Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln als dreidimensionale Affinitätsoberfläche zum Proteinnachweis auf Microarrays

Von der Fakultät Geo-und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Kirsten Borchers

aus Karlsruhe

Hauptberichter:	Prof. Dr. techn. H. Brunner
Mitberichter:	Prof. Dr. P. Scheurich
Tag der mündlichen Prüfung:	7. März 2007

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2007

Inhalt

1 ZUSAMMENFASSUNG 8

2 SUMMARY 11

3 EINLEITUNG 14

3.1 Aufgabenstellung 21

4 MATERIAL UND METHODEN 22

4.1 Material 22

4.2 Kern-Schale Nanopartike 26

4.2.1 Synthese anorganischer Silica-Kerne nach dem Stöber-Verfahren 26
4.2.2 Funktionalisierung der Partikel-Oberfläche mit organischer Schale 26
4.2.3 Partikel-Charakterisierung 27
4.2.4 Kovalente Proteinanbindung mittels Carbodiimid-Chemie 29

4.3 Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung von Proteinen 30

4.4 Biochip-Herstellung und Charakterisierung 32

4.4.1 Reinigung und Hydroxylierung der Substrat-Oberflächen 32
4.4.2 Substratbeschichtung mittels Layer-by-Layer Technik 33
4.4.3 Null-Ellipsometrie 34
4.4.4 UV-Ablation von Polyelektrolytschichten 35
4.4.5 Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (ESCA) 35
4.4.6 Drucken von Microarrays 35
4.4.7 Rasterkraftmikroskopie 36

4.5 Inkubation der Microarray-Oberflächen mit Proteinlösungen 36

4.6 Signaldetektion 36

4.6.1 Fluoreszenzdetektion 36
4.6.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie 37

4.7 Bestimmung von systematischen Fehlern bei der Chipherstellung 38

4.8 Bestimmung des Auflösungsvermögens 39

4.9 Identifizierung von Messwert-Ausreißern 41

4.10 Normierung von Messwerten 42

4.11 Modellierungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes 42

4.11.1 Das Ambient-Analyte Modell und massensensitive Tests 43

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 46

5.1 Anbindung von Fänger-Proteinen auf der Nanopartikel-Oberfläche 46

5.1.1 Kovalente Proteinanbindung mittels Carbodiimid-Chemie 47
5.1.2 Gerichtete Anbindung von IgG an Protein G-modifizierte Partikel 51
5.1.3 Vergleich von ungerichteter und gerichteter IgG-Immobilisierung 52
5.1.4 Zetapotenzial proteinmodifizierter Nanopartikel-Oberflächen 56

5.2 Mikrostrukturierte Schichten aus proteinbeschichteten Nanopartikeln 57

5.2.1 Partikeladsorption an mikrostrukturierte Polyelektrolytschichten 57
5.2.2 Das Drucken von Microarrays 63
5.2.3 Stabilität adsorbierter Nanopartikel-Multilagen 67

5.3 Maximierung der Bindekapazität von Microspots aus biofunktionellen Nanopartikeln 71

5.4 Modellierungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes 74

5.5 Erhalt der Protein-Funktion 77

5.6 Langzeitstabilität von Nanopartikel-basierten Protein-Microarrays 80

5.7 Spezifität der Bindungsaktivität 82

5.8 Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Chipqualität 84

5.9 Auflösungsvermögen 91

5.10 Dynamischer Messbereich Nanopartikel-basierter Protein-Microarrays 94

5.11 Simultaner Nachweis von Antigenen und Antikörpern: modulare Oberflächen aus Nanopartikelschichten bieten flexible Kopplungschemie zum Aufbau optimierter Multichips für diagnostische Zwecke 97

5.11.1 Gerichtete Immobilisierung von Anti-Tsa1p-Antikörpern über Protein G 98
5.11.2 Bindekapazität von Microspots aus Anti-Tsa1p-Antikörper-Partikeln 100
5.11.3 Nachweisgrenze für Tsa1p und Anti-Tsa1p 102
5.11.4 Simultaner Nachweis von Tsa1p und Anti-Tsa1p-Antikörpern 104

5.12 Analytdetektion an Nanopartikelschichten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie 107

5.12.1 Massenspektrometrischer Protein-Nachweis an biofunktionalisierten Nanopartikelschichten 108
5.12.2 Nachweis von einem Femtomol Neurotensin in Nanopartikel-Microspots 111

