klassischen Analysenmethoden wie z. B. der HPLC im Labor notwendig. Eine solche Analytik ist jedoch sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und führt zu einem Zeitversatz zwischen Analyseergebnis und Fermentationsprozess (Disely *et al.* 1999). Hier wäre eine Analytik wünschenswert, mit der wichtige Informationen bezüglich des Prozesses direkt online erhalten werden könnten, um schneller und gezielter auf Veränderungen im Fermentationsablauf reagieren zu können. Eine solche Online-Analyse ist durch den Einsatz biochemischer Sensoren zu erreichen. Gerade biochemische Sensoren sind aufgrund ihrer Selektivität und Spezifität in der Lage, die interessierenden Komponenten gezielt auch aus komplexen Fermentationsbrühen heraus zu detektieren. Dies würde die Optimierung eines Fermentationsprozesses wesentlich vereinfachen. Darüber hinaus kann mit solchen Analyseverfahren die Abfallmenge, die bei der Analytik entsteht, minimiert werden. Dies ist gerade in der Fermentationstechnik, wo oftmals auch umweltrelevante Stoffe zum Einsatz kommen (z.B. genmanipulierte Mikroorganismen), ein wichtiger Punkt. So darf z.B. bei der Expression des Gerinnungshemmers Hirudin in Hefen der Abfall nicht verfüttert oder anderweitig weiterverwendet werden, sondern muss einer Verbrennung zugeführt werden.

Teilweise werden bereits Biosensoren verwendet, in denen biochemische Rezeptoren (z.B. Enzyme, Antikörper...) mit geeigneten Transducern kombiniert sind. Eine Auswahl einiger solcher Biosensoren zeigt Tab. 2-3.

Rezeptor	Substrat	Transducer
Glucoseoxidase (GOD)	Glucose	pH-, O ₂ -, H ₂ O ₂ -Elektrode
Invertase, Mutorotase, GOD	Saccharose	O ₂ -Elektrode
Glutamatdehydrogenase	L-Glutaminsäure	NH ₄ ⁺ -Elektrode CO ₂ -Elektrode
Urease	Harnstoff	NH ₄ ⁺ -, pH-, CO ₂ -Elektrode
Nitirifizierende Bakterien		O ₂ -Elektrode
Penicillinase	Penicillin G	O ₂ -Elektrode

Tab. 2-3: Auswahl verschiedener Biosensoren zur Bestimmung organischer Substrate.

Die Rezeptoren sind dabei meist an oder hinter einer für die zu messende Substanz permeablen Membran immobilisiert. Durch Wechselwirkung zwischen dem spezifischen Substrat und dem Rezeptor wird eine physikochemische Veränderung verursacht, die über den Transducer detektiert wird. Als Transducer werden dabei meist unspezifische Sensoren wie O₂- oder CO₂-Elektroden verwendet.

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung eines Biosensors, der auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem Ligand und Analyt basiert. Die Verwendung von biospezifischen Wechselwirkungen als Detektionsprinzip erlaubt eine Detektion des Analyten direkt aus den komplexen Proben, wie sie im Fermenter vorliegen. Aufbereitungsschritte sind dazu nicht – oder nur in einfachster Form notwendig. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Wirkungsweise des produzierten Stoffs zu dessen Nachweis verwendet und somit nicht nur das Produkt, sondern auch die Funktionsfähigkeit gleich mitdetektiert wird.

2.4 Matrix-unterstützte-Laser-Ionisation-Time-of-flight-Spektrometrie

Traditionelle massenspektrometrische Methoden, die sich als sehr geeignet für die Analyse kleiner, niedermolekularer Substanzen gezeigt haben, sind für die Analyse von nichtderivatisierten hochmolekularen Biomolekülen schlecht geeignet. Diese Methoden erfordern, dass die Analyten als ionisierte Moleküle in die Gasphase überführt werden. Große Biomoleküle sind jedoch wegen ihrer großen Polarität wenig flüchtig. Deshalb mussten neue Ionisierungsmethoden entwickelt werden, mit denen auch große Biopolymere ionisiert und in die Gasphase überführt werden können. Neben verschiedenen anderen Ionisationsmethoden wie Felddesorption (Beckey, 1977), ^{252}Cf Plasmadesorption (Macfarlane und Torgerson, 1976) und Thermosprayionisation (Blakely et al, 1980) scheinen besonders die Elektrosprayionisation (Whitehouse *et al*, 1985) und der Beschuss mit kurzen, intensiven Laserpulsen (Laserdesorption/Ionisation (Hillenkamp und Ehring, Karas und Hillenkamp, 1989)) für die Analyse von Biomolekülen im Massenbereich von einigen tausend bis einigen hunderttausend Daltons am vielversprechendsten zu sein (Hillenkamp et al, 1991).

Bereits in den frühen 70er Jahren wurden erste systematische Versuche unternommen, mit Hilfe von Lasern organische Moleküle in ionischer Form in die Gasphase zu überführen. Dabei zeigte sich, dass ein effizienter Energietransfer eine resonante Absorption des Laserlichts durch das Molekül benötigt. D.h. Laser im fernen UV (Kopplung mit elektronischen Strukturen des Moleküls) oder im fernen IR (Kopplung mit Rotations-Schwingungs-Strukturen des Moleküls) führen zu den besten Ergebnissen. Außerdem muss die Energie innerhalb sehr kurzer Zeit auf das Molekül übertragen werden, um den thermischen Zerfall des Moleküls zu vermeiden. Typischerweise werden Laserpulse im Bereich von 1-100ns verwendet. Dabei konnten aber abhängig von der Molekülstruktur und der Molekülgröße nur Biopolymere bis 1000 Da als intakte Ionen in die Gasphase überführt werden. Der Grund hierfür liegt in der resonanten Anregung des Analytmoleküls begründet, die für den Energieübertrag notwendig war und oft-

mals zu einer Photodissoziation führt. Erst 1987 zeigten Karas und Hillenkamp, dass dieses Problem durch Verwendung einer Matrix gelöst werden kann. Dabei wird eine geringe Konzentration an Analytmolekülen in eine feste oder flüssige Matrix eingelagert. Die Matrix besteht dabei aus kleinen, stark absorbierenden Molekülen (Tanaka *et al.* 1988), die verschiedene Aufgaben übernimmt: Sie absorbiert Energie aus dem gepulsten Laserstrahl, isoliert die Probenmoleküle und verhindert dadurch die Assoziation von Analytmolekülen und somit die Bildung von zu großen Molekülen, und sie liefert photoangeregte Säure- oder Basenfunktionen für die Ionisation der Probenmoleküle (Hillenkamp *et al.* 1991). Die Energie des Lasers wird von der Matrix absorbiert, die daraufhin schnell in die Gasphase expandiert (mit eingeschlossenen Probenmolekülen). Die Ionisation erfolgt zum einen über einen Protonentransfer zwischen angeregter Matrix und dem Analytmolekül und zum anderen durch Kollision in der expandierenden Matrixwolke (Cotter, 1997; Feneslau, 1997).

Die Masse der ionisierten Moleküle wird dann meistens mit einem Time-Of-Flight-Spektrometer bestimmt. Dabei werden die Ionen durch ein konstantes elektrisches Feld auf eine bestimmte Geschwindigkeit beschleunigt. Die Geschwindigkeit ist proportional zu $(m_i/z_i)^{-1/2}$ (m_i/z_i ist das Verhältnis von Masse und Ladung der entsprechenden Ionenart). Anschließend passieren die Ionen einen feldfreien Raum und werden abhängig von ihrer Fluggeschwindigkeit aufgetrennt. Am Ende des feldfreien Raumes werden die auftreffenden Ionen schließlich detektiert (Abb. 2-9). Der Zeitunterschied zwischen der Startzeit (die für alle Ionen gleich ist) und dem Auftreffen auf dem Detektor ist proportional zu $(m_i/z_i)^{1/2}$ und wird zur Berechnung der Ionenmasse herangezogen.

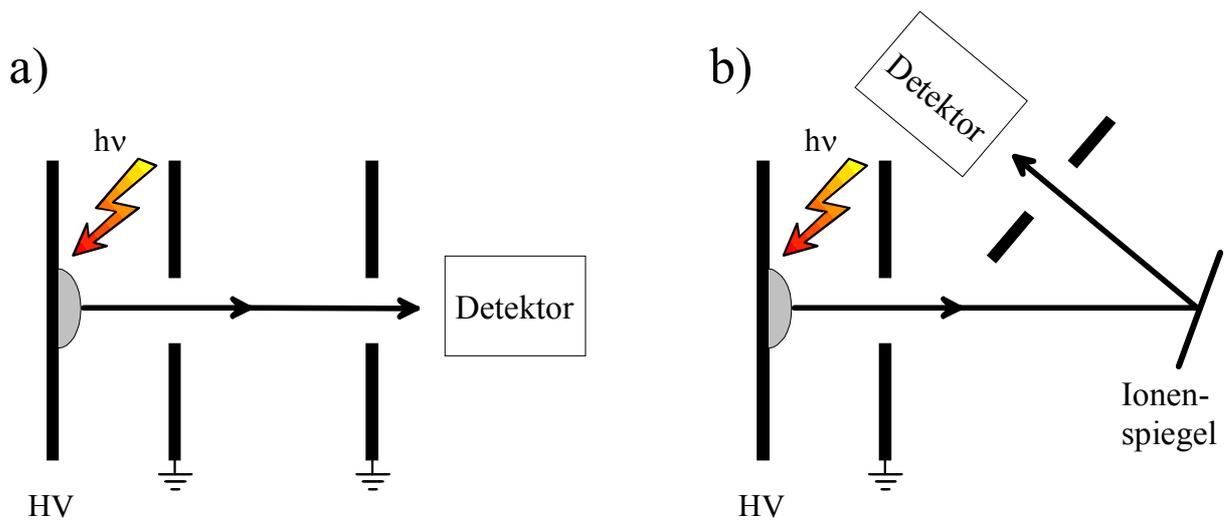


Abb. 2-9: Maldi-Tof, 2 verschiedene Anordnungen: a) lineare Anordnung, b) Reflectron TOF Massenspektrometer. Details siehe Text.

Die Grenzen der Massenauflösung $\Delta m/m$ hängen dabei von der Masse m des Ions und der Halbwertsbreite Δm ab. Die Halbwertsbreite wiederum wird beeinflusst durch die Zeit, die zur Ionisierung und zur Ablösung des Ions aus der Matrix benötigt wird, sowie der Geschwindigkeitsverteilung der Ionen vor der Beschleunigung. Deshalb werden zur Verbesserung der Massenauflösung oftmals so genannte Reflectron Anordnungen verwendet (Abb. 2-9b), da hier der Einfluss der Geschwindigkeitsverteilung stark minimiert und somit eine höhere Massenauflösung erreicht werden kann.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte

Spektrometer Spekol 1100 (Analytik Jena), modifiziert nach Schmitt et. al 1997 mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von micro-Parts, Dortmund und 5V/10W Halogenlampe mit integriertem Reflektor (Oshino Lamps, Nürnberg).

Diodenzeilenspektrometer MCS210 der Firma Zeiss, Jena; Y-Quarzlichtleiter HCP, Durchmesser 600 μm ; als Lichtquelle wurde eine 6V/20W Halogenlampe verwendet, die in eine optische Bank mit Lichtleiteranschluss eingebaut wurde.

FIA-Anlage ASIA der Firma Ismatec, Weilheim. Verwendet wurde eine Fixpumpe mit 20 Umdrehungen pro Minute sowie einer Variopumpe mit maximal 50 u/min (variabel in 100 Schritten). Die Schläuche mit Innendurchmesser von 0,25 mm (Variopumpe) und 0,95 mm (Fixpumpe) wurden ebenfalls von der Firma Ismatec bezogen.

Flusszelle aus Plexiglas mit eingefrästem Flusskanal (Tiefe ca. 0,05 mm) und Bohrungen für den Ein- und Auslass des Trägerstroms.

Hamilton Dilutor Microlab 541C und Ventilsteuerung MVP mit 1-8-Ventil von Hamilton Deutschland, Darmstadt.

Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems: Voyager DE Pro mit Reflektor.

RIfS-Biaffinity RIfS-Prototyp der Firma Analytik Jena AG.

Transducerplättchen:

D263 Glas, beschichtet mit 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2 , Firma Schott, Mainz. Größe: 1,2 x 1,2 cm^2 .

ITO-Schichten:

1 mm dicke BK7 Glasplättchen mit einer 180 nm dicken Indium-Zinn-Oxid (ITO)-Schicht wurden freundlicherweise von Herrn Martin, NMI-Reutlingen, zur Verfügung gestellt.

Mikrokonzentratoren Microcon von Millipore, Eschborn.

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 Materialien**3.2.1 Chemikalien**

DMF: Dimethylformamid, absolut, über Molekularsieb ($H_2O \leq 0,01\%$) wurde von der Firma Fluka, Neu-Ulm bezogen.

GOPTS: 3-Glycidyloxypropyl-trimethylsiloxan.

AMD: Das Aminodextran wurde nach einer Anleitung von J. Piehler hergestellt. Die dazu benötigten Dextrane wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen, bezogen.

PEG: Die Polyethylenglycole Diaminopolyethylenglycol-2000 (Diamino-PEG) und Dicarboxypolyethylenglycol-2000 (Dicarboxy-PEG) wurden von der Firma Rapp Polymere, Tübingen, bezogen.

Vancomycin: Vancomycin wurde als Vancomycin-Hydrochlorid von der Firma Fluka, Neu-Ulm, bezogen.

DIC: Diisopropylcarbodiimid wurde von der Firma Fluka, Neu-Ulm, bezogen.

OVA: Das Protein Ovalbumin wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen, bezogen.

Tripeptide: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Di- und Tripeptide wurden von Herrn Dr. Rolf Tünnemann, Arbeitsgruppe Jung, Universität Tübingen synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Lösungen

Phosphat buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) PBS:

150 mM Natriumchlorid, 10 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,4.

Carbonatpuffer pH 9,5

100 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃ pH 9,5.

Hepes-Puffer

Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005% (v/v), pH 7,04.

Piranha-Lösung:

60 Vol% konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxidlösung (30%) wurden gemischt und sofort weiterverwendet.

Regenerationslösung:

HCl-Lösung pH 1,5.

3.2.2.1 Nährlösungen

Die Angaben beziehen sich auf 1 l H₂O.

Vorkultur:	Hauptkultur:
1,5 g Glucose	20,0 g Glycerin (99%)
1,5 g Sojamehl	5,0 g Glucose
0,5 g Cornsteep flüssig	10,0 g Sojapepton
0,2 g CaCO ₃	3,0 g Hefeextract
0,5 g NaCl	3,0 g CaCO ₃
pH 7,0	pH 7,0

Beide Nährlösungen wurden nicht selber hergestellt, sondern freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wohlleben, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Bakterienstämme

Amycolatopsis orientalis ATCC 19795 (zur Produktion von Vancomycin) und

Bacillus Subtilis ATCC6633 (Indikatorstamm für Hemmhoftest)

wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wohlleben, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Entsorgung

Um der Ausbildung von Resistenzen vorzubeugen, wurde streng darauf geachtet, dass keine Lösungen, die Vancomycin oder Balhimycin enthalten, unbehandelt in den Abfluss gegeben werden. Sämtliche Abfalllösungen, die Vancomycin oder Balhimycin enthielten, wurden eingedampft, mit einer Piranha-Lösung versetzt und diese über Nacht einwirken lassen, um somit die Glycopeptide zu zerstören. Diese Lösungen wurden dann mit viel Wasser in den Abfluss gegeben.

3.3 Messmethoden

3.3.1 Messprotokolle

Die Ansteuerung der Fluidik-Analge und des Diodenzeilenspektrometers erfolgte mit dem Programm „Measure“ von G. Kraus.

Als erstes wurde durch Spülen mit Puffer eine Basislinie aufgenommen. Während dieses Schrittes wurde die Probenschleife mit der Probenlösung geladen. Anschließend erfolgte die Injektion der Probe über die Flusszelle. Danach erfolgte ein weiterer Spülschritt mit Puffer, währenddessen die Probenschleife mit Regenerationslösung gefüllt wurde. Diese wurde anschließend injiziert. Je nach Bedarf wurde der Regenerationschritt mehrmals wiederholt. Schließlich wurde nochmals eine Basislinie aufgenommen. Zur Auswertung der Interferenzspektren wurde das Programm „Ifz“ von A. Brecht verwendet. Jedes Spektrum wurde durch Aufsummieren von 30 Einzelmessungen mit einer Integrationszeit von je 150 ms mit dem Diodenzeilenspektrometer erstellt. Die einzelnen Schritte wurden hinsichtlich ihrer Dauer und der jeweiligen Fließgeschwindigkeit je nach Versuchsziel variiert.

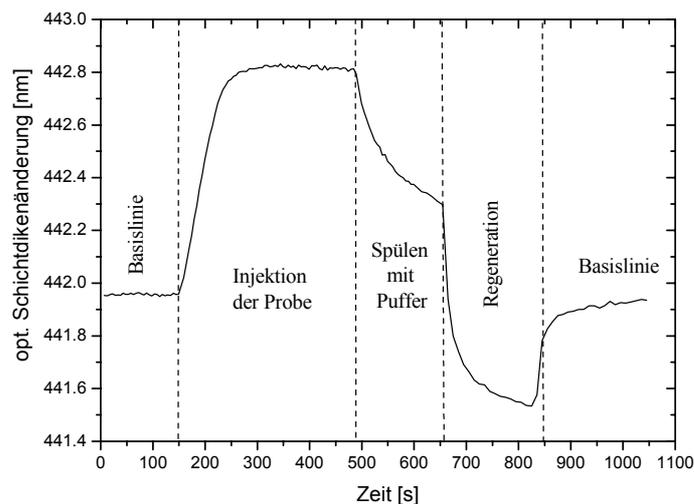


Abb. 3-1-: Prinzipieller Ablauf einer Messung.

3.3.2 Hemmhofest

Als Testkeim wurde *B. subtilis* verwendet.

Es wurden unterschiedliche Mengen (0,01 bis 2,5 µg) an Vancomycin auf eine Filterrondelle gebracht, diese auf eine mit dem Testkeim präparierte Testplatte aufgelegt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Durchmesser des Hemmhofes bestimmt.

3.3.3 HPLC-Parameter

Für die HPLC-Messungen wurden folgende Parameter verwendet:

GromSil-80 ODS-7pH (4µm), 4 x 125 mm

Eluent A: 0,1% wässrige Phosphorsäure

Eluent B: Acetonitril

Gradient:

t = 0 min 100% A

t = 2 min 100% A

t = 12 min 70% A

t = 15 min 0% A

Fluss: 1,25µl/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: UV 210 nm

3.3.4 MalDI-Messungen

Für Vancomycin:

Matrix: gesättigte Lösung von α -Cyanozimtsäure in Wasser/Acetonitril und 1% TFA

Für Proteine

Matrix: gesättigte Lösung von Sinapinsäure (Hydroxydimethoxyzimtsäure) in Wasser/Acetonitril und 1% TFA.

Es wurden jeweils 5 µl Matrix verwendet.

Alle Maldimessungen wurden von Herrn Alex Garvin (Applied Biosystems) in Allschwil (Schweiz) durchgeführt.

3.3.4.1 MALDI-RfS-Kopplung

Nach dem jeweiligen RfS-Experiment wurden die Transducer ausgebaut, mit ca. 200 μ l deionisiertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Anschließend wurden sie mit Sekundenkleber auf das MALDI-Target geklebt (siehe auch Kapitel 4.3.2.3) und bis zum Versand in die Schweiz bei -20°C gelagert.

3.4 Oberflächenmodifikationen

Reinigung und Aktivierung der Transducer

Die Transducer wurden mit einem fusselfreien Papiertuch mechanisch vorgereinigt. Anschließend wurden sie 5 min in 6N NaOH-Lösung gereinigt. Nach dem die Transducer dann mit bidestilliertem Wasser kräftig abgespült wurden, wurden sie 15 min lang mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung im Ultraschallbad gesäubert. Nach erneutem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden sie an Luft getrocknet. Die so aktivierten Oberflächen wurden sofort weiter verwendet.

Silanisierung der aktivierten Glasplättchen

Zur Silanisierung wurde GOPTS verwendet. Dazu wurden die vorgereinigten Transducer in einer trockenen Wägschale mit 10-15 μ l GOPTS betropft und ein zweites Plättchen umgekehrt aufgelegt (Sandwichverfahren). Nach etwa 1 h wurde das überschüssige GOPTS mit trockenem Aceton abgewaschen und die Glasplättchen im Stickstoffstrom getrocknet. Die so behandelten Transducer wurden sofort weiterverarbeitet, um eine Desaktivierung der Epoxygruppen durch Luftfeuchtigkeit zu vermeiden.