6 AUSBLICK 113

7 LITERATUR 115

Abkürzungen und englische Fachausdrücke

Ac47	Acetat-Puffer: 0,1 M $NaCH_3CO_2$, pH 4,7
Alexa 546	Alexa Fluor®546-Carbonsäure Succinimidylester
Alexa 647	Alexa Fluor®647-Carbonsäure Succinimidylester
APS	3-Aminopropyltriethoxysilan
bA647CytC	Biotinyliertes, Alexa Fluor® markiertes Cytochrom C
BSA	Bovines Serum Albumin
Carbonatpuffer	0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3
COOH-	Carboxyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N´-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid
ESCA	Elektronenspektroskop(ie) zur chemischen Analyse
Fc-Teil	*Fragment crystalline* (engl.) eines Immunoglobulins. Durch Papain abspaltbarer Teil der schweren Ketten der Immunoglobuline, der sich kristallisieren lässt.
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
hpd	*hits-per-do*t, Anzahl der Nadel-Substrat-Kontakte beim Drucken eines Mirospots
IgG	Immunoglobulin G
k	Imaginärteil des komplexen Brechungsindex
MES 45/50	Morpholinoethansulfonsäure-Puffer: 0,1 M $C_6H_{13}NO_4S$, pH 4,5 / pH 5,0
n	Realteil des komplexen Brechungsindex
N	Stichprobengröße
NaCl	Natrium Chlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NH_2-	Amino-
PAA	Polyacrylsäure
PAH	Polyallylamin Hydrochlorid
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (engl.):(0,01 M Phosphatpuffer mit NaCl (137 mM) und KCl (2,7 mM), pH 7,4
PBS/Tr	PBS mit einem Zusatz von 0,1 % (v/v) TritonX 100
PE	Polyelektrolyt
PP70	0,1M Phosphat-Puffer, pH 7,0
REM	Rasterelektronenmikroskop

TEOS	Tetraethoxysilan
THF	Tetrahydrofuran
Tsa1p-MBP	*Thiol-Specific Antioxidant-Like Protein* konjugiert mit Maltose-bindendem Protein
Wasser	Reinstwasser (18,3 MΩ cm^{-1}) aus der Barnstead eaSyPUR-Anlage
MALDI-(TOF) Massen-spektrometrie	*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-(Time of Flight*) (engl.) Massen-spektrometrie: Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisatstion (Flugzeit-) Massenspektrometie
SELDI	*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation*
MWCO	*Molecular Weight Cut Off*
SAM	Selbstordnende Einfachschichten (engl.:*Self-Assembled Monolayers*)
SAv	Streptavidin
SiO_2	Siliziumdioxid

(Micro) Array:	Anordnung aus (Micro) Spots mit spezifischen molekularen Affinitäten zur simultanen Untersuchung einer Vielzahl von Testsubstanzen auf einer Fläche von wenigen Quadratmillimetern bis Quadratzentimetern.
Assay:	Test
(Micro) Spot:	Bereich (Durchmesser < 250 µm) auf einem Trägermaterial, der mit biologischen Fängermolekülen funktionalisiert ist (hier: mit funktionalisierten Nanopartikeln).
(MTP) Well:	Einzelkompartiment einer Mikrotiterplatte
(Cross-)Linker:	Verbindungsstück, das zwei Moleküle kovalent aneinander bindet.
Display- (Technik)*:*	Darstellungs-Technik, bei der biologische Strukturen wie Phagen oder Ribosomen Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, die dadurch für funktionelle Tests zugänglich sind.
(Bio-)Chip:	Planares Trägermaterial, z. B. Glasobjektträger, das durch das Aufdrucken von Microarrays eine (bio-)funktionalisierte Oberfläche besitzt.
Open Reading Frame:	Gensequenz auf einem codogenen DNA Strang, die zwischen einem Start- und einem Stop-Codon liegt, und deshalb potentiell die Information zur Expression eines realen Proteins darstellt.
Microbeads:	Sphärische Partikel mit Durchmessern > 1 µm
Glasslides:	Mikroskop-Objektträger aus Glas
Layer-by-layer	Beschichtungstechnik, bei der neg. und pos. geladenen Polymere oder Partikel abwechselnd an eine Oberfläche adsorbieren , so dass Multilagen erzeugt werden.
Quantum Dots	Quantenpunkte: nanoskopische Strukturen, in denen Ladungsträger räumlich so eingeschränkt sind, dass ihre Energie nur noch diskrete Werte annehemen kann. Dadurch lassen sich elektronische und optische Eigenschaften, z. B. das Fluoreszenzspektrum, maßschneidern.

1 Zusammenfassung

Biomoleküle, die auf der Oberfläche von Nanopartikeln angebunden sind, sind für viele Anwendungen besser zugänglich als in gelöster Form: immobilisiert an einer dispergierbaren, nanoskopischen Feststoffphase, können Proteine beispielsweise leicht aus einem Medium abgetrennt und in ein anderes überführt werden. Auch die räumliche Orientierung der Moleküle kann gesteuert werden, indem ihre Immobilisierung auf einer Feststoffoberfläche auf molekularer Ebene kontrolliert wird. Nanopartikel mit einer Schale aus Proteinen stellen außerdem ein Material dar, das eine extrem große biofunktionelle Oberfläche besitzt. Dieser vielseitige biofunktionelle Werkstoff wurde in der vorliegenden Arbeit einem breiten Anwendungsspektrum verfügbar gemacht. Biofunktionalisierte Nanopartikel wurden in Form von mikrostrukturierten Schichten auf Glasoberflächen abgeschieden. Die partikelgebundenen Proteine wurden so konserviert, dass ihre biologische Funktionalität außerhalb der natürlichen wässrigen Bedingungen erhalten blieb. Auf diese Weise wurden dreidimensionale Affinitätsoberflächen erzeugt. Die mikrostrukturierten Nanopartikelschichten waren sowohl mit Fluoreszenzdetektion als auch mit MALDI (*Matrix Assisted Laser-Desorption / Ionisation*)-Massenspektrometrie kompatibel und konnten als dreidimensionale Biochip-Oberflächen für den spezifischen und sensitiven Nachweis von Proteinen im Microarray-Format eingesetzt werden.

Für die Herstellung biofunktionalisierter Nanopartikel wurden Kern-Schale-Partikel verwendet, die einen anorganischen SiO_2-Kern und eine organische Schale aus funktionellen Silanen besaßen. Die Partikel hatten einen mittleren Durchmesser von 117 nm. An die organofunktionellen Schalen der Partikel wurden mittels unterschiedlicher Kopplungsmechanismen Proteine angebunden. Als spezifische Fängermoleküle wurden Streptavidin, Protein G sowie Immunoglobulin G (IgG)-Antikörper auf Nanopartikel-Oberflächen immobilisiert. Die kovalente, ungerichtete Protein-Anbindung basierte auf der carbodiimidvermittelten Ausbildung von Amidbindungen zwischen partikelständigen Carboxylgruppen und freien Aminogruppen der Protein-Moleküle. IgG-Antikörper konnten auch gerichtet auf Nanopartikel-Oberflächen immobilisiert werden. Die gerichtete Anbindung erfolgte über den Fc-Teil der IgG-Antikörper auf Nanopartikel-Oberflächen, die zuvor kovalent mit Protein G modifiziert worden waren.

An Partikeln, auf denen polyklonale Anti-Tsa1p-Antikörper über Protein G gerichtet immobilisiert worden waren, wurde eine 1,6 fach höhere Tsa1p-Anbindung beobachtet als an Partikeln, welche bei gleichem Antikörper-Einsatz mit zufällig ausgerichteten Antikörper-Molekülen funktionalisiert worden waren.

Bei der Immobilisierung von IgG-Molekülen auf Partikel-Oberflächen wurde eine maximale Belegungsdichte von 8,2 x 10^{11} Molekülen pro cm^2 erreicht. Dies entspricht der Immobilisierung von einem Antikörpermolekül auf einer Fläche von 115 nm^2.

Proteinbeschichtete Nanopartikel besaßen bei neutralem pH-Wert ein negatives Zetapotenzial im Bereich von -50 mV bis -20 mV. Das Zetapotenzial war abhängig vom isoelektrischen Punkt der angebundenen Proteine und vom pH-Wert der Partikelsuspension. Die negative Oberflächenladung der Partikel ermöglichte ihre Abscheidung auf positiv geladenen Oberflächen. Glas- und Siliziumsubstrate wurden mittels *Layer-by-Layer* Tauchtechnik mit Polyelektrolyten beschichtet und so mit einer geladenen Oberfläche ausgestattet.