Die silanisierten Glasplättchen wurden dann mit 10-15 μ l einer AMD-Wasser-Lösung (1 mg AMD in 2 μ l bidestilliertem Wasser) über Nacht in einer mit Wasserdampf ge-

sättigten Atmosphäre im Sandwichverfahren inkubiert. Anschließend wurden sie mit deionisiertem Wasser gereinigt und an der Luft getrocknet.

Umsetzung der silanisierten Transducer mit PEG

Die frisch silanisierten Transducer wurden mit ca. 30 µl einer Lösung von 0,2 µg PEG in 50 µl Dichlormethan belegt. Nachdem das Dichlormethan verdunstet war, wurden die Transducer über Nacht in einem Ofen bei 70°C behandelt. Anschließend wurde das überschüssige PEG mit einem kräftigen Strahl deionisiertem Wasser abgespült.

Umfunktionalisierung der Oberflächen

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Liganden besitzen eine freie Aminofunktion, über die sie durch eine Amidbindung an die Oberfläche angebunden wurden.

Bei aminofunktionalisierten Oberflächen (AMD- bzw. Diamino-PEG-Oberfläche) musste deshalb vor der Ankupplung des Liganden eine Umfunktionalisierung der Aminofunktion in eine Carboxylfunktion stattfinden. Zu diesem Zweck wurden die aminofunktionalisierten Oberflächen mit 50 µg Glutarsäureanhydrid versetzt und im Sandwichverfahren mindestens 2 h bei 70°C umgesetzt. Anschließend wurden die Transducer zuerst mit DMF und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

3.4.1 Immobilisierung von Acetyl-L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin (AcKaa)

Carboxylfunktionalisierte Transducer wurden mit 5-10 µl einer NHS/DIC-Lösung (1 M NHS, 1,2 M DIC in DMF) mindestens 2 h in einer mit DMF gesättigten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit DMF und deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde der Ligand in möglichst wenig DMF gelöst (1-2 mg Ligand pro 10 µl DMF) und die aktivierten Transducer mit ca. 10 µl dieser Lösung wenigstens 48 h in einer DMF-Atmosphäre im Sandwichverfahren inkubiert. Abschließend wurde mit DMF und deionisiertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.4.2 Immobilisierung von Antikörpern

Sämtliche Antikörper in dieser Arbeit wurden online (d.h. unter Beobachtung der Reaktion mit RfS) im Flusssystem immobilisiert. Dazu wurde ein carboxylfunktionalisierter Transducer eingebaut und mit Puffer äquilibriert. Anschließend wurden 100 bis 150 μL einer Lösung aus 37,5 mM EDC / 100 mM NHS in deionisiertem Wasser injiziert. Nach einem kurzen Spülschritt wurden 100 μl einer Lösung des Antikörpers (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 nM NaOAc-Puffer) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Anschließend wurde gründlich mit PBS gespült. Nicht umgesetzten Aktivestergruppen wurden dann durch eine zweiminütige Injektion einer Ethanolamin-Lösung (1 M, pH 8) deaktiviert.

3.4.3 Herstellung ACA-BSA

Aktivierung der Atrazincapronsäure

5 mg (16,6 μmol) Atrazincapronsäure (ACA) wurden zu einer gerührten, eisgekühlten Lösung N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (5,1 mg $\hat{=}$ 24,6 μmol) und N-Hydroxysuccinimid (2,9 mg $\hat{=}$ 25 μmol) in 200 μl absolutem DMF gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert und der entstandene Analytderivat-NHS-Aktivester abdekantiert.

Kopplung von Atrazincapronsäure an BSA

5 mg (76 nmol) BSA wurden in 2,5 ml Carbonatpuffer pH 9,5 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 27,5 μl ($\hat{=}$ 2,28 μmol , 30-facher Überschuss) der zuvor hergestellten ACA-NHS-Lösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend mit Microcon aufgereinigt und in PBS-Puffer umgepuffert. Der Markierungsgrad wurde UV-spektrometrisch bestimmt (Schobel 1999).

3.4.4 Immobilisierung von Biotin

Die Immobilisierung von Biotin erfolgte nach einem Protokoll von Birkert 1998:

Eine Lösung von 1 mg (4 μMol) Biotin und 1,4 mg (4,4 μMol) TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) in 50 μl DMF wurde hergestellt. Dabei löste sich das Biotin allerdings kaum. Zu dieser Suspension gibt man 4 μl (23,3 μMol) DIPEA (Diisopropylethylamin) und schüttelt kräftig durch, bis kein Niederschlag mehr zu erkennen ist. Von diesem Reagenz gab man dann sofort 5 μl auf einen entsprechend vorbehandelten Transducer (Sandwichverfahren, DMF-Atmosphäre). Nach 30 min war die Reaktion abgeschlossen und die Transducer wurden mit bidestilliertem Wasser abgespült.

3.4.5 Immobilisierung von Avidin

Avidin wurde wie die Antikörper online im Flusssystem immobilisiert. Dazu wurde ein biotinylierter Transducer eingebaut und mit Puffer äquillibriert. Anschließend wurden 100 - 200 μL einer Lösung aus 50 $\mu\text{g/ml}$ Avidin in PBS injiziert. Zum Schluss wurde gründlich mit PBS gespült.

3.4.6 Biotinylierung von Antikörpern

1 mg Biotin-NHS ($\approx 2,9 \mu\text{mol}$) wurden in 100 μl DMF (trocken, gekühlt) gelöst ($\approx 29,5 \text{ mMol}$). 1 μl dieser Biotin-NHS-Lösung wurden zu einer gerührten und gekühlten Lösung von 0,1 mg Antikörper in 0,1 ml Carbonatpuffer pH 9,5 gegeben. Die Reaktionslösung wurde 2-4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend mit Microcon aufgereinigt und in PBS-Puffer umgepuffert (Hofmann *et al.* 1977, Bayer *et al.* 1980)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Online-Überwachung von Fermentationsprozessen

Viele pharmazeutisch relevanten Substanzen, die über eine klassische chemische Synthese kaum oder nur in sehr geringen Mengen hergestellt werden können, werden heutzutage biotechnologisch produziert. Z. B. werden Antibiotika, Proteine und bestimmte Nahrungsmittelzusätze mit Hilfe von Mikroorganismen in großen Fermentern hergestellt.

In Kapitel 2.2.3 wurde die Notwendigkeit zur Überwachung dieser Prozesse bereits ausführlich behandelt. Dabei werden bei den meisten dort vorgestellten Systemen jedoch nur sehr allgemeine physikalische und chemische Parameter wie Temperatur, gelöster Sauerstoff, pH-Wert oder optische Dichte während des Prozesses überwacht (Disely *et al.* 1999). In den meisten Fällen kann jedoch dadurch weder eine qualitative noch eine quantitative Aussage über die gewünschte Komponente getroffen werden. Um den Fortgang der Fermentation in Bezug auf die Konzentration des gewünschten Produktes oder verschiedener Substrate zu überwachen, kommt mit Ausnahme einiger weniger in-situ-Sensoren, wie z.B. für den Glucosenachweis (Filipini *et al.* 1991), normalerweise die HPLC zum Einsatz (Liu *et al.* 2001). Gerade hier können Biosensoren eine Alternative zur klassischen Analytik sein, da mit ihnen sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die interessierende Komponente gewonnen werden können.

4.1.1 Online-Bestimmung der Vancomycinkonzentration während eines Fermentationsprozesses

Vor dem oben aufgeführten Hintergrund sollte die prinzipielle Möglichkeit der produktspezifischen Online-Überwachung eines Fermentationsprozesses mit Hilfe eines Biosensorsystems basierend auf der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) am Beispiel des Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin überprüft werden.

Dabei sollte die Eigenschaft des Vancomycins, sehr selektiv an Peptide zu binden, deren Proteinsequenz mit D-Ala-D-Ala endet, genutzt werden, um den Wirkstoffgehalt im Kulturmedium zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde N- α -acetyliertes L-Lys-D-ala-D-ala kovalent über die ϵ -Aminofunktion des Lysins auf der Oberfläche immobilisiert. In (Mehlmann 1999) wurden hierzu bereits grundlegende Untersuchungen zur Wechselwirkung von Vancomycin mit immobilisiertem L-Lys-D-ala-D-ala und zur reflektometrischen Charakterisierung unterschiedlicher Sensoroberflächen bezüglich ihrer unspezifischen Wechselwirkungen und der Regenerierbarkeit ausführlich beschrieben. Im Folgenden soll deshalb nur eine kurze Zusammenfassung gegeben werden.

Ziel war es, das System Vancomycin-D-Alanin-D-Alanin mit RfS zu charakterisieren. Dies sollte als vorbereitende Untersuchung für eine Überwachung der Vancomycin-Produktion in dem komplexen Medium eines Fermentationsprozesses mit RfS erfolgen.

Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt verschiedene Transducer hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert. Dabei zeigte sich der prinzipielle Unterschied zwischen Transducern, die zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen mit AMD oder mit PEG modifiziert wurden. So zeigten AMD-modifizierte Transducer, wie aufgrund der hydrogelartigen Struktur zu erwarten ist, ein deutlich größeres Signal als PEG-Transducer, da bei Modifikation mit AMD mehr als eine Monolage binden kann. Auch in ihrer Kinetik unterscheiden sich beide Transducer stark voneinander. Es wurde qualitativ gezeigt, dass das Problem der Rückbindung bei AMD-Transducern eine wesentlich größere Rolle spielt. Durch die Rückbindung wird die Dissoziationsrate unterschätzt, was sich auch stark auf die Bestimmung der Assoziationsrate auswirkt. AMD-Transducer zeigten eine wesentlich langsamere Kinetik als PEG-modifizierte Transducer.

Die Bestimmung der heterogenen Affinitätskonstanten für die Reaktion von Vancomycin mit immobilisiertem L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin ergab Werte zwischen $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und $8,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Dabei zeigte sich, dass der Wert der gemessenen Affinitätskon-

stante vom jeweils verwendeten Transducer abhing. Transducer mit hoher Ligandendichte auf der Oberfläche zeigten größere Affinitätskonstanten als Transducer mit niedriger Dichte an immobilisiertem Ligand. Dies lag vermutlich zum einen an den kooperativen Eigenschaften des Vancomycins, die bei der Dimerisierung und der Ligandbindung auftreten, zum anderen aber auch an einer Unterschätzung der Dissoziationsratenkonstante durch die auftretende Rückbindung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine prinzipielle Überwachung der Vancomycin-Produktion in einem Fermentationsprozess möglich ist. Dabei stellte sich heraus, dass Fermenterproben, die allein durch Zentrifugieren aufgearbeitet wurden, eine deutliche unspezifische Bindung auf den verwendeten Transducern zeigten. Durch Verdünnen der Proben konnte dieses Problem vermieden werden. Zumindest bei Proben, die einen hohen Gehalt an Vancomycin aufweisen, war diese Verdünnung sogar notwendig, um die Konzentration des Vancomycins innerhalb des dynamischen Bereichs zu halten. Bei Proben mit niedrigem Vancomycingehalt konnte die Verdünnung aber problematisch werden, da dann unter Umständen die Vancomycinkonzentration unter die Bestimmungsgrenze, evtl. sogar unter die Nachweisgrenze fiel.

Am Beispiel eines weiteren Glycopeptid-Antibiotikums, des Balhimycins, konnte gezeigt werden, dass die Messung der Produktkonzentration in einem Fermenter auch für andere Glycopeptide möglich ist.

Die beschriebenen ersten Ergebnisse zur Fermenterüberwachung wurden allerdings noch nicht mit Methoden der klassischen Analytik überprüft. Dies soll im folgenden Abschnitt behandelt werden.

4.1.1.1 Referenzanalytik mit MS

Die besondere Stärke von Biosensoren liegt darin, aus komplexen Systemen selektiv und sensitiv Zielsubstanzen in kurzen Zeitintervallen zu erfassen. Die Kulturbrühe aus dem Fermenterprozess stellt mit ihrem Gehalt an verschiedensten Proteinen, DNA-Partikeln und weiteren Komponenten eine sehr komplexe Matrix dar. Gerade deshalb

muss bei der Entwicklung von entsprechenden Sensoroberflächen ein besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen gerichtet werden (Mehlmann 1999).

Um zu überprüfen, ob mit der hier vorgestellten Methode zur Konzentrationsbestimmung auch ausschließlich Vancomycin und nicht etwaige andere Substanzen detektiert wurden, wurden die Sensordaten mit Methoden der klassischen Analytik überprüft. Zu diesem Zweck wurden die zellfreien (siehe auch 4.1.2.1) Fermenterproben zuerst mittels HPLC aufgereinigt und anschließend die Konzentration an Vancomycin über UV-Detektion bestimmt.

Es zeigte sich, dass mit beiden Messverfahren prinzipiell der gleiche Verlauf der Produktbildung gemessen wurde (Abb. 4-1). Allerdings lagen die mit RfS bestimmten Werte in (Abb. 4-1) um etwa das Vierfache über den mit HPLC-UV bestimmten Werten. Bei anderen Fermentationsläufen war dieser Unterschied zwischen den RfS- und den HPLC-Ergebnissen etwas geringer (Daten nicht gezeigt). Die mit HPLC bestimmten Konzentrationen lagen aber immer im Bereich von 50 – 80% gegenüber den mit RfS gemessenen. Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn anstelle der HPLC-UV-Messung eine HPLC-MS-Kopplung als Referenzanalytik verwendet wird (Tünnemann 2000). Hierfür konnten im Wesentlichen zwei Faktoren verantwortlich sein.

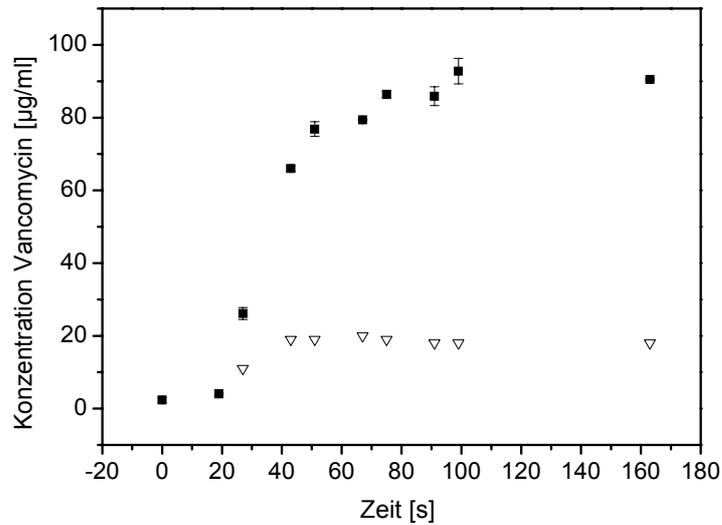


Abb. 4-1: Verlauf der Vancomycin-Konzentration während des Fermentationsprozesses. Die HPLC-Messungen (▼) ergeben eine Konzentration an Vancomycin, die deutlich geringer ist als diejenige, die aus den RfS-Messungen (■) erhalten wurden.

Zum einen war es möglich, dass trotz der aufwendigen Oberflächenchemie zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen Fremdproteine aus der Fermentermatrix an die RfS-Oberfläche binden und somit das Ergebnis verfälschen. Zum anderen kann bei der reflektometrischen Detektion auch eine sogenannte „ungewollt-spezifische“ Wechselwirkung zwischen Sensoroberfläche und Molekülen aus der Probenmatrix auftreten. Solche ungewollten Wechselwirkungen können zustande kommen, wenn im Kulturmedium Substanzen oder Nebenprodukte gebildet werden, die zwar dieselbe oder eine ähnliche spezifische Bindungstasche wie das zu detektierende Produkt aufweisen, sich aber sonst von diesem unterscheiden. Dies könnten im Falle der Fermentation von Vancomycin z. B. Substanzen sein, die das gleiche Peptidgerüst besitzen, sich aber im Glycosylierungsmuster unterscheiden. Diese Moleküle sollten dann ebenfalls eine antibiotische Aktivität zeigen, d.h. ebenfalls an die Sensoroberfläche binden und somit das Signal verfälschen. Diese ungewollt-spezifischen Wechselwirkungen stellen dann ein generelles Problem dar, wenn biologische Wechselwirkungen als Erkennungsprinzip verwendet werden. In den Fällen, in denen solche Neben-

produkte auftreten, kann ein Sensorsystem, das auf biologische Wechselwirkungen beruht, nur bedingt eingesetzt werden. Dennoch kann gerade diese Eigenart solcher Sensorsysteme auch große Vorteile mit sich bringen. Da als spezifisches Erkennungsprinzip die biologische Funktionsweise (hier die antibiotisch wirkende Anbindung von Vancomycin an D-Alanin-D-Alanin) ausgenutzt wird, erhält man nun die Möglichkeit die (biologische) Funktionalität des Produktes direkt zu überprüfen. Dies ist insbesondere dann von großem Vorteil, wenn das gewünschte Produkt ein komplexes Protein (z.B. ein rekombinanter Antikörper) ist. Es werden somit nur korrekt gefaltete und damit biologisch aktive Proteine erkannt.

Eine genauere Auswertung der HPLC-Chromatogramme zeigte, dass neben Vancomycin auch andere Substanzen in der Fermenterprobe zugegen sind, deren UV-Spektren dem des Vancomycins sehr ähnlich sind. Bezieht man diese Substanzen unter der Annahme, dass für sie die gleiche Kalibrierfunktion wie für Vancomycin gilt, in die quantitative Analyse mit ein (da diese Substanzen unbekannt waren und nicht als Reinsubstanz vorlagen, konnte auch keine genaue Kalibrierung erfolgen), so ergibt sich ein deutlich kleinerer Unterschied zwischen den RfS- und HPLC-Messungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass wohl eher „ungewollt-spezifische“ Wechselwirkungen als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind, und nicht die unspezifische Bindung an die Oberfläche.

Die Fremdsubstanzen, die ebenfalls eine spezifische Wechselwirkung mit D-Ala-D-Ala zeigen, müssten also auch dieselbe biologische Wirkungsweise wie Vancomycin zeigen, also antibiotische Wirkung besitzen. Um dies näher zu untersuchen, wurden die mit RfS erhaltenen Daten mit der antibiotischen Wirkung der Fermenterproben korreliert.

4.1.2 Hemmhofstest

Um zu demonstrieren, dass die reflektometrischen Sensordaten mit der biologischen Aktivität zusammenhängen, wurde ein Hemmhofstest durchgeführt. Über einen solchen Test kann die antibiotische Wirkung von Substanzen bestimmt werden. Hierzu wird ein Testkeim mit verschiedenen Konzentrationen an Antibiotikum bzw. der zu untersuchenden Probe versetzt, und die Hemmwirkung des Bakterienwachstums über den Durchmesser des Hemmhofs quantifiziert. Der Logarithmus der Antibiotikakonzentration steht dabei in linearem Zusammenhang mit dem Durchmesser des Hemmhofs (Schlegel 1981). Nach Aufnahme einer Kalibriergeraden kann dann die Konzentration des Antibiotikums bestimmt werden.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an Vancomycin auf eine Filterrondelle gebracht und diese auf eine Testplatte aufgelegt. Als Testkeim wurde *B. subtilis* verwendet. Nach Inkubation über Nacht wurden die Hemmhofdurchmesser bestimmt. Die daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abb. 4-2 zu sehen.

Anschließend wurden jeweils 20 μ L der zu unterschiedlichen Zeiten des Fermentationsprozesses gezogenen Fermenterproben auf eine Filterrondelle gebracht, ebenfalls über Nacht inkubiert und der Durchmesser des Hemmhofs bestimmt. Über die Kalibriermessung kann dann die Menge an antibiotisch wirksamer Substanz bestimmt und daraus die Konzentration berechnet werden. Damit kann der Verlauf der Antibiotikakonzentration während des Fermentationsprozesses verfolgt werden. Die hieraus erhaltenen Daten stimmen sehr gut mit den RfS-Messungen überein (Abb. 4-3). Mit dem Biosensor wird also direkt die antibiotische Aktivität gemessen. Gegenüber dem klassischen Hemmhofstest, bei dem die antibiotische Wirkung erst nach Inkubation über Nacht bestimmt werden kann, ergibt sich bei Verwendung des Biosensors ein erheblicher Zeitgewinn.