Die biofunktionalisierten Nanopartikel wurden mittels indirekter oder direkter Strukturierungsverfahren mikrostrukturiert auf den vorbehandelten Substrat-Oberflächen abgeschieden. Bei der indirekten Strukturierung adsorbierten Partikel ortsselektiv an Polyelektrolytschichten, die mittels Photoablation durch eine mikrostrukturierten Maske vorstrukturiert worden waren. Es wurde die bei Adsorptionsprozessen theoretisch maximal mögliche Belegungsdichte von 55 % erreicht. Die Dichte der Partikelbelegung war abhängig von der Ladungsdichte entlang der Polyelektrolytketten, der morphologischen Struktur der Polyelektrolytschichten, der Konzentration der Partikel in der Suspension und von der Anzahl der Immersionen der Substrate in Partikelsuspension.

Mit Hilfe eines Nadel-Ring-Druckers wurde Nanopartikelsuspension auch direkt auf durchgehend beschichtete Substrate aufgedruckt. Die spezifische Oberfläche der erzeugten dreidimensionalen Microspots war bis zu 54-fach größer als die Grundfläche der Spots. Die Nanopartikel-Microspots besaßen einen mittleren Durchmesser von 150 µm und eine Grundfläche von 0,018 mm^2. Die Menge der pro Spot auf das Substrat übertragenen Partikel war abhängig vom Feststoffgehalt der zum Drucken verwendeten Partikelsuspension. Multilagen aus bis zu sieben Nanopartikel-Schichten hafteten stabil auf den Substratoberflächen. Stabile Microspots bestanden aus bis zu 22 x 10^6 Nanopartikeln und besaßen folglich eine Gesamtoberfläche von 0,976 mm^2.

Für Microspots aus Streptavidin-modifizierten Nanopartikel wurden Bindekapazitäten für biotinyliertes Cytochrom C bestimmt. Verwendung von Partikel-Suspension mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} resultierte in einer Bindekapazität von 0,480 $\pm$ 0,320 fmol pro Spot. Suspension mit einem Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} erzeugte Spots mit einer Bindekapazität von 2,23 $\pm$ 0,40 fmol und Suspension mit einem Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} erzeugte Spots mit einer Bindekapazität von 4,9 $\pm$ 0,9 fmol.

Unter dem Aspekt der Signalsteigerung erwies es sich als vorteilhaft, eine möglichst große Menge Partikel pro Spot aufzubringen. Die Vergrößerung der spezifischen Affinitätsoberfläche der Microspots hatte bei gegebener Analytkonzentration eine Verstärkung der Analytanbindung

zur Folge. Bei fester Analytkonzentration korrelierte die detektierte Signalintensität linear mit der Partikelmenge pro Spot, bis bei Erzeugung von dicht gepackten, mehrlagigen Nanopartikelschichten eine Sättigungsgrenze erreicht wurde.

Die große Bindekapazität der dreidimensionalen Microspots resultierte auch in einem weiten dynamischen Bereich für den Analytnachweis. Er überspannte fünf Größenordnungen Analytkonzentrationen. Die untere Nachweisgrenze für sekundäre Antikörper durch Nanopartikel-Microarrays, die mit primären Antikörpern funktionalisiert waren, lag bei 400 fM. Die Sättigungsgrenze wurde bei 50 nM erreicht. Der lineare dynamische Bereich erstreckte sich über vier Größenordnungen von 400 fM bis 4 nM.

Microspots mit größerer Partikeldichte wiesen eine erhöhte Empfindlichkeit auf, das heißt, sie reagierten auf Änderungen der Analytkonzentration mit stärkeren Signaländerungen als Microarrays aus Spots geringerer Partikeldichte. Die Empfindlichkeit nahm allgemein ab, wenn sich die Affinitätsoberflächen der Sättigung näherten. Microarrays mit der höchsten stabilen Partikelbelegung erreichten bei einer Analytkonzentration von 5 nM eine Auflösung von 4,1.

Microarray-Oberflächen aus biofunktionellen Nanopartikelschichten konnten bei Raumtemperatur trocken über mindestens 15 Monate gelagert werden, ohne dass eine Tendenz zur Verschlechterung der Funktionalität zu erkennen war. Für den Erhalt der nativen Konformation der partikelgebundenen Proteine innerhalb der trockenen Partikelschichten wurde der Spotting-Suspension Trehalose zugegeben. Die optimale Stabilisierung der Proteine wurde bei einer Trehalosekonzentration von 5 % (Gewicht/Volumen) erreicht.

Nanopartikel-Microarrays waren sowohl mit Fluoreszenzdetektion kompatibel als auch mit MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS), den Standard-Ausleseverfahren der modernen Molekularbiologie und der Proteomforschung. Fluoreszenzmessungen an Nanopartikelspots aus Suspensionen mit Feststoffgehalten von bis zu 500 mg mL^{-1} zeigten, dass die Partikelschichten keinen Eigenfluoreszenz-Hintergrund erzeugten. MALDI-TOF-MS-Analysen an Partikel-Spots, die 1 fmol des Peptids Neurotensin enthielten, lieferten nach Präparation der Oberfläche mit lichtabsorbierender Matrix isotopenaufgelöste Signale und zeigten so, dass MALDI-TOF Massenspektrometrie durch die dreidimensionale Struktur der Nanopartikel-Schichten nicht gestört wurde.

Der modulare Aufbau der Microarrays aus Nanopartikelschichten ermöglichte die gezielte und voneinander unabhängige Optimierung der Anbindung verschiedener Fängerelemente. Zum simultanen Nachweis von Tsa1p (*thiol-specific antioxidant-like protein*), einem Protein aus *Candida albicans*, und einem polyklonalen Anti-Tsa1p-Antikörper wurden Nanopartikel jeweils mit dem komplementären Fängerelement ausgerüstet: als Fänger für den Antikörper wurde Tsa1p

auf carboxyfunktionalisierten Nanopartikeln immobilisiert, für den Nachweis von Tsa1p wurde der Anti-Tsa1p Antikörper auf Protein G-modifizierten Nanopartikeln immobilisiert. Im Hinblick auf diagnostische Anwendungen von Nanopartikel-basierten Microarrays wurde mit diesem duplexen Testsystem gezeigt, dass Antigene und Antikörper simultan und sensitiv in einer Probe nachgewiesen werden konnten.

Die hohe Bindekapazität und die hohe Fängerdichte sowie der modulare Aufbau der Nanopartikel-Microarrays machen Biochips aus Nanopartikel-Schichten hochrelevant für viele Anwendungen. Die besonderen Stärken der Methode kommen zum Tragen, wenn für den empfindlichen Nachweis eines Analyts möglichst viele der in der Probe vorhandenen Analytmoleküle auf der Sensor-Oberfläche immobilisiert werden sollen und bei der Entwicklung von Hybrid-Tests, welche mit unterschiedlichen Fängerelementen verschiedene Biomoleküle in einer Probe nachweisen können.

2 Summary

In the presented work biochip surfaces of layered nanoparticles were developed. Core-Shell nanoparticles with a core of anorganic silicon dioxide and a shell of organic silanes were used to covalently bind distinct proteins as specific capture molecules to particle surfaces. These biofunctionalized nanoparticles were precipitated as microstructured layers on substrate surfaces, generating three-dimensional microspots with high binding capacity for specific target molecules.

Separation of protein immobilization from microstructuring enabled a modular chip assembly. This allowed for adaption of immobilization strategies to characteristics of used capture molecules.

Biochip surfaces composed of layered nanoparticles were tested using streptavidin as well as protein G and immunoglobulin G (IgG) covered nanoparticles. Detection of capture molecules as well as evaluation of binding capacities was done using fluorescently labeled detection molecules. Proteins were covalently bound to carboxylated particle surfaces in a nondirected way by carbodiimide mediated generation of amide bonds of carboxyl groups on particle surfaces and amino groups of proteins. Additionally, directional binding of IgGs was achieved using protein G modified nanoparticles. Comparison of IgG-modified particles prepared by using identical amounts of antibody revealed that antigen binding capacity was increased up to 1.6 fold when directionally binding capture antibodies to protein G particles.

Optimization of reaction parameters allowed for immobilization of one molecule of IgG per 115 nm^2 or a population density of 8.2 x 10^{11} cm^{-2}, respectively.

The zeta potential of protein covered nanoparticles was found to be dependent on the pI value of bound proteins as well as the pH value of the particle suspension, with neutral pH giving rise to

negative zeta potentials of -50 mV to -20 mV for all nanoparticles used. Negative surface charge allowed for precipitation of particles on positively charged surfaces generated by coating of glass or silicone surfaces with polyelectrolytes using a layer-by-layer dipping technique.