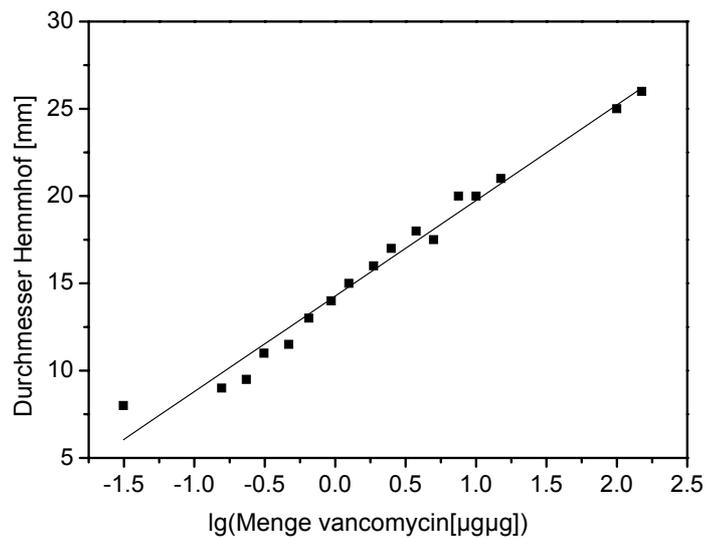


Abb. 4-2: Kalibriermessung für den Hemmhoftest. Aufgetragen ist der Durchmesser des Hemmhofs gegen den Logarithmus der eingesetzten Menge an Vancomycin.

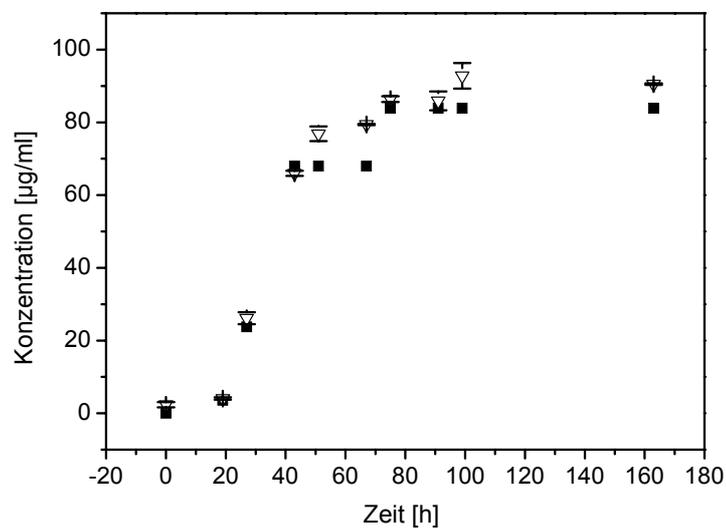


Abb. 4-3: Auswertung des Hemmhoftests. Die über den Hemmhoftest (■) bestimmte antibiotische Aktivität der Fermenterproben stimmt sehr gut mit den Biosensordaten (▽) überein.

4.1.2.1 Vergleich verschiedener Probennahmen

Zur Analyse der Fermenterproben benötigt man ein zellfreies Medium, da sonst mit einem Verstopfen der Schläuche und Ventile der FIA-Anlage zu rechnen ist. Während bei den Vorversuchen in (Mehlmann 1999) dazu die Proben zentrifugiert und nur der Überstand analysiert wurden, sollten nun die Zellen gleich bei der Probennahme aus dem Fermenter über eine Filtrationseinheit im Fermenter zurückgehalten und somit eine zellfreie Lösung gewonnen werden. Eine solche Vorgehensweise ist aus Gründen der einfacheren Automatisierbarkeit dem Zentrifugieren vorzuziehen. Dazu muss allerdings gewährleistet sein, dass die gemessenen Produktkonzentrationen im Kulturmedium mit den Konzentrationen im Zentrifugat übereinstimmen. Für eine zuverlässige Bestimmung der Produktkonzentration sollte das gewünschte Produkt nahezu vollständig aus den produzierenden Zellen ins Kulturmedium abgegeben werden. Andernfalls müsste in den Probennahmeprozess noch ein zusätzlicher Schritt integriert werden, in dem die Zellen vor dem Filtrieren aufgeschlossen werden.

Um im Fall der Vancomycindetektion eine zellfreie Probe zu erhalten, wurde ein Membranfilter direkt im Fermenter eingesetzt. Ein Vergleich von Proben, die zentrifugiert bzw. filtriert wurden, zeigte, dass der Vancomycingehalt in beiden Proben gleich groß ist (Abb. 4-4). Somit kann auf eine Zentrifugationsschritt bei der Probenvorbereitung verzichtet werden, wodurch eine Automatisierung des Analyseprozesses deutlich vereinfacht wird.

Bei allen Filtrationsschritten in einem Fermentationprozess kann es Probleme mit dem so genannten „Fouling“ des Filters geben. Diese Probleme traten jedoch bei keinem der durchgeführten Fermenterläufe auf. Somit kann der Zentrifugationsschritt durch einen Filtrationsschritt ersetzt werden.

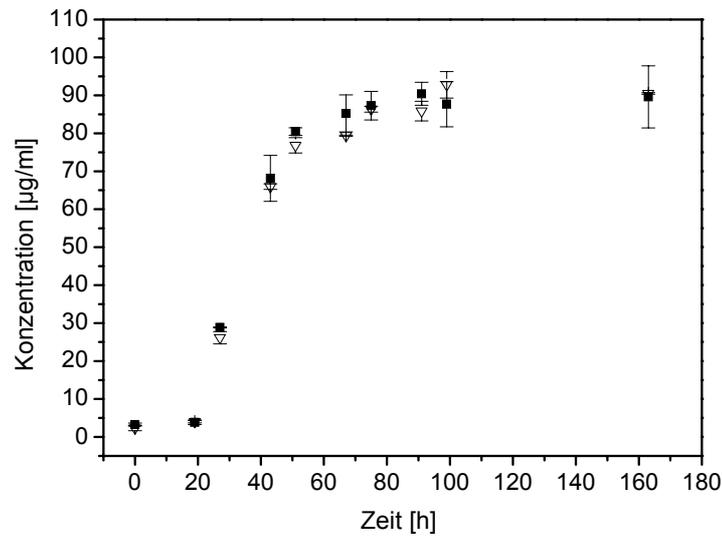


Abb. 4-4: Vergleich der Proben die über das Filtrationsmodul (▽) bzw. über einen Zentrifugationsschritt (■) aufgereinigt wurden. Beide Proben zeigen dieselbe Konzentration an Vancomycin.

4.1.3 Hirudin

Eine differenzierte Steuerung der Blutgerinnung ist von enormem medizinischem Interesse. Eine Vielfalt pharmazeutisch wirksamer Koagulantien und Antikoagulantien befindet sich im Einsatz. Dabei stellt das aus 65 Aminosäuren bestehende Polypeptid Hirudin, das im Speichel des Blutegels *Hirudo medicinalis* vorkommt, das wirksamste natürliche Antikoagulanz dar. Dieses Polypeptid hemmt spezifisch die Serin-Protease Thrombin und damit deren Wirkung auf Blutplättchen und insbesondere die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Wie bei Faktoren der Blutgerinnung, die bereits biotechnologisch hergestellt werden (z.B. Faktor VIII), verspricht man sich auch von der rekombinanten, industriellen Herstellung des Hirudins bzw. von dessen Derivaten einen Fortschritt in der medizinischen Prophylaxe bis hin zur Intensivmedizin. Es wurde gezeigt, dass die direkte Inhibition der Thrombin-Aktivität durch rekombinantes Hirudin das Wachstum von Thromben quantitativ verhindert und die Auflösung bereits bestehender Thromben in der Maus induziert. Medizinische Studien und Vergleiche mit anderen Antikoagulantien, wie z.B. das routinemäßig eingesetzte Heparin oder

Aspirin, zeigen, dass Hirudin deren Wirkung bei weitem übertrifft (Nicastro *et al.* 1997).

Hirudin wurde deshalb bereits in verschiedenen Organismen rekombinant in löslicher Form hergestellt, wobei sowohl prokaryontische (z.B. *Escherichia coli*) als auch eukaryontische Systemen (z.B. die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt wurden. Verschiedene Formen des Hirudins, wie z.B. N- oder C-terminal eingekürzte Varianten und Aminosäureaustausch-Analoga, wurden exprimiert und haben zum heutigen Verständnis der molekularen Hirudin-Thrombin-Wechselwirkung beigetragen. Die Aufklärung der 3D-Struktur des Hirudins durch NMR-Techniken sowie die Röntgenstrukturanalyse des Hirudin-Thrombin-Komplexes führen insbesondere zur Entwicklung neuer Hirudin-Derivate mit medizinischem Potential. So konnte nachgewiesen werden, dass besonders die hochflexible C-terminale Region des Hirudins für die antithrombotische Wirkung verantwortlich ist, während der feste Core-Bereich des Polypeptids bzgl. dieser Wechselwirkung eine untergeordnete Rolle spielt (Meyer *et al.* 1998).

Die klassische Analytik des Hirudins erfolgt in der Regel außerhalb des Fermenters. Sie besteht aus einer Aneinanderreihung mehrerer Schritte und zeichnet sich deshalb durch einen relativ hohen Zeitaufwand aus.

Analog zur Detektion von Vancomycin sollte nun getestet werden, ob auch Hirudin mittel RIFS quantifiziert werden kann, um auch hier eine Online-Überwachung zu ermöglichen.

4.1.3.1 Indirekte Detektion von Hirudin über einen kompetitiven Assay

Die direkte Detektion von Hirudin über immobilisierte α -Hirudin Antikörper erwies sich als außerordentlich schwierig und führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Deshalb wurde Hirudin über ein indirektes Testformat quantifiziert.

Zur indirekten Detektion von Hirudin wurde der Thrombininhibitor Thrombostop, der freundlicherweise von Dr. Peter Eckhard, Knoll AG, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt wurde, kovalent über freie Aminofunktionen an die Oberfläche gebunden. Anschließend wurde eine Lösung von 1 µg/ml Thrombin mit verschiedenen Konzentrationen an Hirudin vorinkubiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min wurde die Konzentration an freiem Thrombin im Durchfluss mit RIfS bestimmt (Abb. 4-5). Die Detektion von freiem Thrombin erfolgte dabei an Transducern, auf denen durch hohe Konzentrationen an immobilisiertem Inhibitor die Bindung diffusionskontrolliert verlief. Unter diffusionslimitierten Bedingungen ist die Steigung der Bindungskurve direkt proportional zur Konzentration des freien Rezeptors in Lösung. (Da praktisch jedes ankommende, freie Rezeptormolekül direkt an die Oberfläche gebunden wird, spielt die Kinetik für die Reaktion an der Oberfläche keine Rolle.) Durch lineare Regression der diffusionslimitierten Bindungskurven wurden die Steigungen bestimmt. Die Steigungen wurden auf die Steigung der Bindungskurve ohne Hirudin Zugabe normiert und gegen den Logarithmus der zugehörigen Hirudinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung wurde dabei in einem Bereich vorgenommen, in dem die Konzentration der Probenlösung in der Flusszelle konstant war. Vor jeder Messreihe wurden zusätzlich drei Blanks (Konzentration an Hirudin = 0) vermessen. Innerhalb einer Messreihe wurde die Ligandkonzentration in steigender Reihenfolge vermessen. Insgesamt wurde jede Konzentration dreifach gemessen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Regeneration erfolgte mit einer HCl-Lösung mit pH = 1.75.

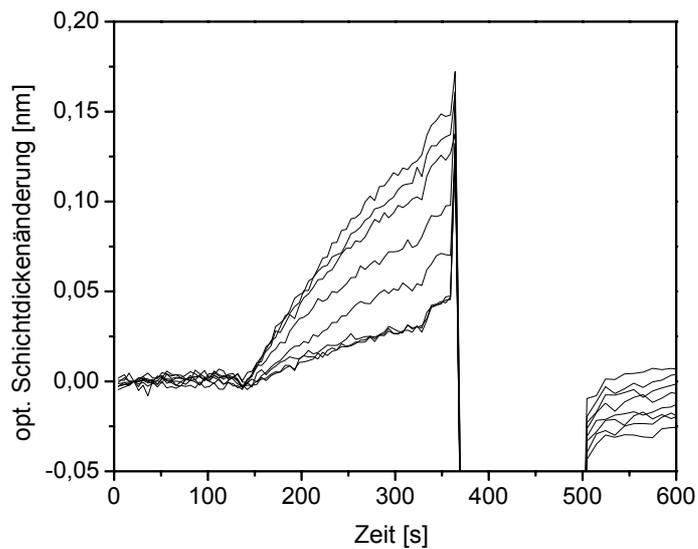


Abb. 4-5: Bindungskurven für die Titration von Thrombin mit Hirudin. Die eingesetzten Konzentrationen an Hirudin sind entsprechend den Kurven von oben nach unten: 0; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$.

Die Auswertung der Bindungskurven ist in Abb. 4-6 zu sehen.

Eine Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung von Thrombin zu Hirudin ist wegen ihres hohen Wertes nicht möglich. Zusätzlich sind in Abb. 4-6 berechnete Titrationskurven mit angenommenen Werten für die Gleichgewichtskonstante von $K = 10^{10}$ L/mol, 10^{11} L/mol und 10^{12} L/mol eingezeichnet (gepunktete Kurven). Diese Kurven unterscheiden sich praktisch nicht voneinander, so dass die Gleichgewichtskonstante zwischen Hirudin und Thrombin mit dieser Methode nur mit $K > 10^{10}$ L/mol abgegeben werden kann. (In der Literatur (z. B. (Rydel *et al.* 1990) sind Werte von $K = 10^{13} - 10^{14}$ l/mol beschrieben).

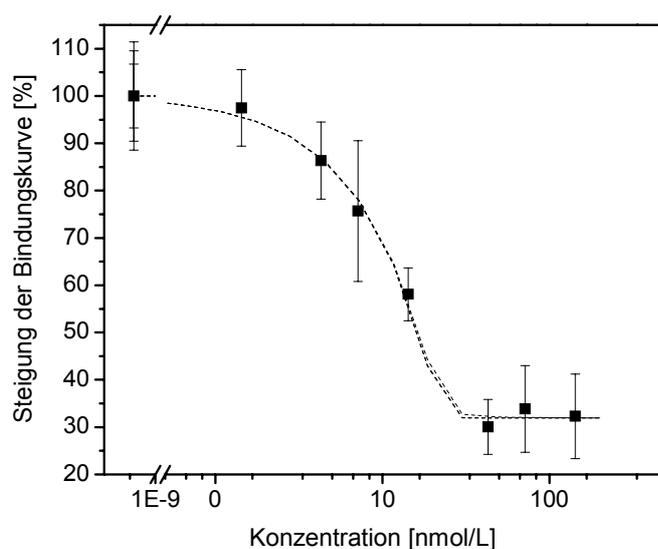


Abb. 4-6: Titration von Thrombin mit Hirudin. Es wurde $1\mu\text{g/ml}$ Thrombin mit verschiedenen Konzentrationen an Hirudin vorinkubiert und die Steigung der Bindungskurve bestimmt.

4.1.4 Online-Referenzierung von unspezifischen Wechselwirkungen

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Fremdproteinen und der Sensoroberfläche ein wesentlicher Punkt bei der Etablierung eines Sensorsystems zur Onlineüberwachung von Fermentationsprozessen. Durch eine geeignete Oberflächenchemie konnten diese unspezifischen Wechselwirkungen bereits deutlich reduziert werden (Mehlmann 1999). Messungen von reinen Fermenterproben zeigten aber, dass trotz dieser verbesserten Oberfläche bei komplexen Medien, wie sie im Fermenter auftreten, durchaus mit Brechungsindexsprüngen und/oder unspezifischer Proteinadsorption zu rechnen ist. Bei den in (Mehlmann 1999) beschriebenen Messungen wurde dieses Problem gelöst, indem die Fermenterprobe so stark verdünnt wurde, dass die unspezifische Bindung an die Oberfläche unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dies hatte allerdings zur Folge, dass damit auch die effektive Nachweisgrenze des zu detektierenden Produktes entsprechend der Verdünnung anstieg. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein System zur Online-Referenzierung aufgebaut (näheres über diesen Aufbau findet sich in (Haake 2000)). Grundgedanke dabei ist, dass an zwei Punkten mit unterschiedlich modifizierten Oberflächen (im folgenden Messspot bzw.

flächen (im folgenden Messspot bzw. Referenzspot genannt) über den in Abb. 4-7 gezeigten Doppelspektrometernaufbau ein Signal detektiert wird. Auf dem Messspot kommt dabei dieselbe Oberflächenmodifikation zum Tragen wie sie für die bisherige Detektion verwendet wurde. D. h. es wird auf ein Abschirmungspolymer der entsprechende Ligand (hier D-Alanin-D-Alanin) immobilisiert. An diesem Spot sollte somit ein Summensignal aus spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung detektiert werden. Auf dem Referenzspot wird dagegen kein Ligand immobilisiert, sondern nur das entsprechende Abschirmungspolymer, das auch am Messspot aufgebracht wurde. Dies sollte dazu führen, dass hier nur ein Signal aufgrund von unspezifischer Adsorption detektiert wird. Durch Differenzbildung der beiden Signale wird dann der Anteil an spezifischem Signal erhalten.

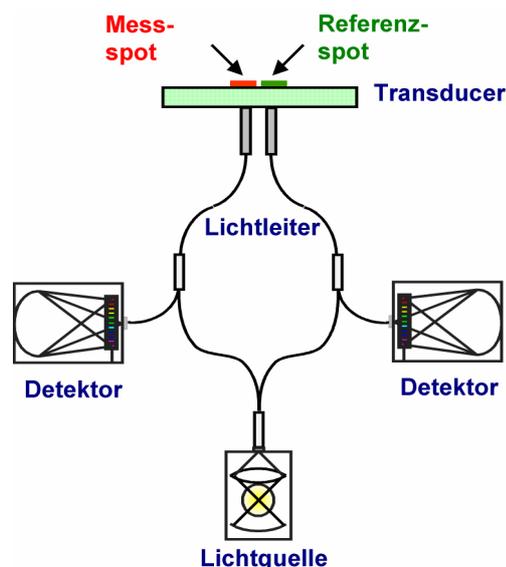


Abb. 4-7: Schematischer Aufbau des Doppelspektrometersystems: Es wird simultan an zwei unterschiedlich modifizierten Punkten gemessen, um den Anteil an unspezifischen Wechselwirkungen bestimmen zu können.

Ein kritischer Punkt bei einem solchen System liegt dabei in der Wahl und Verfügbarkeit einer geeigneten Referenzoberfläche. Nur wenn eine Oberfläche gefunden werden kann, die die gleiche (oder zumindest möglichst ähnliche) unspezifische Wechselwirkungen mit der Probenmatrix zeigt, kann eine solche Online-Referenzierung gelingen. Der einfachste Ansatz für eine solche Referenzoberfläche wäre ein Weglassen des Liganden. Dadurch geht jedoch nicht nur die Spezifität der Oberfläche verloren, sondern

es ändern sich auch die elektrostatischen Eigenschaften der Oberfläche, was wiederum zu geänderten unspezifischen Wechselwirkungen führen kann. Im Falle der Detektion von Vancomycin bietet sich an, auf dem Messspot L-Lys-D-ala-D-ala, auf dem Referenzspot ein Isostereomer (L-Lys-L-Ala-L-Ala) zu immobilisieren. Durch die Verwendung eines Isosteromeren kann davon ausgegangen werden, dass an Mess- und Referenzspot dieselben ionischen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Probenmatrix auftreten und sich die Oberflächen ausschließlich durch das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein der spezifischen Wechselwirkung unterscheiden. So modifizierte Oberflächen zeigten Unterschiede in der unspezifischen Bindung von weniger als 10% (Abb. 4-8).

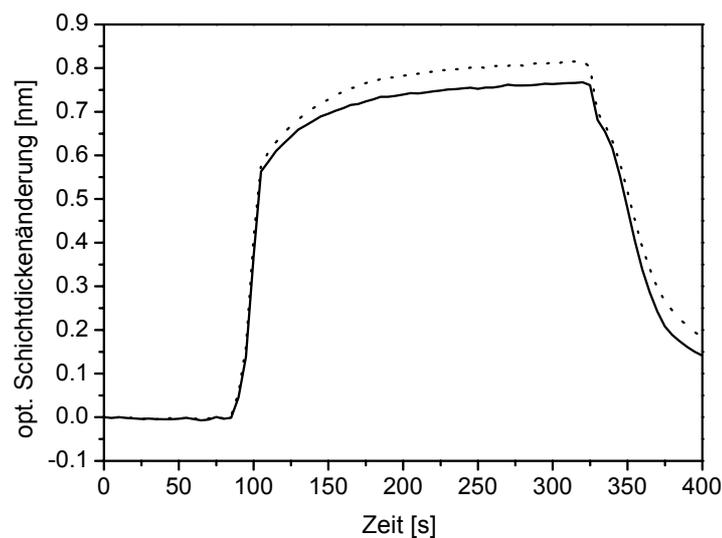


Abb. 4-8: Vergleich der unspezifischen Bindung. Als Testsubstanz wurde reines Fermentermedium (ohne Vancomycin) über den Sensor gegeben. Sowohl am Messspot (...) als auch am Referenzspot (----) wird nahezu das selbe Signal erhalten.