Biofunctionalized nanoparticles could be deposited on functionalized substrates via direct or indirect structuring procedures. Use of prestructured polyelectrolyte layers generated by UV irradiation of polyacrylic acid and polyallylamine layers through microstructured templates allowed adsorption of nanoparticles selectively to areas of intact polyelectrolyte layers during immersion in particle suspension. Particle density turned out to be dependent on charge density of polyions and could be manipulated via the structure of polyelectrolyte layers, the concentration of particles in suspension and the number of immersions. A maximal population density of 55 % has been achieved using substrates covered with the strong polycation polydiallyldimethylammonium-chloride, which meets a theoretical maximal density according to the "random sequential adsorption" model. Direct deposition of differentially functionalized particles in a microarray format was achieved by printing nanoparticle suspensions on uniformly functionalized substrates using a pin-ring spotter. The amount of particles being transferred to surface was found to be dependent on the solids content of the particle suspension. Scanning electron microscopic (SEM) analysis revealed generation of multi-layered particle microspots when using solids contents up to 160 mg per mL, with the microspots being resistant to standard washing procedures. 22 x 10^6 particles with a total surface area of 0,976 mm^2 were deposited on a footprint of 0,018 mm^2, thus enlarging the geometrical surface by 54.

Comparison of signals from spots saturated with analyte to signals from nanoparticle suspensions containing defined amounts of analyte allowed for quantitative measuring of binding capacity of nanoparticle spots. Increasing the solids contents of streptavidin-particle suspension from 20 mg ml^{-1} to 80 mg ml^{-1} and to 160 mg ml^{-1} gave rise to increased binding capacities for biotinylated cytochrome C from 0.48 $\pm$ 0.32 fmol to 2,23 $\pm$ 0,40 fmol to 4.92 $\pm$ 0.94 fmol.

Increased amount of binding sites on microspots shifted the ratio of bound to free analyte molecules towards analyte-capture molecule complexes, resulting in increased signal intensities at given amounts of analyte. Optimization of binding capacity allowed for immobilization of a maximal portion of analyte per sample and increased the probabilities for detectable signals at small concentration of analytes. Increasing number of binding sites also shifted the saturation concentration to higher values. Thus streptavidin functionalized nanoparticle surfaces displayed a broad dynamic range for detection of biotinylated cytochrome C spanning five orders of magnitude with detection limit of 400 fM and saturation at 50 nM. The linear dynamic range spanned four orders of magnitude from 400 fM to 4 nM of biotinylated cytochrome C.

In the context of sensitivity it was shown beneficial to spot a maximum amount of particles per spot since the changes in signal intensity resulting from changes in concentration of analyte were more pronounced when using microarrays spotted with suspensions with solids content of 160 mg ml^{-1} compared to 20 or 80 mg ml^{-1}. However, since the increase in sensitivity resulting from increased particle density was accompanied by an increase of standard deviations no gain of resolution could be achieved.

Microarrays covered with biofunctionalized nanoparticles were dried and stored at room temperature without detectible loss of functionality for at least 15 months. Preservation of the native conformation of particle-bound proteins was achieved by adding 5 % (weight per volume) trehalose to the spotting buffer.

Nanoparticle arrays proved compatible with state-of-the-art read-out methods of molecular biology and proteomics, such as fluorescence scanning and MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flightmass-spectrometry). No auto-fluorescence was detectible when scanning nanoparticle spots from suspensions with solids contents up to 500 mg per mL. The 3D structure of nanoparticle spots did not interfere with MALDI-TOF-MS detection of peptides embedded into particle layers. This was shown by MALDI-TOFMS analysis of nanoparticle spots containing 1 fmol of the peptide Neurotensin, which was detected in isotope-resolved signals. Comparison with the acquired binding capacities showed that on affinity surfaces consisting of biofunctionalized nanoparticles enough analyte could be immobilized for mass-spectrometric analysis in microarray format.