Messungen mit diesem System werden in Abb. 4-9 demonstriert. Als Testsubstanzen wurden zum einen reine Vancomycinlösungen ($c = 0,5\mu\text{g/ml}$), zum anderen mit derselben Konzentration Vancomycin versetztes Produktionsmedium verwendet. Bei der Injektion der reinen Vancomycinlösung wird nur auf dem Messspot ein Signal detektiert während auf dem Referenzpunkt keinerlei Wechselwirkungen zu erkennen sind

(Abb. 4-9 a). Im Gegensatz dazu wird bei Injektion von mit Vancomycin versetztem Produktionsmedium auf dem Messpunkt ein Summensignal aus spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung und auf dem Referenzspot nur unspezifische Bindung detektiert (Abb. 4-9 b). Durch Subtraktion des unspezifischen Anteils des Signals erhält man dann ein korrigiertes Signal. Ein Vergleich der Steigung der Bindungskurve der korrigierten Messung mit der Steigung der Bindungskurve nach Injektion von reiner Vancomycinlösung zeigt, dass beide Kurven dieselbe Steigung aufweisen, und somit dieselbe Konzentration an Vancomycin detektiert wird (Abb. 4-9 c). Mit einem solchen Aufbau kann also über eine Referenzmessung der Anteil an unspezifischen Wechselwirkungen bestimmt und herausgerechnet werden.

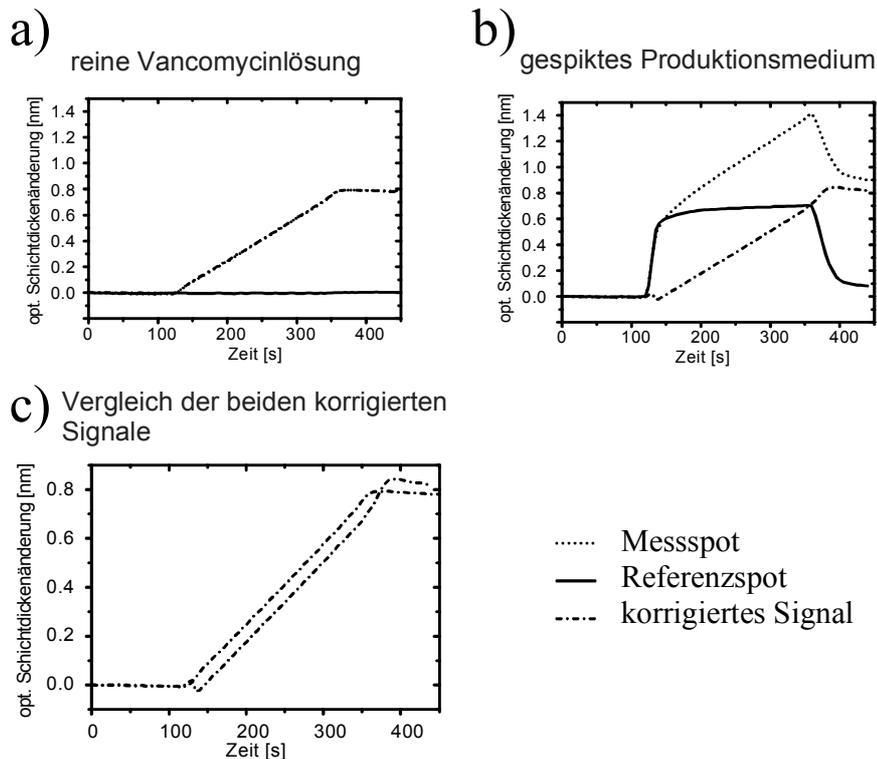


Abb. 4-9: Messungen mit Doppelspektrometernaufbau.

Diese Vorgaben in der Verdünnung und dem Gesamtvolumen lassen sich mit Peristaltikpumpen nur schwierig reproduzierbar einhalten. Aus diesem Grund wurden Spritzenpumpen eingesetzt.

Der Ablauf einer Messung wird im Folgenden beschrieben. Vor jeder Messung wird die Probenschleife mit Probe aus dem Fermenter gefüllt (Load-Inject-Ventil in Stellung Load). Anschließend wird das Load-Inject-Ventil umgeschaltet und ein kleines Probensegment durch die Spritzenpumpen angesaugt. Danach wird das Load-Inject-Ventil wieder auf Load umgestellt. Das Probensegment wird nun mit nachfließendem Puffer in die Mischkammer gepumpt und abhängig von der Menge an nachfließendem Puffer und der Größe des Probensegments entsprechend verdünnt. Von dort wird die verdünnte Probe wieder angesaugt und anschließend durch die Flusszelle gepumpt. Schließlich wird der Transducer regeneriert und die Mischkammer und Schläuche mit Puffer gespült. Um keine unerwünschten Dispersionseffekte durch den Fließpuffer zu erhalten, werden an entsprechenden Stellen Luftblasen angesaugt.

Für alle folgenden Messungen wurde die Menge an nachfließendem Puffer konstant gehalten (ca. 300 μ l) und nur die Größe des Probensegments variiert.

Zur Charakterisierung des entwickelten Dilutorsystems wurden Farbstoffprofile mit Indigokarmin aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass bereits nach 20 s Injektionszeit ein Bereich konstanter Konzentration (abhängig von der Menge an aufgesaugter Probe) erhalten wird, der auch (zumindest während 200 s) keinerlei Dispersionseffekte aufweist (Abb. 4-11). In diesem Bereich fließt somit eine konstante Konzentration an Farbstoff durch die Flusszelle und eine Auswertung ist möglich.

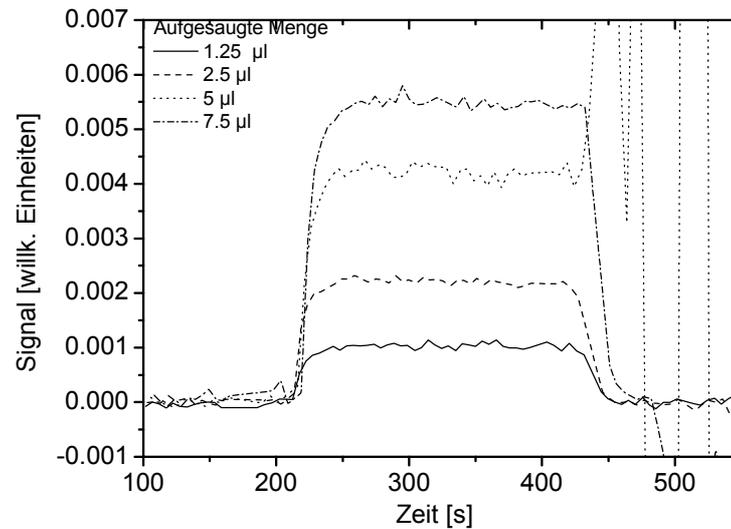


Abb. 4-11: Konzentrationsprofile, aufgenommen mit verschiedenen Konzentrationen an Indigokarmin.

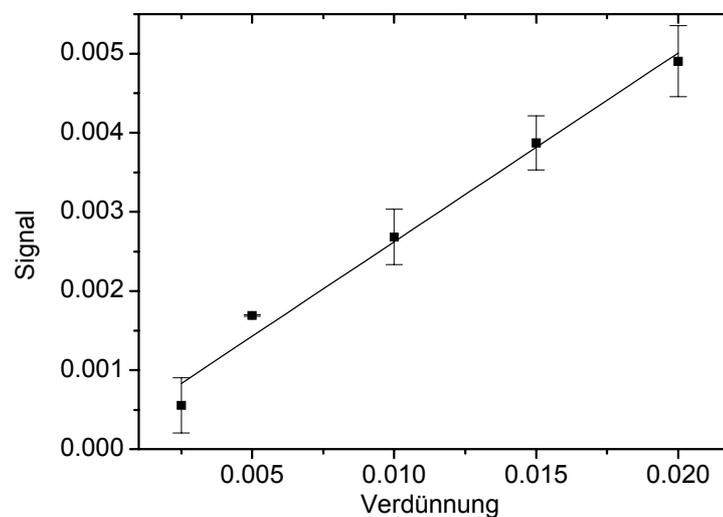


Abb. 4-12: Kalibriergerade für die manuell verdünnte Stammlösung an Indigokarmin.

Aufgrund unbekannter Totvolumina des Systems kann das Volumen des zur Verdünnung verwendeten Puffers nur grob vorgegeben werden. Eine genaue Bestimmung dieses Volumens und der daraus resultierenden Verdünnung muss experimentell erfolgen. Dazu wurde in einem ersten Schritt eine Kalibriergerade mit manueller Verdünnung aufgenommen (Abb. 4-12). Anschließend wurde automatisiert verdünnt, indem

verschieden große Probensegmente aus der Probenschleife aufgesaugt wurden (Abb. 4-13). Das Volumen des zur Verdünnung verwendeten Puffers wurde konstant gehalten. Zur Bestimmung der Menge an nachfließendem Puffer wurde eine lineare Fitfunktion verwendet:

Dabei lässt sich die Verdünnung (x) ausdrücken als:

$$x = \frac{p}{p + v} \quad (12)$$

mit:

p : Volumen an aufgesaugter Probe

v : Volumen an nachfließendem Puffer

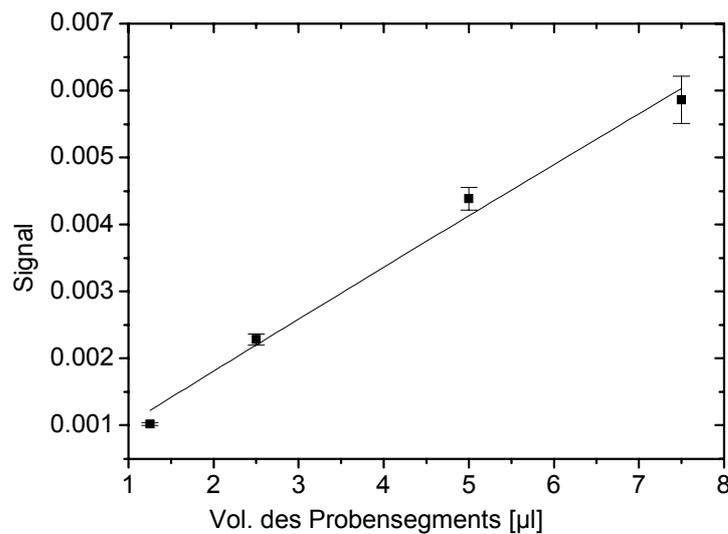


Abb. 4-13: Verdünnung mit dem Dilutorsystem. Hierbei wurde dieselbe Stammlösung, die auch in Abb. 4-12 verwendet wurde, durch Ansaugen von verschieden großen Probensegmenten bei konstanter Menge an nachfließendem Puffer verdünnt.

Daraus ergibt sich die Menge an nachfließendem Puffer zu:

$$v = (301,2 \pm 9,1) \mu\text{l}.$$

Wie zu erwarten war, sind die Standardabweichungen der automatisierten Verdünnung mit Werten zwischen 2,3 bis 6,0% (bezogen auf den Mittelwert) geringer als die von Hand verdünnten Proben (0,5 bis 62%). Damit ist gezeigt, dass das aufgebaute Flusssystem für eine automatisiert ablaufende Verdünnung und Messung der Fermenterproben nicht nur geeignet, sondern auch genauer als die manuelle Probenvorbereitung ist. Die Verwendung des Systems für reale Proben ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

4.1.6 Einsatz des Dilutorsystems für die Fermenteranalytik

Nach der Charakterisierung des aufgebauten Dilutorsystems wurde dieses nun für die Bestimmung der Vancomycinkonzentration eingesetzt. Dazu wurde zuerst eine Kalibriergerade mit reinen Vancomycinlösungen aufgenommen. Es wurden Stammlösungen mit Konzentrationen von 0, 25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ mit dem aufgebauten System automatisch verdünnt und über den Sensor gegeben (Abb. 4-14 a). Die Größe des aufgesaugten Probensegments und die Menge an verdünnendem Puffer wurden bei allen Messungen konstant gehalten. Die daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abb. 4-14 b zu sehen. Anschließend wurden reale Fermenterproben ebenfalls automatisch verdünnt und injiziert. Die aus den so erhaltenen Sensordaten bestimmten Konzentrationen der Fermenterproben stimmen sehr gut mit den Werten überein, die durch manuelle Verdünnung derselben Proben erhalten wurden (Abb. 4-15).

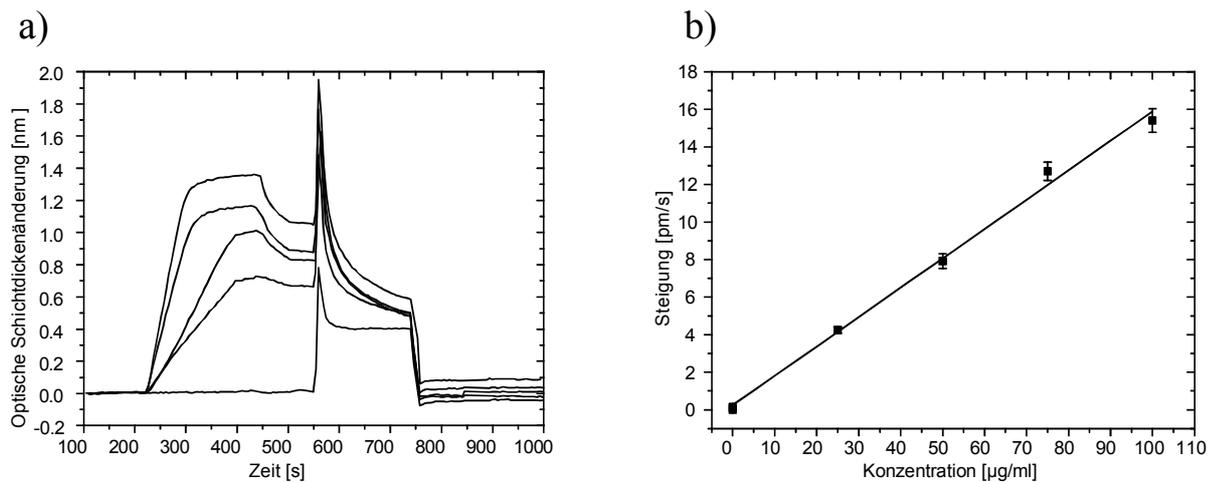


Abb. 4-14: Bild a: Messkurven der automatisierten Verdünnung. Die eingesetzten Konzentrationen an Vancomycin waren 0, 25, 50, 75 und 100 µg/ml. Bild b: Kalibrierkurve erstellt mit automatisch verdünnten Proben

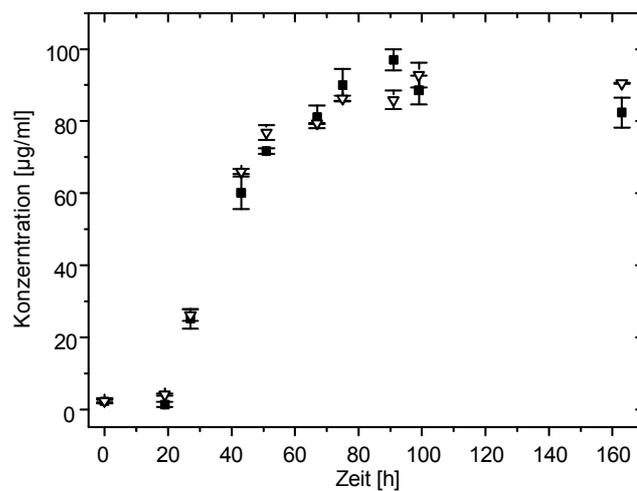


Abb. 4-15: Vergleich der automatisch (■) und manuell (▽) verdünnten Fermenterproben. Beide Messungen stimmen gut überein. Somit kann das aufgebaute FIA-System zur automatisierten Verdünnung verwendet werden.

4.2 Mikroreflektometrie

Ziel in diesem Teil der Arbeit war es zu zeigen, dass dieser 4- λ -Aufbau ebenfalls im Bereich der Bioanalytik in wässriger Phase eingesetzt werden kann. Dies sollte am Beispiel der Detektion von Vancomycin demonstriert werden. Der Hintergrund für dieses Vorhaben ist, dass mit einem solchen Detektionssystem ein sehr kostengünstiges und damit auch universell einsetzbares Analysengerät für die Überwachung von Fermentationprozessen geschaffen werden kann.

Die ersten Messungen mit diesem System erfolgten im Stopped-Flow Modus. Damit konnte Vancomycin erfolgreich detektiert werden (Abb. 4-16). Allerdings ist dieser Aufbau aufgrund der vergleichsweise großen Detektionsfläche von ca. 2 cm² und dem damit verbundenen sehr großen Probenverbrauch bisher nur bedingt im Bereich der Bioanalytik einsetzbar. Durch eine Änderung der Geometrie des Aufbaus und durch Verwendung kleinerer, integriert-optischer Bauelemente ließe sich dieses Problem aber lösen.

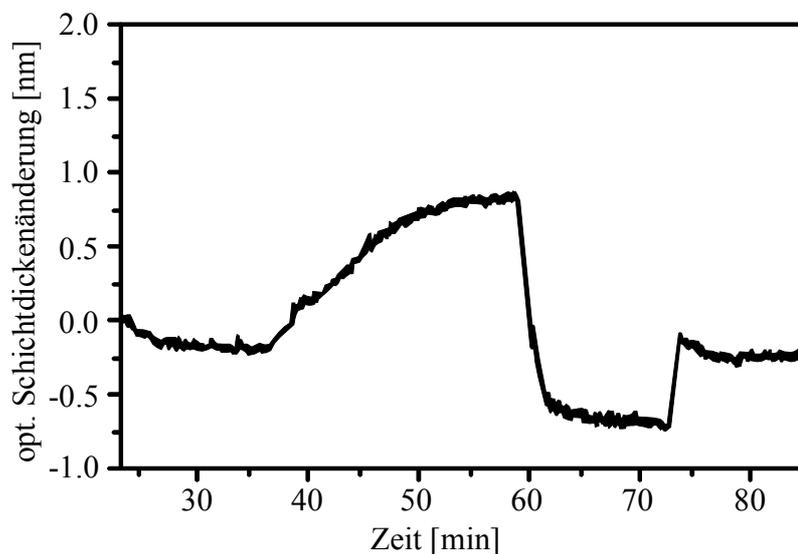


Abb. 4-16: Erste Messung mit dem 4- λ -System. Die Messung erfolgte stopped-flow. Die eingesetzte Konzentration an Vancomycin betrug 1 μ g/ml.

Bei der Mikroreflektometrie wird nun nicht mehr das gesamte Spektrum detektiert, sondern lediglich über ausgewählte Stützpunkte abgebildet. Eine Frage, die sich hieraus ergibt ist, inwieweit durch die Reduktion der Datenpunkte Informationen verloren

gehen. Im Folgenden werden hierzu einige grundsätzliche Überlegungen und Simulationsrechnungen dargestellt.

4.2.1 Abhängigkeit des Basislinienrauschens von der Zahl der Detektionpunkte

Zur genaueren Bestimmung des Reflexionsminimums wird in einem bestimmten Wellenlängenbereich eine Parabelanpassung durchgeführt und daraus die Lage des Minimums berechnet (eine ausführliche Beschreibung zur Wahl des Wellenlängenbereiches und zu dieser Form der Kurvenanpassung findet sich in (Kraus 1993)). Ein wichtiger Parameter, der die Genauigkeit bei der Bestimmung des Minimums beeinflusst, ist neben systemeigenen Parametern wie dem Detektor- oder Lichtquellenrauschen auch die Anzahl an Messpunkten, die für die Kurvenanpassung zur Verfügung stehen. Dieser Parameter soll im Folgenden näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde mit einem von F. Rathgeb geschriebenen Excel-Worksheet, ausgehend von den Fresnel-Gleichungen (siehe auch 2.2.2) ein Interferenzspektrum berechnet. Dieses Spektrum wurde dann mit einem „weißen“ Rauschen mehrfach moduliert und das Minimum jeweils durch eine Polynomanpassung bestimmt.