Potential applications for high capacity nanoparticle-microarrays can be found in diagnostic protein detection. Exemplary, simultaneous detection of antigen and antibody in the same sample was evaluated. For this purpose particles functionalized with *Candida albicans* protein Tsa1p (*thiol-specific antioxidant-like protein*) as well as particles functionalized with a polyclonal anti-Tsa1p antibody were used as capture-elements for anti-Tsa1p and Tsa1p, respectively. The modular design of nanoparticle arrays allowed for tailored optimization of capture-surfaces with different affinities using Protein G-modified particles for antibody-immobilization and COOH-modified particles for covalent conjugation of Tsa1p. By means of such a two-component system the concept of assembly of multiplexed test systems was proofed.

The high binding capacity and high density of capture molecules as well as the wide dynamic range and the modular assembly render biochip surfaces composed of nanoparticle layers highly relevant for applications requiring immobilization of large amounts of analyte on surfaces for detection of biomolecules.

3 Einleitung

Microarrays

Die Protein-Microarray-Technologie befindet sich derzeit in der Phase der technischen Entwicklung. Bereits jetzt zeigen aktuelle wissenschaftliche Arbeiten das große Potenzial der Methode auf. Einen Überblick über den Stand der technischen Entwicklungen und über wichtige Veröffentlichungen geben neuere Reviews [1-4].

Das Konzept des Microarrays beruht auf dem von Ekins und Kollegen aufgestellten *Ambient-Analyte*-Modell [5, 6]. Dieses besagt, dass miniaturisierte Ligandenbindungstests, bei denen die Fängermoleküle in Form von Microspots auf wenigen Quadratmikrometern Fläche immobilisiert werden, grundsätzlich eine exaktere Bestimmung der Analytkonzentration zulassen und eine höhere Nachweisempfindlichkeit besitzen als makroskopische Tests.

Ligandenbindungstest dienen im Allgemeinen dazu, in komplexen Proben gezielt bestimmte Analytmoleküle nachzuweisen. Die selektive Detektion wird erreicht, indem die Bindung des Analyten an einen sehr spezifischen Bindungspartner beobachtet wird. Ligandenbindungstests für den Proteinnachweis wurden ursprünglich in Mikrotiterplatten entwickelt [7]. In einer Mikrotiterplatte können in bis zu 384 einzelnen Kompartimenten unterschiedliche Fängermoleküle immobilisiert werden und so können Proben mit Volumina von 200 µL oder weniger in Einzelansätzen parallel einer großen Zahl von Tests unterzogen werden.

Bei einem Microarray werden die spezifischen Fängermoleküle in Form von räumlich getrennten Microspots auf einem Festkörper-Substrat immobilisiert. Die Reduzierung von Bindestellen bei konstanter Dichte der Fängerstellen resultiert in der von Ekins postulierten Steigerung der Nachweisempfindlichkeit, denn bei ausreichender Miniaturisierung wird verhindert, dass durch den Test der Analyt in der Probe verarmt. Die Signaldichte steigt, weil die Ausbildung der Fänger-Ligand-Komplexe auf die Microspot-Flächen konzentriert wird. Gleichzeitig wird eine unverzerrte Bestimmung der Analytkonzentration ermöglicht. Diese Konstellation wurde von Ekins *Ambient-Analyte*-Bedingung genannt [8].

Die Miniaturisierung erlaubt es außerdem, Bindestellen mit unterschiedlichen Affinitäten in großer Dichte auf kleiner Fläche zu integrieren. So kann eine Probe mit einem Volumen von etwa 20 µL in einem einzigen Test simultan bezüglich eines ganzen Sets von Analyten untersucht werden. Die eindeutige Zuordnung der Ortskoordinaten zu einer Fänger-Spezies ist beim Microarray der Schlüssel zur Unterscheidung individueller Bindeereignisse.

Die Leistungsfähigkeit von Microarrays hängt entscheidend von den Affinitäten der Fängermoleküle zu den Analyten ab. Die dreidimensionale Struktur von Proteinmolekülen ist

Voraussetzung für ihre Funktion und ihre spezifischen Bindeeigenschaften und muss daher bei der Immobilisierung auf einer Oberfläche erhalten bleiben. Proteine sind komplexe Moleküle mit sehr unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften und es ist nicht allgemein vorhersagbar unter welchen Bedingungen die Struktur eines Proteins bei Immobilisierung auf einem Substrat erhalten bleibt. Entwicklungen auf dem Gebiet der Protein-Microarrays haben bereits ein breites technisches Repertoire hervorgebracht. Dieses ermöglicht die Erzeugung von hochselektiven und dabei möglichst homogenen Fängerelementen sowie die effektive und schonende Immobilisierung der Fängerelemente mittels unterschiedlicher Kopplungsstrategien und die empfindliche Detektion von Bindeereignissen.