Um die für die Rechnungen verwendeten Parameter möglichst realistisch zu halten, wurden vorab 60 Interferenzspektren mit dem Standard-RIfS-Aufbau vermessen und daraus ein realistischer Wert für ein Systemrauschen bestimmt. Wie in Abb. 4-17: erkennbar ist, ist zumindest in dem für die Polynomanpassung relevanten Wellenzahlenbereich von 500-660 nm ein nahezu weißes Rauschen in der Größenordnung von 0,07 ‰ vorhanden. Mit diesem Wert wurde das berechnete Spektrum statistisch „verrauscht“.

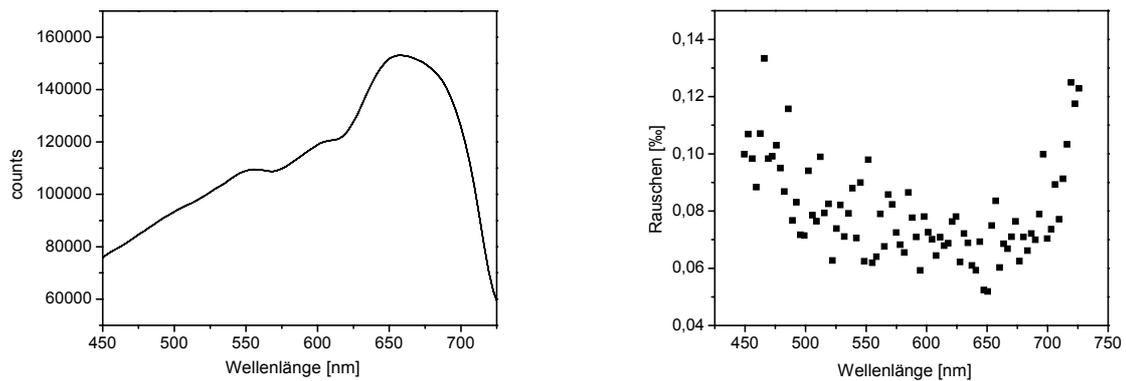


Abb. 4-17: Bestimmung des Rauschens für den Standard-RIFS-Aufbau. Links sind die 60 Roh-Spektren gezeigt (aufgrund der Skalierung ist nur eine Kurve zu sehen). Rechts ist das Rauschen der einzelnen Dioden ($\hat{=}$ Wellenlängen) gezeigt.

Über das zugrunde gelegte Schichtsystem und die verwendeten Brechungsindizes gibt Tab. 4-1 Auskunft. Die Brechungsindizes wurden dabei nach Cauchy parametrisiert.

Cauchy-Parameter	A	B	C	Phys. Dicke (nm)
Glassubstrat	1,51055	4654,24	5,70E+07	unendl. Halbraum
Ta_2O_5	2,20143	2003,00	3,53E+09	10
SiO_2	1,44759	3681,89	0,00E+00	330
Superstrat	1,334	0	0	unendl. Halbraum

Tab. 4-1 Schichtsystem und Parameter, die zur Berechnung des Reflexionsspektrums verwendet wurden.

Die Bestimmung des Minimums erfolgte immer im Bereich zwischen 500 und 660 nm. Die Zahl der für die Anpassung verwendeten Messpunkte wurde dabei von 161 ($\hat{=}$ 1 Messpunkt pro nm) bis auf 5 ($\hat{=}$ 1 Messpunkt pro 40 nm) reduziert und jeweils das Minimum bestimmt. Dies wurde jeweils für 100 Spektren durchgeführt und das Rauschen des Minimums in Abhängigkeit von der Zahl der Messpunkte bestimmt.

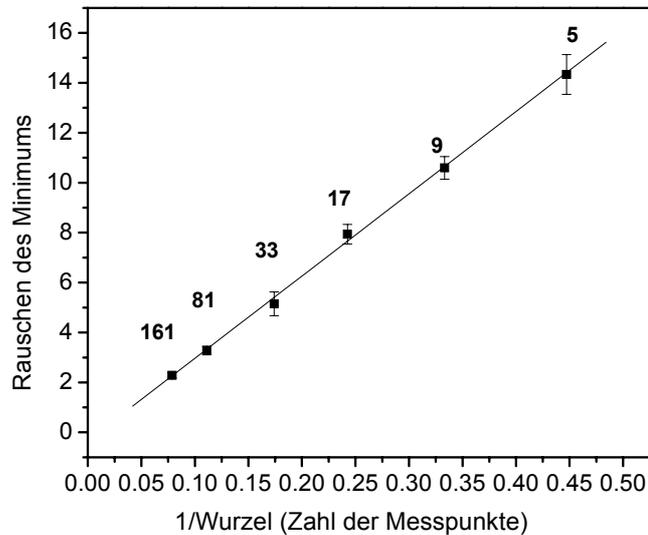


Abb. 4-18: *Abhängigkeit des Schichtdickenrauschens von der zur Polynomanpassung verwendeten Zahl der Messpunkte. Die Zahlen im Diagramm geben zur besseren Übersichtlichkeit die Zahl der Messpunkte an.*

Wie in Abb. 4-18 zu erkennen ist, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Rauschen des Minimums und der reziproken Wurzel der Zahl der für die Anpassung verwendeten Messpunkte. Um bei einer Verringerung der Messpunkte von 161 auf 5 das gleiche Schichtdickenrauschen (und damit verbunden die gleichen Nachweisgrenzen) zu erhalten, muss im Falle der Verwendung von nur 5 Messpunkten das Signal mit einem um den Faktor

$$\sqrt{\frac{161}{5}} = 5,7$$

geringeren Rauschen gemessen werden. Dies kann z.B. durch den Einsatz stabilerer Lichtquellen oder einer Erhöhung der Integrationszeit erreicht werden.

4.3 Kopplung RfS-MS

4.3.1 Allgemein

Die Biosensortechnologie basierend auf optischen, markierungsfreien Detektionsmethoden wie RfS oder SPR hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei werden Informationen über die biologische Funktion des zu untersuchenden Analyten in Form von kinetischen oder thermodynamischen Konstanten, oder einfach Daten über die Konzentration erhalten. Eine Aussage über die Struktur oder Identität des Analyten kann nicht getroffen werden. Als Beispiel hierfür wird auf die in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Messungen von Fermenterproben verwiesen. Es wäre jedoch interessant, wenn neben einer Aussage über die antibiotische Aktivität der Proben auch Informationen über deren Struktur bzw. Identität erhalten werden könnten. Eine Möglichkeit zur Strukturaufklärung bietet die Matrix-unterstützte-Laser-Ionisation-Time-of-flight Spektrometrie (MALDI-TOF). Diese hat sich zeitgleich wie die Biosensortechnologie als eine der wichtigsten massenspektrometrischen Methoden zur Analyse von Biomolekülen etabliert. Zur weiteren Erklärung der Funktionsweise und Anwendungen von MALDI-TOF sei an dieser Stelle auf mehrere Reviews verweisen (Hillenkamp *et al.* 1991, Mann und Talbo 1996, Fenselau 1997).

Eine Kombination von RfS mit der Massenspektrometrie würde aufgrund der unterschiedlichen Detektionsprinzipien sowie der unterschiedlichen Aussagen, die sich aus diesen Messungen treffen lassen, einen sehr hohen Informationsgehalt liefern. RfS ist eine nichtdestruktive, optische Detektionsmethode, die meist zur Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Daten eingesetzt wird. MALDI-TOF hingegen ist eine destruktive Methode, die zur Strukturaufklärung und Identifikation von Molekülen verwendet wird. Eine Kopplung von beiden Detektionsmethoden lässt also Aussagen sowohl über die Kinetik und Thermodynamik der Wechselwirkung und damit eine Aussage über die Funktionalität des Analyten, als auch über seine Identität bzw. Struktur zu.

In Abb. 4-19 wird der prinzipielle Aufbau einer Kopplung von RIfS mit der Massenspektrometrie gezeigt.

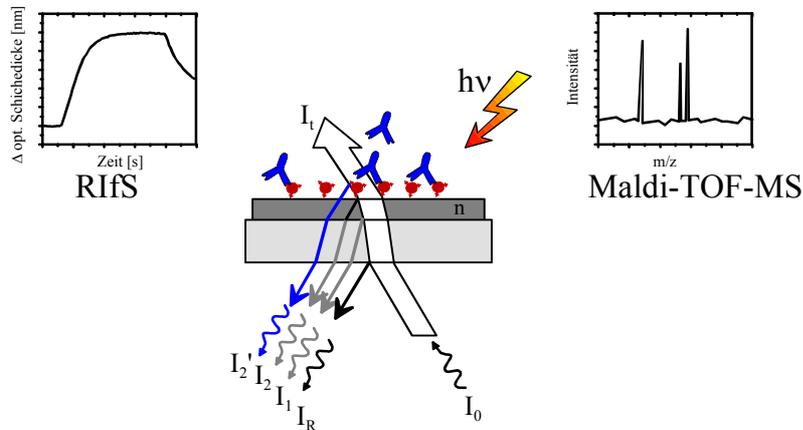


Abb. 4-19: Schema einer Kopplung RIfS - MALDI-TOF-MS. Nach erfolgter RIfS-Messung wird der Chip aus dem RIfS-Gerät ausgebaut, für das MALDI-MS Experiment präpariert und vermessen.

Die Kopplung von Sensorsystemen, die auf SPR basieren, mit der Massenspektrometrie ist bereits erfolgreich durchgeführt worden (z. B. Krone et al 1997, Nelson *et al.* 1999, Nedlekov und Nelson 2000, Nelson 2000). Die Kopplung von RIfS mit MS ist bisher nicht behandelt worden. Im Folgenden werden einige Überlegungen und erste Messungen dazu vorgestellt.

4.3.2 Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kopplung

Um eine Kopplung von RIfS mit der Massenspektrometrie erfolgreich durchführen zu können, müssen einige grundlegende Randparameter berücksichtigt werden.

4.3.2.1 Nachweisgrenzen und Konzentrationsbereiche

Die Menge an Analyt, die bei einem RIfS-Experiment an die Oberfläche gebunden wird, liegt im Bereich von 1 – 1000 fmol/mm² und damit im unteren Nachweisbereich

für MALDI-MS Messungen. (Dieser liegt bei 500 - 1000 fmol¹). Geht man näherungsweise von Spotgrößen auf dem Maldi-Target von 1 mm² aus, so wird daraus eine Flächenkonzentration in der Größenordnung, wie sie auch für hohe Beladungsdichten bei einem RIfS-Experiment erhalten werden können. Für die MS-Messungen ist es deshalb sehr wichtig, eine genügend große Menge an affinitätsgebundenem Analyten auf der Oberfläche zu erreichen, um nicht unterhalb der Nachweisgrenze zu sein. Deshalb wurden Oberflächen mit einer hohen Dichte an immobilisiertem Ligand hergestellt. Im Gegensatz hierzu werden z. B für kinetische Messungen Oberflächen mit einer niedrigen Ligandendichte benötigt, um den Einfluss der Diffusion und der Rückbindung möglichst gering zu halten.

Die Genauigkeit der Massenbestimmung bei MALDI ist stark von der Molekülgröße abhängig. Für kleinere Peptide liegt sie bei 10-50 ppm (Jensen *et al.* 1996), für Proteine bis 20 kDa bei 50-100 ppm. Für Moleküle größer als 30 kDa sinkt die Genauigkeit jedoch auf 0,1-0,2 % ab (Natsume *et al.* 2000). Für Moleküle im Bereich zwischen 200 – 50000 Da sind die Mengen, die auf einem für die Bioanalytik genutzten Chip gebunden werden, ungefähr in der Größenordnung wie sie für die Massenspektrometrie benötigt werden (Sönksen *et al.* 1998). Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die Empfindlichkeit bei RIfS mit steigender Molekülgröße zunimmt, wohingegen sie bei der Massenspektrometrie mit steigender Molekülmasse abnimmt. Diese beiden gegenläufigen Effekte müssen bei einer Kopplung natürlich berücksichtigt werden.

¹ Unter optimierten Bedingungen können auch Nachweisgrenzen von 1 fmol erreicht werden. Für eine universelle Einsatzmöglichkeit einer RIfS-MS-Kopplung muss dieses Optimierungspotential letztendlich ausgeschöpft werden.

4.3.2.2 Oberflächenmodifikation

Um eine Kopplung von RfS mit MS zu ermöglichen, muss gewährleistet sein, dass die bei RfS verwendete Oberflächenchemie auch für die Analyse im MS geeignet ist. D. h. die Oberfläche darf die Ergebnisse im MS nicht beeinflussen. So sind z. B. Streptavidin-Oberflächen nicht geeignet, da während der MALDI-TOF-MS-Experimente die Untereinheiten des Streptavidins dissoziieren und zu einem starken Signal im Massenspektrum führen können, das unter Umständen das Signal des eigentlichen Analyten überdeckt (Nedlekov und Nelson 2000). Von der Firma Biacore werden mit Carboxymethyl-dextran modifizierte Oberflächen vertrieben, die laut (Nedlekov 2000) nicht mit der MALDI-TOF-MS-Analyse interferieren. Diese Oberflächen sind den in der Arbeitsgruppe Gauglitz entwickelten mit Glutarsäureanhydrid umfunktionalisierten AMD-Oberflächen (AMD-GA) sehr ähnlich, so dass zu erwarten ist, dass auch diese Oberflächen keinen störenden Einfluss auf das MS Experiment haben. Für die RfS-MS-Experimente wurden daher AMD-GA modifizierte Oberflächen verwendet.

4.3.2.3 Probenhalter für eine RfS - MALDI-TOF MS - Kopplung

Von der Firma Applied Biosystems wurde ein Probenhalter zur Verfügung gestellt, auf welchem Glasplatten mit einer Größe von 45 x 45 mm im MS untersucht werden können. Die normalerweise verwendeten RfS-Transducer haben allerdings eine Größe von nur 12 x 12 mm. Um diese Transducer dennoch untersuchen zu können, wurde eine Messingfolie (45 x 45 mm) mit einem entsprechend dimensionierten Aluminiumrahmen versehen, so dass diese in den Probenhalter eingebaut werden konnten. Auf diese Messingfolie wurden dann die Transducer nach erfolgter RfS-Messung und entsprechendem Spülen und Trocknen mit Sekundenkleber befestigt.

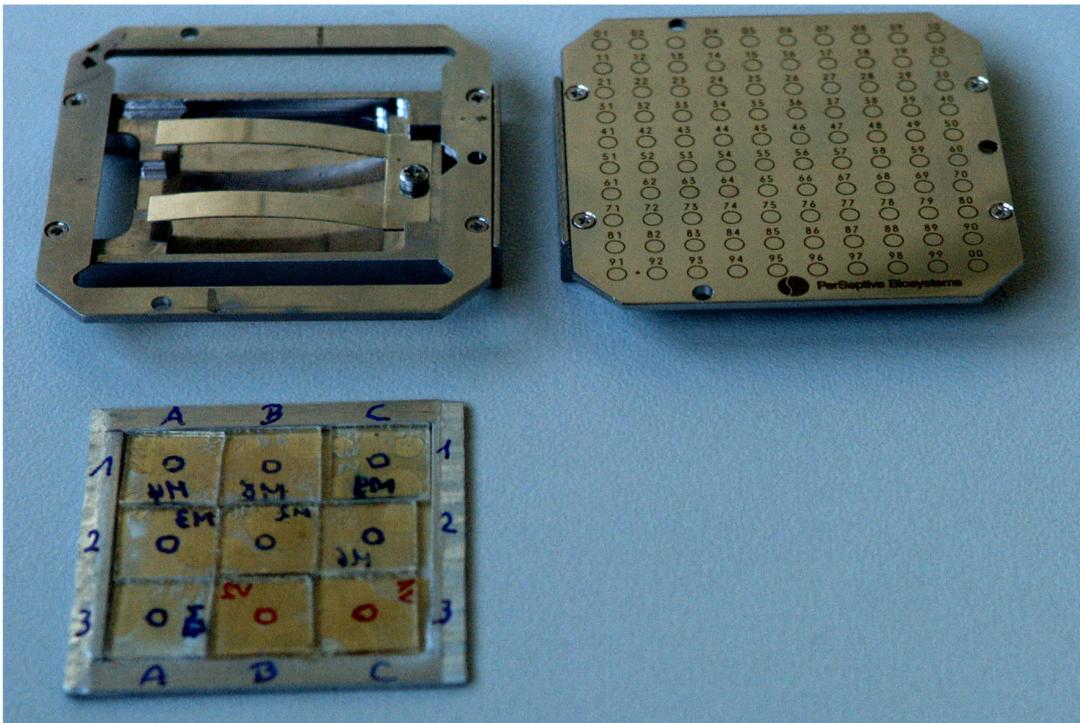


Abb. 4-20: Links oben: Probenhalter für die RIfS-MS-Kopplung, rechts oben zum Vergleich ein Standard-Maldi-Target. Unten ist die mit Alustreifen umrandete Messingfolie mit aufgeklebten RIfS-Transducern gezeigt.

Als Testsystem wurde das System Vancomycin – D-Alanin-D-Alanin verwendet. Dies hatte die Vorteile, dass zum einen die hierfür notwendige Oberflächenchemie bereits etabliert und das System gut charakterisiert war (Mehlmann 1999), zum anderen eine hinreichend große Menge an Analytmolekül (bis zu einigen pmol/mm^2) an die Oberfläche gebunden werden konnte, wodurch die MS-Detektion deutlich erleichtert wird. Typische Werte z. B. für Antikörper liegen bei $50\text{-}150 \text{ fmol}/\text{mm}^2$ (Krone *et al.* 1997)). Diese große Menge sollte für die ersten Versuche die Detektion mit MS deutlich erleichtern.

4.3.3 RIfS-Messungen

Es wurde ein mit $\text{N}^\alpha\text{-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ modifizierter AMD-Transducer in das RIfS-Gerät eingebaut und 10 min lang mit PBS-Puffer equilibriert. Danach wurden $300 \mu\text{l}$ einer Lösung von $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ Vancomycin in PBS-Puffer mit einer Fließgeschwindigkeit von $30 \mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Dies führte zu einer Änderung der optischen Schichtdicke von 9980 pm . Obwohl für typische kinetische Bindungsstudien zur Ver-

meidung von Massentransporteffekten Flussraten von über 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet werden sollen (Glaser 1993, Kortt *et al.* 1997), wurde hier bewusst eine niedrigere Flussrate gewählt, um eine höher Bindungseffizienz zu erreichen (Nedlekov 2000). Anschließend wurde die Oberfläche im RIFS-Gerät 6 min lang gründlich mit PBS-Puffer gespült und nicht gebundenes Vancomycin gewegewaschen. Die verbleibende Menge an Vancomycin betrug 8700 pm, dies entspricht einer verbleibenden Menge an Vancomycin von $3,5 \text{ pmol}/\text{mm}^2$ (Abb. 4-21). Der Transducer wurde ausgebaut, noch einmal mit 200 μl bidestilliertem Wasser gewaschen, um eventuell vorhandene Salze aus dem PBS-Puffer weitestgehend zu entfernen, da hohe Salzkonzentrationen einen sehr störenden Einfluss auf MALDI-MS Messungen haben, und im Stickstoffstrom trocken geblasen. Anschließend wurde der Transducer auf die Messingfolie aufgeklebt.

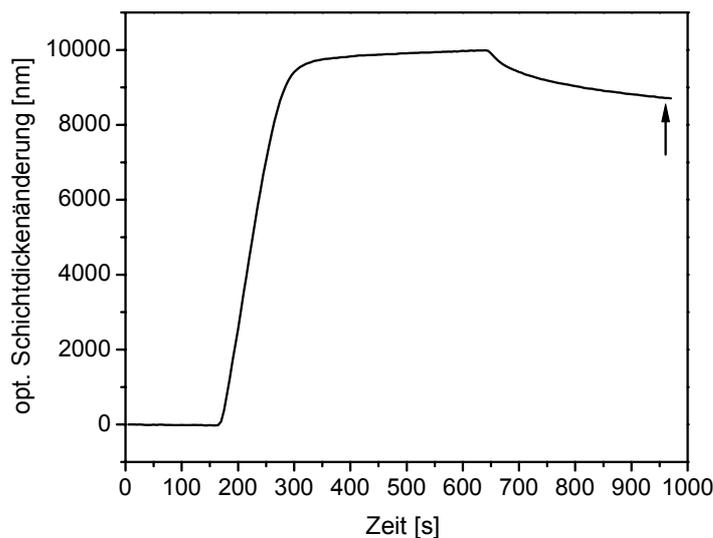


Abb. 4-21: Anbindung des Vancomycins an die Oberfläche. Nach gründlichem Spülen mit Puffer ergab sich eine Änderung der optischen Schichtdicke von 8700 pm ($\hat{=}$ $3,5 \text{ pmol}/\text{mm}^2$) (Pfeil im oberen Bild)

4.3.4 MALDI-TOF-MS-Messungen

Zu dem so präparierten Transducer wurden 0,2 – 0,5 µl Matrix (Cyanozimtsäure + Nitrocellulose) auf die RfS-Detektionsfläche aufpipetiert und im MS vermessen. Parallel dazu wurde auf einem Referenzpunkt neben der Detektionsfläche eine Lösung von Vancomycin aufgebracht, mit Matrix versehen und ebenfalls untersucht.

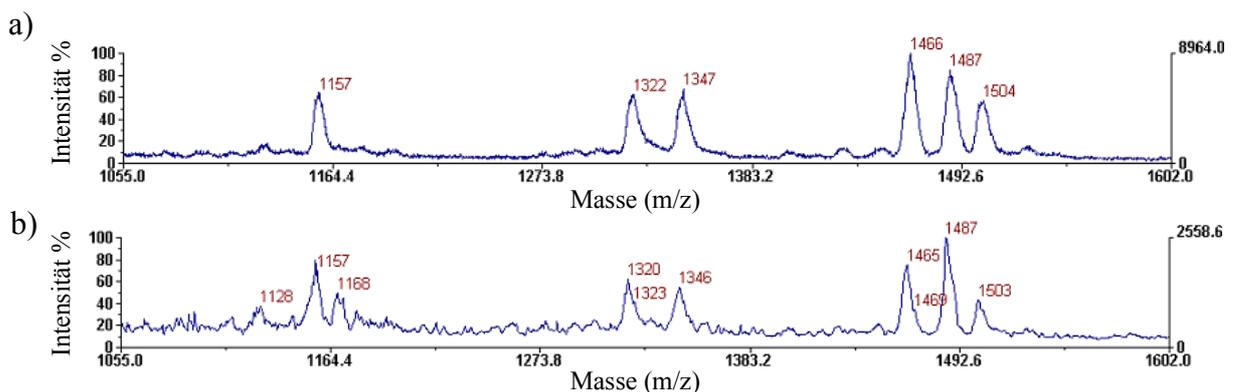


Abb. 4-22: Vergleich der RfS-MS-Kopplung (a) mit der Referenzmessung (b)

Das resultierende Spektrum ist in Abb. 4-22 zu sehen. Ein Vergleich der Ergebnisse der RfS-MS-Kopplung mit der Referenzmessung zeigt eine gute Übereinstimmung der im MS auftretenden Peaks. Interessant ist allerdings, dass der Hauptpeak bei 1465,9 Da erscheint. Die Signale bei 1487 bzw. 1504 Da lassen auf das Na- bzw. K-Addukt des Vancomycins schließen. Die theoretisch zu erwartende Masse liegt bei 1448,4 Da. Bei der Referenzmessung ist eine analoge Massenverschiebung von ca. 17 Da zu erkennen. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einer ungenügenden Kalibrierung des MS-Gerätes. Abweichungen können z. B. durch die veränderte Einbauposition (z B. durch unterschiedliche Dicken der Kleberschicht und daraus resultierende Abstandsänderungen zum Detektor) oder durch eine gegenüber dem Standard Stahl-Target veränderte elektrische Feldverteilung durch die nicht leitenden Glas-Oberflächen der RfS-Transducer und einer daraus resultierenden Änderung der Beschleunigung der erzeugten Ionen auftreten. Um diese Abweichungen zu eliminieren wurde in einem weiteren Experiment eine On-Chip-Kalibrierung vorgenommen. Dazu wurde bei der Referenzmessung zusammen mit der Vancomycinlösung eine Kalibrierlösung aus fünf verschiedenen Peptiden mit bekannten Massen aufpipetiert. Die nach-

folgenden MS-Messungen wurden dann auf diese 5 Peptide kalibriert. Damit wurde dann bei den RfS-MS-Messungen die korrekte Masse von 1448,39 Da erhalten (Abb. 4-23).

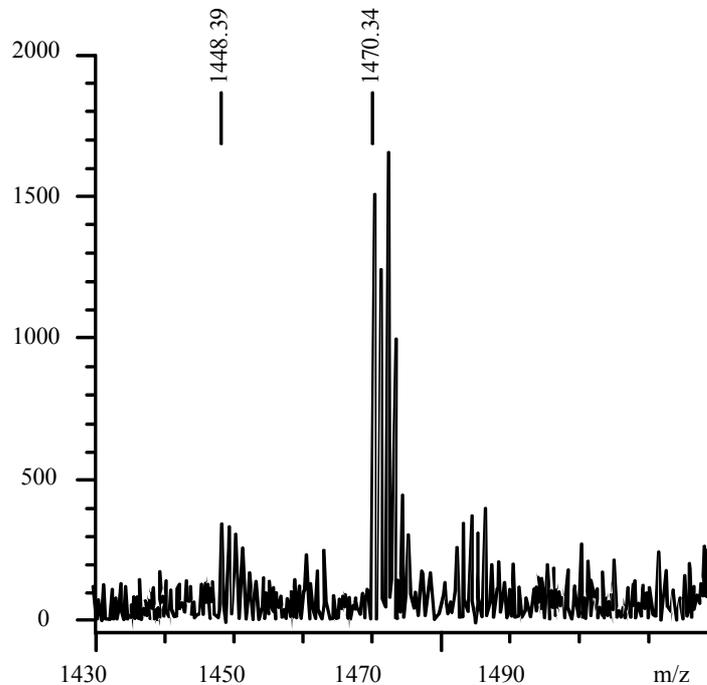


Abb. 4-23: RfS-MS-Messungen von Vancomycin mit interner Kalibrierung. 1448 Da: Vancomycin; 1470 Da: Na-Addukt des Vancomycins

4.3.5 Verwendung von leitenden Oberflächen (ITO-Schichten)

Wie in Abschnitt 2.4 bereits erwähnt, kommen als Maldi-Target leitende Oberflächen aus inerten Materialien (z. B. Edelstahl) zum Einsatz. Eine leitende Oberfläche ist notwendig, um einen Potentialgradienten aufzubauen, der für die Beschleunigung der erzeugten Ionen in Richtung Detektor benötigt wird. Bei der Verwendung von RfS-Transducern als Maldi-Target fehlt jedoch diese leitende Oberfläche. Das zur Beschleunigung notwendige Potential kann zwar über die Messingfolie erzeugt werden, auf die die Transducer aufgeklebt wurden, allerdings mit einer geänderten Feldverteilung. Deshalb sollte untersucht werden, ob durch die Verwendung einer leitenden Oberfläche bessere Ergebnisse und damit geringere Nachweisgrenzen erzielt werden können. Neben der Leitfähigkeit müssen diese Oberflächen eine hinreichende optische

Transparenz zeigen, da andernfalls RfS-Messung nicht möglich wäre. Oberflächen, die diese Eigenschaften (leitend und transparent) besitzen, sind z. B. Indium-Zinn-Oxid-Schichten (im Folgenden als ITO-Schichten bezeichnet). Durch den Ersatz der SiO₂-Interferenzschicht bei den Standard-RfS-Oberflächen durch eine entsprechend dicke ITO-Interferenzschicht erhält man Oberflächen, mit denen einerseits ein RfS-Experiment durchgeführt werden kann, die andererseits aber auch leitende Eigenschaften besitzt². Von Herrn Martin vom NMI Reutlingen wurden freundlicherweise verschiedene Glassubstrate mit einer 180 nm starken ITO-Schicht für erste Messungen zur Verfügung gestellt. Bei der Aufbringung der ITO-Schichten kann je nach Wahl der Parameter sowohl die Transparenz als auch die Leitfähigkeit der Oberflächen in bestimmten Grenzen variiert werden. Eine Charakterisierung der Schichten bezüglich ihrer Transmissions- und elektrischen Eigenschaften ist in Abb. 4-24 gezeigt.

² Diese Schichten sind nicht nur für eine Kopplung von MALDI mit RfS von Interesse. Auch andere Kopplungen (besonders natürlich Kopplungen von optischen mit elektrochemischen Methoden) sind denkbar. Ebenso könnten diese Oberflächen für eine elektrochemisch gesteuerte, orts aufgelöste Oberflächenmodifizierung mittels SECM verwendet werden.

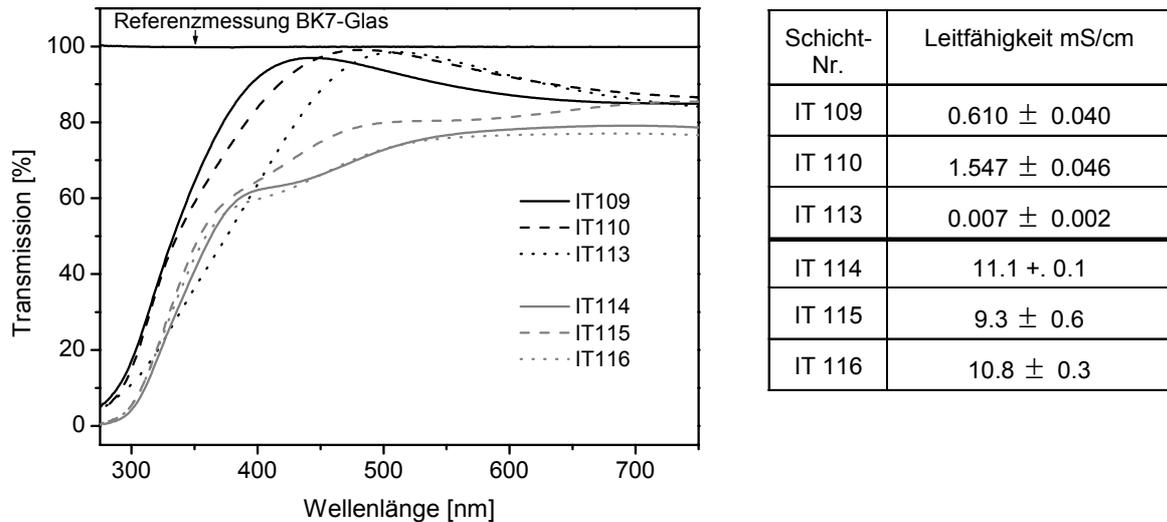


Abb. 4-24: Transmissionsspektren und Leitfähigkeiten der zur Verfügung stehenden ITO-Schichten. Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgte mit einem Multimeter, wobei der Widerstand über eine Strecke von 1 cm gemessen wurde.

Anhand dieser Charakterisierung lassen sich die zur Verfügung stehenden ITO-Schichten grob in zwei Kategorien einteilen: eine Gruppe mit einer vergleichsweise hohen Transparenz und geringer Leitfähigkeit (IT109-113) und eine Gruppe mit einer niedrigeren Transparenz und entsprechend hoher Leitfähigkeit (IT114-116). Exemplarisch wurde nun aus jeder Gruppe ein Transducer ausgewählt und im MS untersucht. Dazu wurden die Transducer zuerst auf die Messingfolie aufgeklebt und anschließend wurde mit Leitsilber eine elektrische Kontaktierung zwischen der Messingfolie und der ITO-Schicht erzeugt. Als Testsubstanz wurden je 500 fmol bakterielle alkalische Phosphatase (BAP-Protein) aufpipettiert und im MS untersucht (Abb. 4-25 a+b). Parallel dazu wurde ein normaler RfS-Transducer (ohne elektrische Kontaktierung) untersucht (Abb. 4-25 c). Gegenüber der nicht leitenden Oberfläche erhält man bei gleicher Menge an aufgegebenem Protein ein um den Faktor 4,7 (IT110) bzw. 5,7 (IT115) höheres Signal. Vergleicht man die beiden ITO-Schichten, so zeigt die Schicht mit der höheren Leitfähigkeit (IT115) auch ein um ca. 20% höheres Signal. Somit scheint, dass durch die Verwendung der leitenden Oberflächen eine Verbesserung der MS-Detektion erreicht werden kann.

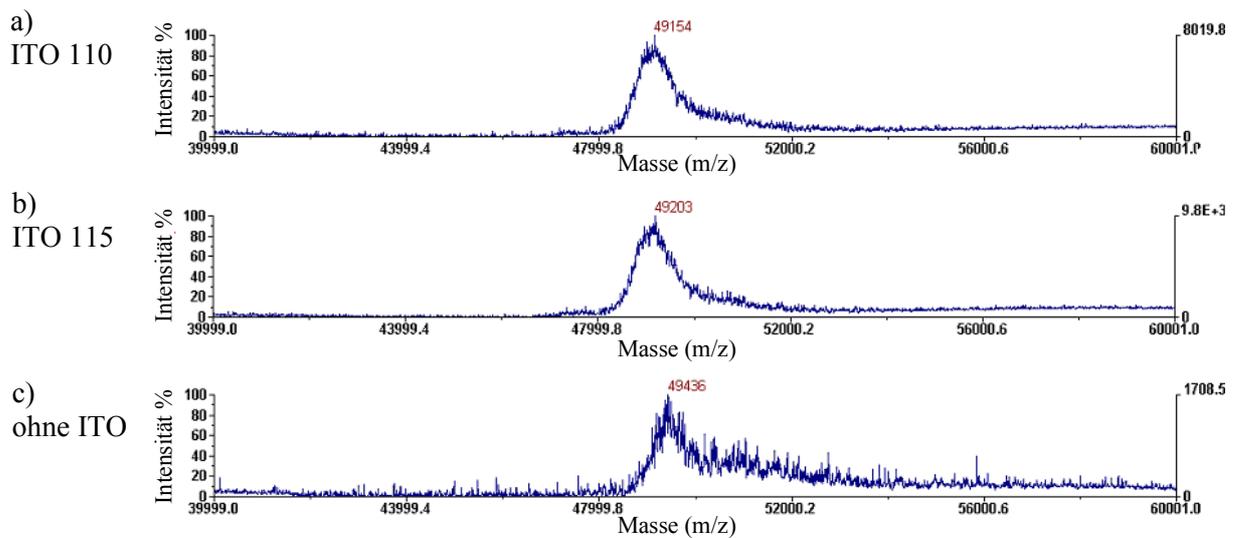


Abb. 4-25: MS-Messungen von 500 fmol Bap-Protein pro Spot auf ITO 110 (a), ITO 115 (b) und auf Glas ohne ITO Beschichtung (c).

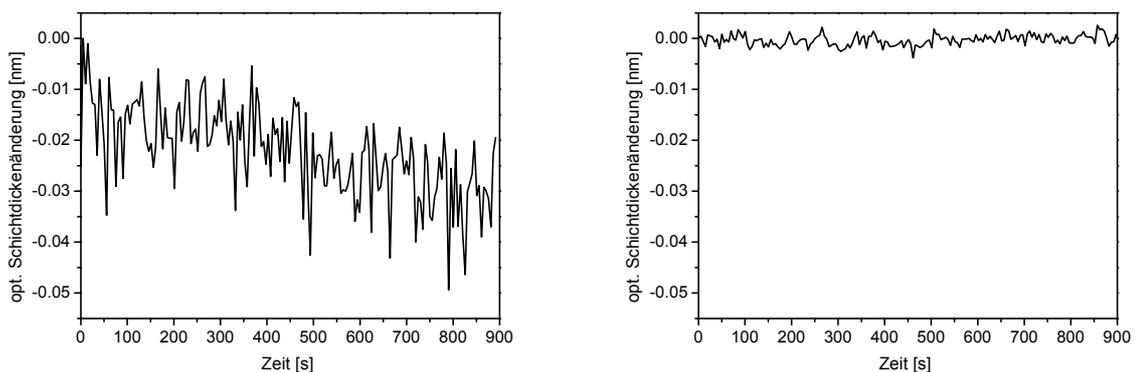


Abb. 4-26: Basislinie gemessen mit einem ITO-Beschichteten Transducer gegen Luft (links). Das RMS-Rauschen beträgt 6,9 pm. Zum Vergleich ist im rechten Bild eine entsprechende Messung mit einem Standard RfS-Chip gezeigt. Das RMS-Rauschen beträgt hier 1,1 pm.

Da die mit ITO beschichteten Transducer jedoch nicht nur für die MS-Analytik sondern ebenfalls für RfS-Messungen verwendet werden sollten, musste die Eignung dieser Schichten für RfS-Experimente gezeigt werden. Problematisch hierbei ist die sehr geringe Dicke³ von 180 nm der zur Verfügung stehenden ITO-Schichten. Diese

³ Für Schichten mit dieser Dicke bestand beim NMI-Reutlingen bereits ein Fertigungsprozess mit etablierten Parametern zur Einstellung der Transparenz und Leitfähigkeit, so dass diese Schichten ohne großen Aufwand hergestellt werden konnten.

sind nur bedingt für die reflektometrische Interferenzspektroskopie einsetzbar. Prinzipiell ist eine Detektion natürlich auch mit 180 nm dicken Interferenzschichten denkbar. Diese müsste dann aber bei kleineren Wellenlängen aus dem UV-Bereich erfolgen, woraus sich wiederum Probleme mit der Photolabilität von Biomolekülen ergeben können. Zusätzlich müssten natürlich noch andere Detektoren verwendet werden. Dennoch zeigt Abb. 4-26 eine prinzipielle Eignung der ITO-Schichten für RIfS-Messungen, auch wenn das Rauschen verglichen mit Standard RIfS-Messungen deutlich größer ist. Durch die Verwendung dickerer ITO-Schichten sollten sich diese Ergebnisse deutlich verbessern lassen.

4.4 Immobilisierung von Antikörpern

Nach den DNA-Microarrays rücken Protein-Arrays immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Dabei spielen natürlich Möglichkeiten zur Immobilisierung von Proteinen eine immer größere Rolle. Bisher wurden im Bereich der Bio- und Umweltanalytik in der Arbeitsgruppe Gauglitz zumeist relativ kleine Analytderivate auf die Oberfläche gebunden und dann die Wechselwirkungen (z.B. über einen Bindungshemmtest) mit einem entsprechenden (großen) Bindungspartner (z. B. einem Antikörper) untersucht. Der Vorteil hierbei ist, dass diese Analytderivate zum einen größtenteils chemisch und biologisch sehr stabil sind und zum anderen über lediglich eine oder wenige funktionelle Gruppen verfügen, über die eine spezifische Anbindung an die Oberfläche erfolgen kann. Im Bereich der Proteinanalytik ist eine solche Vorgehensweise nicht möglich, da hier beide Bindungspartner komplexe Moleküle sind, die mehrere potentielle funktionelle Gruppen für die Immobilisierung besitzen. Die Schwierigkeiten liegen nun darin, diese Proteine funktional zu immobilisieren. So darf beispielsweise durch die Anbindung an die Oberfläche nicht das aktive Zentrum blockiert werden. Auch müssen geeignete Bedingungen für die Immobilisation gefunden werden, bei denen die Funktionalität des Moleküls erhalten bleibt. Vor diesem Hintergrund werden in den folgenden Abschnitten Strategien für die Immobilisierung von Proteinen am Beispiel eines Antikörpers als Vertreter einer Proteingruppe aufgezeigt und miteinander verglichen.

4.4.1 Immobilisierung von Antikörpern über freie Aminofunktionen

Für alle folgenden Experimente wurde, wenn nicht anders angegeben, ein polyklonaler anti-Atrazin-Antikörper der IgG-Klasse verwendet.

Eine sehr einfache Möglichkeit, einen Antikörper zu immobilisieren, ist die Anbindung über freie Aminofunktionen des Antikörpers an eine carboxyfunktionalisierte Oberfläche (Hermanson *et al.* 1992).

Zur besseren Kontrolle der Immobilisierung wurden die Versuche online im Sensorsystem durchgeführt. Der typische Verlauf einer solchen Immobilisierung wird aus Abb. 4-27 deutlich.

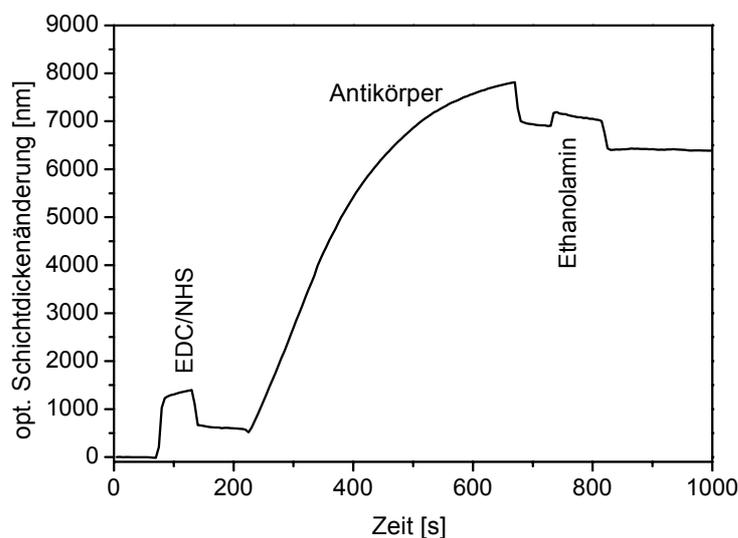


Abb. 4-27: Immobilisierung von IgG-Antikörpern über freie Aminofunktionen der Antikörper.

Zuerst wird die carboxyfunctionalisierte Oberfläche (Aminodextran, umfunktionalisiert mit Glutarsäureanhydrid) mit einer Lösung aus EDC/NHS aktiviert. Anschließend wird der zu immobilisierende Antikörper in einer Lösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ in HEPES-Puffer injiziert. Schließlich wird zur Desaktivierung von nicht umgesetzten Aktivestergruppen auf der Oberfläche eine Lösung von Ethanolamin über die Oberfläche gegeben.

Ein wichtiger Punkt bei dieser Art der Immobilisierung ist die Wahl eines geeigneten Puffers und des richtigen pH-Wertes für die Anbindung des Antikörpers. Um eine möglichst gute Kupplungseffizienz zu erhalten, sollte der Antikörper in möglichst hohen Konzentrationen vorhanden sein. Über ionische Wechselwirkungen kann man eine Aufkonzentration nahe der Oberfläche erreichen. Da die hier verwendete Oberfläche

mit Carboxylgruppen modifiziert ist, ist sie negativ geladen. D. h. der Antikörper sollte eine positive Ladungsverteilung aufzeigen, um über elektrostatische Wechselwirkungen an der Oberfläche angereichert zu werden. Deshalb sollte der pH-Wert des Immobilisierungspuffers möglichst niedrig sein. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die freien Aminofunktionen des Antikörpers unterhalb seines pI-Wertes protoniert werden und somit für die kovalente Anbindung nicht mehr zur Verfügung stehen. Natürlich darf der Antikörper nicht durch eine falsche Wahl des pH-Wertes und des Puffers denaturiert werden und somit seine Bindungsfähigkeit verlieren. Um die ionische Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche für die Vorkonzentrierung nicht zu schwächen, sollte ein ionenschwacher Puffer verwendet werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein 10 mM Acetat-Puffer für die Immobilisierung gewählt. Der geeignete pH-Wert wurde über entsprechende Messungen ermittelt. Dazu wurde der Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml über eine nicht aktivierte Oberfläche gegeben und die Aufkonzentrierung an der Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes beobachtet (Abb. 4-28, Abb. 4-29).

Aus Abb. 4-29 wird deutlich, dass oberhalb von pH 5,2 nahezu keine Aufkonzentrierung an der Oberfläche erfolgt. Für alle nachfolgenden Messungen wurde deshalb für die Immobilisierung ein pH-Wert von 4,9 gewählt.

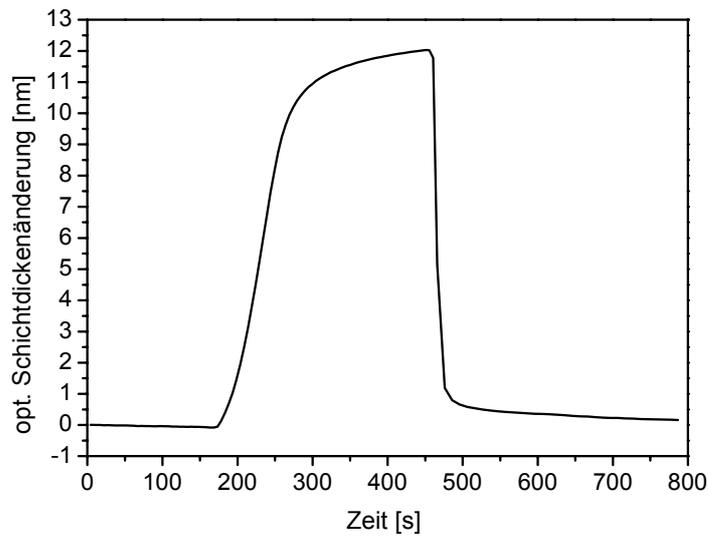


Abb. 4-28: Vorkonzentrierung von Antikörpern über ionische Wechselwirkungen. Injiziert wurden 50 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper in Natriumacetatpuffer (10 mmol, pH 4,9).

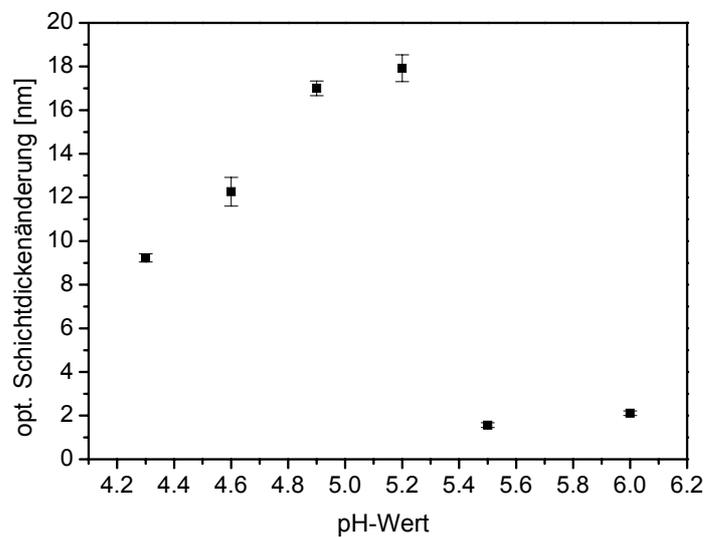


Abb. 4-29: Abhängigkeit der Vorkonzentrierung vom pH-Wert des Immobilisierungspuffers.

Kritisch bei einer solchen Immobilisierung über freie Aminofunktionen ist, dass keine gerichtete Anbindung stattfindet, sondern der Antikörper statistisch an die Oberfläche gekuppelt wird. Dabei kann die Bindungsdomäne blockiert werden, und der Antikörper zeigt keine oder nur eine eingeschränkte Funktionalität. Um dieses zu überprüfen, wurden die immobilisierten Antikörper auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurde zuerst eine Lösung von BSA (1 mg/ml) injiziert, gefolgt von einer zweiten Lösung eines BSA-Atrazincapronsäure-Konjugates⁵ (BSA-ACA) (50 µg/ml). Dabei zeigte sich, dass das nicht derivatisierte BSA praktisch nicht mit der Oberfläche in Wechselwirkung tritt, während das BSA-ACA Konjugat einen deutlichen Signalanstieg zeigt (Abb. 4-30).

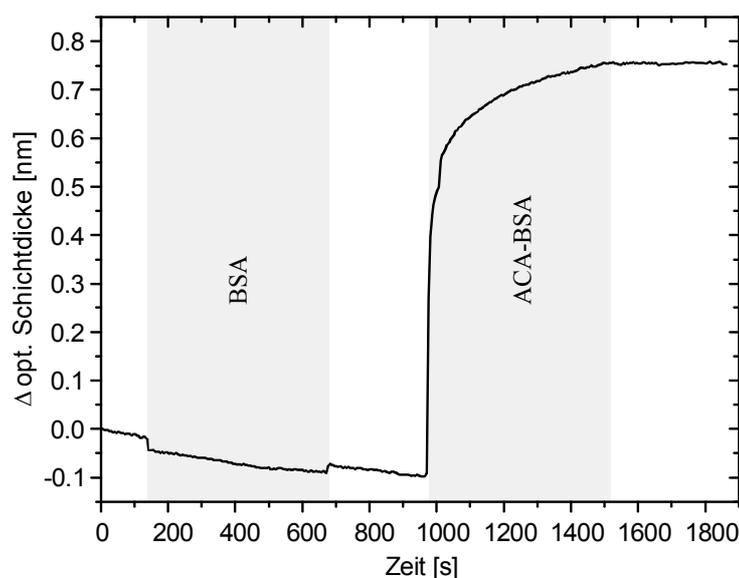


Abb. 4-30: Testen auf Spezifität. Während reines BSA (1mg/ml) praktisch nicht bindet, zeigt ACA-BSA eine deutliche Wechselwirkung mit der Oberfläche

Allerdings sind die hier erzielten Schichtdickenänderungen bei Anbindung des ACA-BSA relativ gering. Da jeder Antikörper zwei Bindungsstellen besitzt sollte die Menge an gebundenem ACA-BSA doppelt so groß sein, wie die Menge an immobilisiertem Antikörper. Berücksichtigt man die Molekülmassen (BSA: 65000 D, Ak: 150000 Da),

⁵ Die Darstellung des ACA-BSA-Konjugates ist in 3.4.3 beschrieben.

dann sollte, wenn alle Bindungsstellen des Antikörpers aktiv sind, die Schichtdickenänderung durch Bindung von ACA-BSA um den Faktor 0,86 (130000 D / 150000 D) kleiner sein, als die Schichtdickenänderung, die bei Immobilisierung des Antikörpers erhalten wurde. Die hier beobachteten Werte liegen jedoch im Bereich von unter 10% der maximalen Bindungskapazität (Abb. 4-31). Man kann somit davon ausgehen, dass der immobilisierte Antikörper nur zu ca. 5-10 % (bezogen auf die Zahl der Bindungsstellen) in einer aktiven Form an die Oberfläche gebunden wird. (Die hier angegebenen Prozentangaben stellen nur eine grobe Abschätzung dar). Diese geringe Bindungskapazität der immobilisierten Antikörper kann zu Problemen bei der Detektion von, verglichen mit BSA niedermolekularen Proteinen, wie z. B. Hirudin, (MG \approx 7000 D) führen.

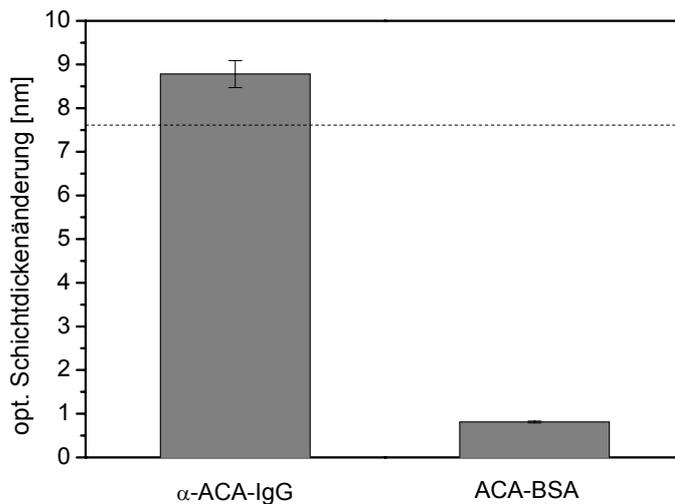


Abb. 4-31: Vergleich der Menge an immobilisiertem Antikörper mit der Menge an anschließend gebundenem ACA-BSA. Die gestrichelte Linie stellt die maximal zu erwartende Menge an gebundenem ACA-BSA, wenn alle Bindungsstellen des Antikörpers mit ACA-BSA belegt sind.

4.4.2 Immobilisierung über Avidin – Biotin Wechselwirkung

Eine weitere Möglichkeit neben einer kovalenten Immobilisierung ist die Anbindung des einen Bindungspartners an die Oberfläche über eine Affinitätswechselwirkung. Dies kann z. B. über eine Biotin-Avidin Wechselwirkung erfolgen. Die Interaktion zwischen Biotin und dem Hühnereiweiß Avidin oder dem ähnlichen bakteriellen Protein Streptavidin ist eine sehr verbreitete Wechselwirkung in der Immunochemie. Avidin ist ein Tetramer, bestehend aus vier identischen Untereinheiten, von denen jede eine Bindungsstelle für Biotin mit einer Affinitätskonstanten von ungefähr 10^{15} M^{-1} besitzt (siehe auch Wilchek und Bayer 1990). Da diese Wechselwirkung kaum durch extreme pH-Werte, Puffersalze oder chaotrope Reagenzien gestört wird (Hermanson et al 1992), kann die Anbindung des Antikörpers, im Gegensatz zu einer kovalenten Anbindung, wie sie in Kapitel 4.4.1 beschrieben ist, in einem geeigneteren Puffer (z. B. bei pH 7,4 physiologische Salzkonzentration) stattfinden.

Um eine solche Immobilisierung durchführen zu können, muss der Antikörper allerdings eine oder mehrere Biotin-Gruppen tragen. Dazu wurde eine Lösung eines Biotin-NHS-Aktivesters in getrocknetem DMF zu einer Lösung des Antikörpers in Carbonatpuffer gegeben. Die Umsetzung erfolgte bei Raumtemperatur mindestens 2 Stunden lang. Anschließend wurde der Antikörper mit Microcons aufgereinigt und umgepuffert.

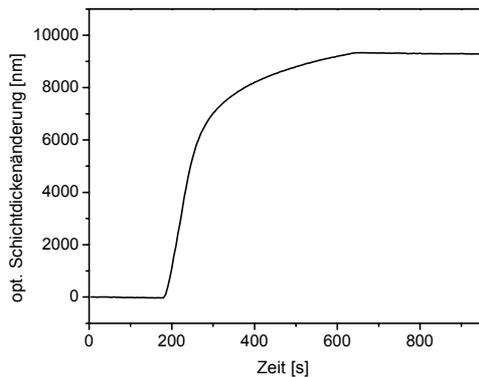


Abb. 4-32: Anbindung von Avidin.

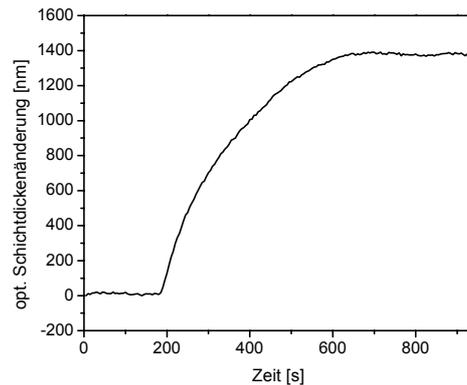


Abb. 4-33: Anbindung des Antikörpers.

Die Anbindung des Avidins auf der Glasoberfläche erfolgte über immobilisiertes Biotin. Dieses wurde analog Birkert 1998 immobilisiert, indem eine mit Carboxylgruppen modifizierte Dextranoberfläche mit einer Lösung aus TBTU/Biotin/DIPEA umgesetzt wurde. Anschließend wurde eine Lösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Avidin in PBS-Puffer über die Oberfläche gegeben. Dabei wurden Beladungen zwischen 9 und 10 nm ($\hat{=}$ 79 - 88 fmol/mm^2)⁶ erzielt. Eine typische Bindungskurve ist in Abb. 4-32 zu sehen. In einem letzten Schritt wurde dann der biotinylierte Antikörper in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS injiziert. Die hierbei auftretenden Änderungen der optischen Schichtdicke lagen zwischen 1190 und 1370 pm ($\hat{=}$ 4 - 5 fmol/mm^2).

In Abb. 4-34 ist eine schematische Übersicht des kompletten Schichtaufbaus zu sehen

⁶ zur Umrechnung der optischen Schichtdicke in einen Konzentrationswert wurde ein Umrechnungsfaktor von 1,7 pm/(pg/mm²) angenommen (Hänel 2002).

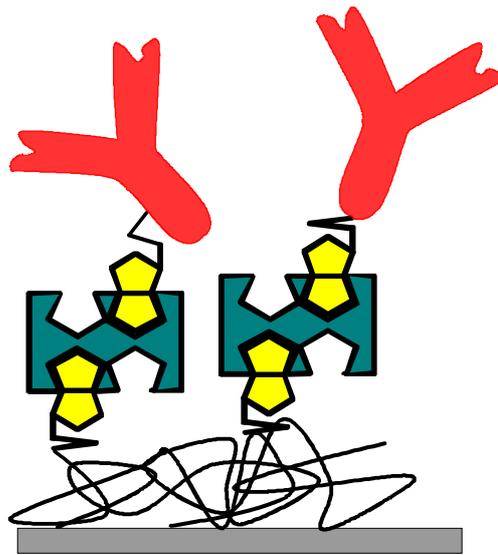


Abb. 4-34: Schichtaufbau AMD-Biotin-Avidin-Biotin-Antikörper.

Eine Charakterisierung der immobilisierten Antikörper wurde analog Kapitel 4.4.1 durchgeführt. Während bei Injektion von BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml nahezu keine Signaländerung auftrat (Daten nicht gezeigt), traten bei Injektion des ACA-BSA-Konjugates (50 $\mu\text{g/ml}$) Änderungen in der optischen Schichtdicke zwischen 760 und 1030 pm auf ($\hat{=}$ 5 - 6 fmol/mm^2) (Abb. 4-36). Vergleicht man die Menge an gebundenem ACA-BSA-Konjugat mit der Menge an immobilisiertem Antikörper (und damit der Zahl an möglichen Bindungsstellen), so erkennt man, dass 70 - 85% der Antikörperbindungsstellen aktiv sind. Dieser Wert für die Aktivität des Antikörpers ist ungefähr 10-mal größer als der für die kovalente Immobilisierung erhaltene Wert.

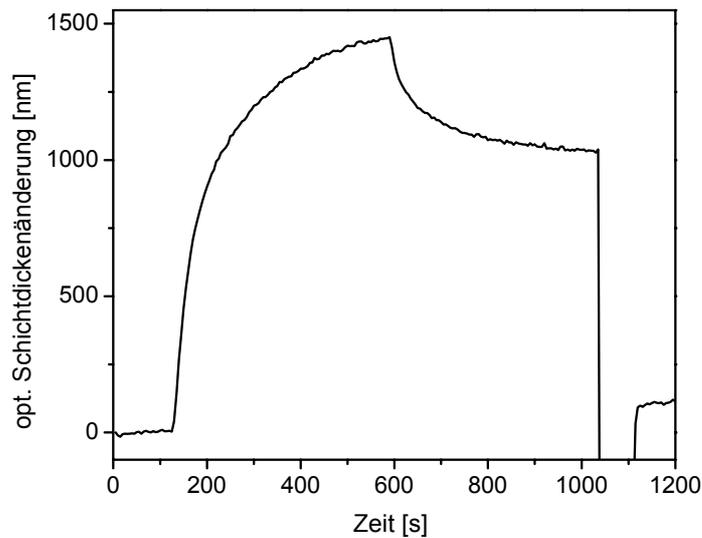


Abb. 4-35: Bindung von ACA-BSA ($50\mu\text{g/ml}$) an über Biotin immobilisierte α -ACA-Antikörper.

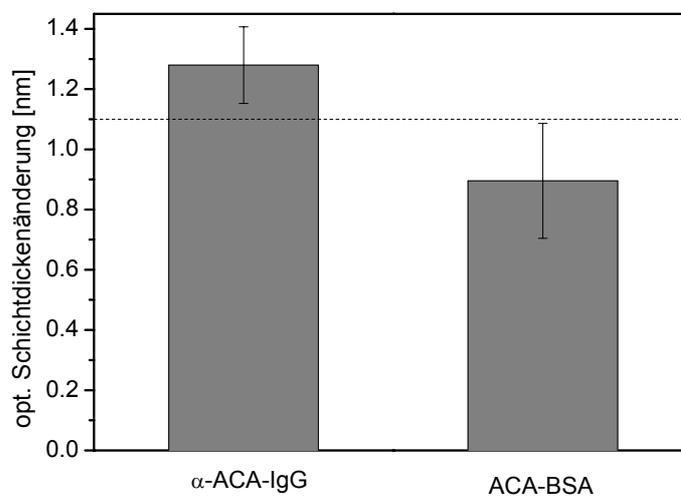


Abb. 4-36: Vergleich der Menge an affin-immobilisiertem Antikörper mit der Menge an anschließend gebundenem ACA-BSA. Die gestrichelte Linie stellt die maximal zu erwartende Menge an gebundenem ACA-BSA, wenn alle Bindungsstellen des Antikörpers mit ACA-BSA belegt sind.

4.4.3 Vergleich der Beiden Immobilisierungsmethoden

Da sowohl zur kovalenten Immobilisierung des Antikörpers als auch zur Anbindung des Biotins an den Antikörper dieselben Bindungsstellen, nämlich dessen freie Aminofunktionen, verwendet wurden, kann eine unterschiedliche sterische Hinderung der Bindungsstelle als Ursache für diese sehr unterschiedlichen Aktivitäten ausgeschlossen werden. Der Grund liegt vermutlich in den unterschiedlichen Puffersystemen (NaOAc pH 4,9 ↔ Carbonatpuffer pH 9,5). Während der Natrium-Acetat-Puffer bezüglich der elektrostatischen Anziehung zwischen Oberfläche und Protein als sehr geeignet anzusehen ist, scheint durch dessen Verwendung die Aktivität des Antikörpers drastisch reduziert zu werden.

Bezogen auf die Kupplungseffizienz (ausgedrückt über die Menge an immobilisiertem Antikörper) ist die kovalente Anbindung der Affinitätsreaktion vorzuziehen. So wurden bei der kovalenten Anbindung mit Werten zwischen 7 und 12 nm ($\hat{=}$ 28 - 48 fmol/mm²) ungefähr 7 - 12-mal mehr Antikörper immobilisiert. Ganz anders sieht es jedoch aus, wenn als Qualitätskriterium die tatsächliche Menge an aktiven Bindungsstellen des Antikörpers herangezogen wird. Hier ist die Anbindung über eine Affinitätsreaktion deutlich günstiger als die kovalente Anbindung. Zwar wird dabei weniger Antikörper immobilisiert, die Zahl der aktiven Bindungszentren ist jedoch größer. Durch die erhöhte Aktivität wird der Nachteil der geringeren Menge an immobilisiertem Antikörper mehr als ausgeglichen. Die Immobilisierung über eine Biotin-Avidin Wechselwirkung ist zumindest für den hier verwendeten Antikörper der kovalenten Anbindung vorzuziehen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte ein optisches Biosensorsystem zur produktspezifischen Online-Überwachung von Fermentationsprozessen entwickelt, charakterisiert und am Beispiel des Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin getestet werden. Es zeigte sich, dass eine solche Überwachung der Fermentation von Vancomycin mit RfS möglich ist. Die zeitliche Verzögerung zwischen Fermentationsprozess und Analysenergebnis sollte dabei möglichst gering gehalten werden, um schnell auf Veränderungen im Prozess reagieren zu können und so den Prozess möglichst optimiert fahren zu können. Diese geringe zeitliche Verzögerung sollte durch eine vereinfachte, und damit schnell durchzuführende, Probenvorbereitung erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass, mit Ausnahme eines Filtrationsschrittes zur Gewinnung einer zellfreien Probe, mit dem entwickelten Sensorsystem sogar Messungen in unaufgereinigter Fermenterproben möglich waren.

Eine Überprüfung der Messergebnisse mit Methoden der klassischen Analytik (HPLC) ergab jedoch, dass die mit RfS bestimmten Konzentrationen deutlich über den Konzentrationen liegen, die mit HPLC bestimmt wurden. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Überbestimmung aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Fremdmolekülen aus der Probenmatrix mit der Sensoroberfläche zustande kommt. Über einen Hemmhoftest konnte gezeigt werden, dass mit RfS nicht nur die Konzentration an Vancomycin bestimmt wurde, sondern vielmehr die antibiotische Aktivität der Fermenterprobe. Das heißt, alle Substanzen, die spezifisch an das auf der Oberfläche immobilisierte Peptid binden, werden erfasst. Dennoch kann mit einem solchen Sensorsystem der qualitative Verlauf des Fermentationsprozesses beobachtet werden. Gleichzeitig lässt sich auch die biologische Funktion des Produktes (hier die antibiotische Aktivität) direkt überprüfen. Gegenüber dem klassischen Hemmhoftest, der eine Inkubation über Nacht benötigt, ist dies ein großer Zeitvorteil.

Um eine automatisierte Beobachtung des Prozesses zu ermöglichen, war es notwendig, ein geeignetes Probennahme- und Aufbereitungssystem aufzubauen. Es wurde der bis-

her zur Probenaufbereitung notwendige Zentrifugationsschritt durch einen Filtrationsschritt ersetzt. Ebenso wurde ein geeignetes Verdünnungssystem aufgebaut und charakterisiert. Somit steht nun ein Gesamtsystem zur Verfügung, mit dem automatisiert zellfreie Proben aus dem Fermenter entnommen, verdünnt und detektiert werden können.

Zur Vereinfachung der Probenvorbereitung galt ein besonderes Augenmerk dabei dem Problem der unspezifischen Wechselwirkung mit Fremdproteinen, wie sie in einer Fermentermatrix vorkommen können. Messungen von realen Fermenterproben oder anderen komplexen Matrices stellen zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen hohe Anforderungen an die verwendeten Oberflächen. Obwohl die Oberflächenchemie im Arbeitskreis Gauglitz diesbezüglich schon sehr weit entwickelt ist, lassen sich unspezifische Adsorptionen manchmal dennoch nicht ganz vermeiden. Aus diesem Grund wurde ein System zur Online-Referenzierung aufgebaut. Dabei wird neben dem eigentlichen Messpunkt ein weiterer Detektionspunkt eingeführt, dessen Oberfläche so modifiziert war, dass zum einen keine spezifische Wechselwirkung mit dem Analyten, zum anderen eine möglichst ähnliche unspezifische Wechselwirkung wie am eigentlichen Messpunkt stattfand. Durch Differenzbildung der beiden Signale wird dann der Anteil an spezifischem Signal erhalten. Ein solches System konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich charakterisiert und getestet werden.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass mit der Mikroreflektometrie eine Detektion von Vancomycin möglich ist.

Aufgrund der Komplexität der ablaufenden Prozesse ist oftmals eine einfache quantitative Prozessanalytik nicht ausreichend. Entstehen während des Prozesses neben dem Hauptprodukt noch Derivate oder Metaboliten, so ist eine Identifizierung und Charakterisierung der Komponenten notwendig. Eine Kopplung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit der Massenspektrometrie sollte neben der Quantifizierung von Komponenten auch deren Identifizierung ermöglichen. Nach der Konstruktion eines geeigneten Probenhalters konnte erstmals eine solche Kopplung realisiert werden. Dabei wurde zuerst mit RfS die Anbindung von Vancomycin beobachtet. An-

schließlich wurde der RfS-Transducer in ein Maldi-TOF-Gerät überführt und ein Massenspektrum des gebundenen Vancomycins detektiert. Als kritisch stellte sich hierbei die Konzentration an auf der Sensoroberfläche gebundenem Analyten heraus. Es wurde deshalb versucht, ob durch Verwendung einer leitenden Sensoroberfläche auf Indium-Zinn-Oxid-Basis bessere Ergebnisse in Form von geringeren Nachweisgrenzen im MS zu erzielen sind. Erste Messungen dazu scheinen dies zu belegen.

In einem abschließenden Kapitel wurden verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Antikörpern untersucht. Dabei ergab sich, dass bezogen auf die Kupplungseffizienz (ausgedrückt über die Menge an immobilisiertem Antikörper) die kovalente Anbindung über freie Aminofunktionen der Anbindung über eine Affinitätsreaktion über Biotin-Streptavidin vorzuziehen ist. Bezogen auf die Menge an aktiven Bindungsstellen ist die Anbindung über eine Affinitätsreaktion jedoch günstiger.

Ausblick

Die Anwendung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie ist natürlich nicht nur auf die Detektion von Vancomycin beschränkt. Andere Systeme wie z. B. die Produktion rekombinanter Antikörper könnten ebenfalls überwacht werden. Gerade bei der Fermentation komplexer Proteine könnte eine Detektion über biomolekulare Wechselwirkungen große Vorteile mit sich bringen, da auch gleich die biologische Funktionsweise mit überwacht werden kann.

Die Kopplung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit der Massenspektrometrie steht erst am Beginn. Besonders für den Bereich der funktionellen Proteomanalyse ist eine solche Kopplung äußerst viel versprechend. Neben der Funktionalität (der Bindung an einen entsprechenden Bindungspartner) kann auch eine Strukturaufklärung erfolgen und damit z. B. Aussagen über posttranslatorische Modifizierungen getroffen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Aufl. Weinheim :VCH, **1995**.
- Anderson G. P., Meagen A. J., Ligler S. F., King D. K., *Biosens. Bioelectron.* (1997) **12**, 329-336.
- Bayer, E. A., Wilchek, M., *Meth. Biochem. Anal.*, (1980) **26**, 1.
- Beauregard D. A., Williams D. H., Gwynn M.N., Knowles D. J. C, *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1995) **39**, 781-785.
- Beauregard D. A., Maguire A. J., Williams D. H., Reynolds P. E., *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1997) **41**, 2418-2423.
- Becker, J. M., Wilchek, M., *Biochem. Biophys. Acta.* (1972) **26**, 165.
- Beckey H. D., *Principles of Field Desorption Mass Spectrometry*, Pergamon Press: Oxford, 1977.
- Birkert O. Entwicklung und Charakterisierung von Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung biotinylierter Liganden für die Affinitätsanalytik, Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1998.
- Blakely C. R., Carmody J. J., Vestal M. L., *Anal. Chem.* (1980) **52**, 1636.
- Brecht A, *Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen*, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1993.
- Bergmann L., Schäfer C., Niedrig H. (Hrsg.), *Lehrbuch der Experimentalphysik Band 3 - Optik*, 9. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1993.
- Brecht A., Gauglitz G., Nahm W., *Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors*, *Analisis* (1992) **20 (3)**, 135-140.

- Cotter R. J., Time-of-flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications to Biological Reserach, Am. Chem. Soc., Washington DC , 1997.
- Disley D. M.; Morrill P. R.; Sproule K.; Lowe C. R., *Biosens. Bioelectron.* (1999) **14**, 481-493.
- Dutton A. A. C., Elmes P.C., *Br. Med. J.* (1959) **1**, 1144-1149.
- Fenselau C., *Anal. Chem.* (1997) **69**, 661A-665A.
- Filipini C.; Sonnleitner B.; Fiechter A.; Bradley J.; Schmid R., *J. Biotechnol.* (1991) **18**, 153-160.
- Fink E., Comparison of Hirudins, *Sem. Thromb. Hemost.* (1989) **15**, 283-287.
- Fowles GR, *Introduction to modern optics*, 2nd ed., Dover Publications, Inc., New York 1989.
- Gauglitz G, Nahm W, *Fresenius Z. Anal. Chem.* (1991) **341**, 279 - 283.
- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, in: Baltes H., Göpel W., Hesse J. (Hrsg), *Sensors Update*, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996.
- Glaser R. W., *Anal. Biochem.* (1993) **213**, 152-161.
- Haake H. M., Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2000).
- Hänel C. Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2002), in Arbeit.
- Hecht E., *Optik*, 2. Auflage, Addison-Wesley, Bonn 1989
- Henschen A., Markwardt F., Walsmann P., *Folia Haematol (Leipzig)* (1988) **115**, 59-63.

- Hermanson G., Mallia A., Smith P., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, INC. San Diego 1992.
- Hillenkamp F., Ehring H., In *Mass Spectrometry in the Biological Sciences: A Tutorial*, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Niederlande, 1992.
- Hillenkamp F., Karas M., Beavis R. C., Chait B., *Anal. Chem.* (1991) **63**, 1193A-1203A.
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F. C., *J. Antimicrob. Chemother.* (1997) **40**, 135-136.
- Hiramatsu K., *Lancet Infect Dis.* (2001) **1(3)**, 147-155.
- Hiramatsu K., *Drug resistance updates* (1998) **1**, 135-150
- Hofmann K., Finn F. M., Friesen H. J., Diaconescu C., Zahn H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977) **74**, 2697.
- Hofmann K., Finn F. M., Kiso Y., *J. Am. Chem. Soc.* (1978) **100**, 3585.
- Jensen O., Podtelejnikov A., Mann M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996) **10**, 1371-1378.
- Johnson P. H., Sze S. R., Winant R., *Sem. Thromb Hemost.* (1989) **15**, 302-315.
- Karass M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.* (1987) **78**, 53.
- Karas M., Hillenkamp F., In *Advances in Mass Spectrometry*, Longevialle, P., Ed., Heyden & Sohn: London, 1989, 416.
- Kortt A. A., Gruen L. C., Oddie G. W., *J. Mol. Recogn.* (1997) **10**, 148-158.
- Krauss G., Gauglitz G., *Fresenius J. Anal. Chem.* (1992) **344**, 153-157.

- Krauss G., Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1993.
- Krone J. R., Nelson R. W., Dogruel D., Williams P., Granzow R., *Anal. Biochem.* (1997) **244**, 124-132.
- LeClerq R., Derlot E., Duval J., Courvalin P., *N. Eng. J. Med.* (1988) **319**, 157-161.
- Liu, Y. C.; Wang, F. S.; Lee, W. C., *Biochem. Eng. J.* (2001) **7**, 17-25.
- Mackay J. P., Gerhard U., Beauregard D. A., Westwell M. S., Searle M. S., Williams D. H., *J. Am. Chem. Soc.* (1994) **116**, 4581-4590.
- Macfarlane R. D., Torgerson D. F., *Science* (1976) **191**, 920.
- Mann M., Talbo G., *Curr. Opin. Biotechnol.* (1996) **7**, 11-19.
- McCormick M. K., Stark W. M., Pittenger R. C., McGuire G. M., *Antibiot. Annu.* (1995) 606.
- Mehlmann M., Vorbereitende Untersuchung zur Online-Überwachung eines Fermentationsprozesses, Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1999.
- Meyer B. J., Badimon J. J., Chesebro J. H., Fallon J. T., Fuster V., Badimon L., *Circulation* (1998) **97**, 681.
- Mirejovsky, D., and Arnett, E. M., *J. Am. Chem. Soc.* (1983) **105**, 1112-1117.
- Nagarajan R., Glycopeptide Antibiotics, R. Marcel Dekker Inc., New York, 1994.
- Nastume T., Nakayama H., Jansson Ö., Isobe T., Takio K., Mikoshiba K., *Anal. Chem.* (2000) **72**, 4193-4198.
- Nedlekov D., Nelson R. W., *J. Mol. Recog.* (2000) **13**, 140-145.

- Nelson R. W., Jarvik J. W., Taillon B. E., Tubbs K. A., *Anal. Chem.* (1999) **71**, 2858-2865.
- Nelson R. W., Nedlekov D., Tubbs K. A., *Electrophoresis* (2000) **21**, 1155-1163.
- Nicastro G., Baumer L., Bolis G., Tato M., *Biopolymers* (1997) **41**, 731.
- Nieto M., Perkins H. R., *Biochem. J.* (1971) **123**, 773-787.
- Nieto M., Perkins H. R., *Biochem. J.* (1971) **123**, 789-803.
- Piehler J., Schreiber G., *Anal. Biochem.*, (2001) **289**, 173-186.
- Price, C. P., Newman, D. J. (Eds.) *Principles and Practice of Immunoassay*. Second Edition, Stockton Press, New York, 1997.
- Rathgeb F., Charakterisierung von Wechselwirkungsprozessen in sensitiven Schichten, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Universität Tübingen (1999).
- Reichl D., Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines optischen Sensorsystems zur reflektometrischen Interferenzspektroskopie mit mehrfarbigen Leuchtdioden, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Universität Tübingen (2000).
- Rothmund M., Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Universität Tübingen (1999)
- Rydel T. J., Ravichabdran K. G., Tulinsky A., *Science*. (1990) **249**, 277-280.
- Schäfer M., Schneider T. R., G. M. Sheldrick, *Structure* (1996) **4**, 1509-1515.
- Schlegel H. G., *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1981.
- Schobel U., Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Universität Tübingen (1999).

Sönksen C. P., Nordhoff E., Jansson Ö., Malmqvist M., Roepstorff P., *Anal. Chem.* (1998) **70**, 2731-2736.

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1988) **60**, 2299.

Tünnemann R., Synthese und spektroskopische Untersuchung Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen und deren Anwendung in der Sensorik, Dissertation Eberhard-Karls-Universität Universität Tübingen (2000).

Van Oss, C. J., Nature of specific ligand-receptors bonds, in particular the antibody-antigen bond, *Immunochemisrry*, Marcel Dekker, New York, 1994, 581-614.

Van Oss, C. J., *Molec. Immunol.* (1995) **32**, 199-211.

Wallenga J. M., Pifarre R., Hoppenstaedt D. A., Fareed J., *Sem. Thromb. Hemost.* (1989) **15**, 316-333.

Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B., *Anal. Chem.* (1985) **57**, 675.

Wilchek M., Bayer E. A., *Meth. Enzymol.* (1990) **184**, 80.

Williams D. H., *Acc. Chem. Res.* (1984) **17**, 364-369.

Williams D. H.; Bardsley B., *Angew. Chem.* (1999) **111**, 1264-1286.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α -ACA-IgG	anti-Atrazincapronsäure Immunglobulin G
α -H-IgG	anti-Hirudin Immunglobulin G
ACA-BSA	Atrazincapronsäure-Rinderserumalbumin
AcKaa	N ^{α} -acetyl-L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin
AMD	Aminodextran
AMD-GA	Glutarsäure modifiziertes Aminodextran
BSA	Rinderserumalbumin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	Ethyl-N,N-dimethylaminopropylcarbodiimid-hydrochlorid
FIA	Fließinjektions-Analyse
GA	Glutarsäureanhydrid
GOPTS	3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino)-ethansulfonsäure-Lösung pH 7
ITO	Indium-Zinn-Oxid
Maldi	matrix assisted laser desorption ionisation
MRSA	methicilinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ova	Ovalbumin (Albumin aus Hühnereiweiß)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
RIFS	reflektometrische Interferenzspektroskopie

SECM	Scanning electron chemical microscopy
SPR	Surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
VRE	Vancomycin-resistente Enterococcen

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Publikationen

R. Tünnemann, M. Mehlmann, R. D. Süßmuth, B. Bühler, S. Pelzer, W. Wohlleben, H.-P. Fiedler, K.-H. Wiesmüller, G. Gauglitz, G. Jung: Optical Biosensors – Monitoring studies of Glycopeptide Antibiotic Fermentation Using White Light Interference; *Anal. Chem.* (2001) **73**, 4313-4318.

M. Mehlmann, R. Tünnemann, G. Jung, G. Gauglitz, Markierungsfreie Interaktionsanalyse zur Online-Überwachung von Fermentationsprozessen, *BIOSpektrum Sonderausgabe: Sensorik* (2001), 19.

M. Mehlmann, A. Garvin, M. Steinwand, G. Gauglitz, Coupling of reflectometric interference spectroscopy with Maldi-TOF mass spectrometry, in Vorbereitung.

7.2.2 Poster

M. Mehlmann, R. Tünnemann, B. Bühler, H.-P. Fiedler, G. Jung, G. Gauglitz, Optische Biosensoren zur Online-Überwachung von Fermentationprozessen, Bamberg 2000.

M. Mehlmann, R. Tünnemann, H.-P. Fiedler, S. Pelzer, W. Wohlleben, G. Jung, G. Gauglitz, Reflektometrische Interferenzspektroskopie zur Online-Überwachung eines Fermentationsprozesses, Leipzig 2000.

M. Mehlmann, R. Tünnemann, H.-P. Fiedler, S. Pelzer, W. Wohlleben, G. Jung, G. Gauglitz, Online-Überwachung eines Fermentationsprozesses mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Biosensor Tübingen 2001.

7.2.3 Vorträge

M. Mehlmann, B. Bühler, R. Tünnemann, G. Jung, G. Gauglitz, On-line-Monitoring der Vancomycin-produktion in einem Bioreaktor, LifeCom Düsseldorf 2000.

M. Mehlmann, B. Bühler, R. Tünnemann, G. Jung, H.-P. Fiedler, G. Gauglitz, Online-monitoring of the production of vancomycin in a bioreactor, Achema Frankfurt 2000.

M. Mehlmann, R. Tünnemann, H.-P. Fiedler, S. Pelzer, W. Wohlleben, G. Jung, G. Gauglitz, On-line Überwachung von Fermentationsprozessen mit optischen Biosensoren, Heiligenstadt 2000.

M. Mehlmann, R. Tünnemann, G. Jung, G. Gauglitz, Reflektometrische Interferenzspektroskopie zur integrierten Online-Prozesskontrolle, Terra-Tec Leipzig 2001

M. Mehlmann, R. Tünnemann, H.-P. Fiedler, S. Pelzer, W. Wohlleben, G. Jung, G. Gauglitz, Optical Biosensors for fermentation monitoring, Sensor Nürnberg 2001.

7.3 Akademische Lehrer

K. Albert, E. Bayer[†], D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel[†], P. Grathwohl, G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack[†], B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

7.4 Lebenslauf

Name: Mehlmann Martin

Geburtsdatum: 08.12.1972

Geburtsort: Ravensburg

Schulbildung: 1979-1983 Grundschule Wilhelmsdorf
1983-1992 Gymnasium Wilhelmsdorf
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992-1999 Studium der Chemie an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Diplomprüfung: April 1999

Diplomarbeit: Mai 1999 - Oktober 1999
unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für
Physikalische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: Vorbereitende Untersuchungen zur Online-
Überwachung von Fermentationsprozessen

Promotion: November 1999 - Juli 2003
unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für
Physikalische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: Einsatz optischer Biosensoren für die Protein- und
Fermentationsanalyse