Immobilisierungsstrategien

Standard-Substrate bei der Herstellung von Protein-Microarrays sind Objektträger aus Glas. Für die Immobilisierung von Fängerproteinen auf Glas gibt es vielfältige Oberflächen-Funktionalisierungen, die in mehreren Studien miteinander verglichen wurden [9-11]. Für kovalente Proteinanbindung und Proteinadsorption eignen sich Aldehydsilan-, Aminosilan-, Epoxysilan-, Polystyren-, PEG-Epoxy-beschichtete Glasslides sowie Glasoberflächen, die mit funktionalisierten Dendrimeren [12], Poly-L-Lysin oder aktivem Maleimid-NHS-Ester modifiziert sind [11] und *Self Assembled Monolayers* (*SAMs*) aus funktionellen Thiolen auf goldbeschichteten Glas-Objektträgern [13] oder Organosilan-*SAMs* auf Siliziumoxid-Oberflächen [14]. Beschichtungen aus Acrylamid [15], Nitrocellulose [9, 10, 16], Agarose [17] oder funktionalisierten Dextranen [18] bieten eine dreidimensionale Matrix, an die Proteine physikalisch adsorbieren. Für die Immobilisierung von Fängermolekülen über einen molekularen Linker können Linkermoleküle entweder chemisch oder bei der rekombinanten Herstellung direkt über die Gensequenz mit dem Protein konjugiert werden: Protein-Biotin-, Protein-Streptag®- oder Protein-His-Tag-Konjugate können auf Streptavidin- [19], StrepTactin®- oder Ni-NTA-modifizierten Oberflächen [20] angebunden werden.

Fängerelemente

Antikörper sind natürliche Proteinbinder mit hoher Affinität. Die Assoziationskonstanten K_a von Immunoglobulinen G (IgG) und den zugehörigen Antigenen zum Beispiel liegen üblicherweise im Bereich von 10^8 bis 10^{12} M^{-1}. IgG-Moleküle waren daher auch die ersten hochspezifischen Fängermoleküle, die bei der Herstellung von Microarrays zum Einsatz kamen. IgG-Moleküle können kovalent oder nicht-kovalent, direkt oder über Linker, gerichtet und ungerichtet, als Komplettmolekül oder in Form von antigenbindenden Fragmenten auf einem Substrat immobilisiert werden [19, 21]. Komplette Antikörper von definierter Qualität werden in speziellen Zellklonen hergestellt. Die Etablierung dieser Hybridome und die Aufreinigung der Antikörper sind

aufwändige Prozesse. Methoden, die ebenfalls Immunoglobulin-Bindedomänen bereitstellen, aber weniger aufwändig sind als die Erzeugung monoklonaler Antikörper in Hybridomen, sind zum Beispiel die Produktion funktioneller Antikörperfragmente in Bakterien [22, 23], Phagen-Display [24] oder *in vitro* Darstellungen wie ribosomales Display [25, 26]. Alternativ zu Immunoglobulin-Bindedomänen können durch Mutagenese der Binderegionen von Fibronectin [27], Lipocalinen [28] oder der Z-Domäne von Protein A [29] spezifische Bindeelemente für bekannte Analyten generiert werden. Eine weitere Alternative stellen Aptamere [30] dar, Oligonukleotide mit signifikanter Affinität zu einem Analyten, welche in mehrstufigen Selektionsprozessen identifiziert wird.

Detektion

Die Detektion von Bindeereignissen kann durch direkte oder indirekte Markierung des gebundenen Analyten oder über markierungsfreie Techniken geschehen. Bei der direkten Markierung werden die Analytmoleküle selbst markiert. Dazu werden alle Moleküle einer Probe mit einem Marker konjugiert und die Fänger-Analyt Affinität ist ausschlaggebend dafür, dass ausschließlich der gesuchte Analyt auf der Arrayoberfläche anbindet. Als Marker dienen Fluoreszenzfarbstoffe [31] oder beispielsweise Haptene wie Biotin zur anschließenden Detektion durch markiertes Streptavidin [32]. Aufgrund der ortsaufgelösten Immobilisierung der spezifischen Fängermoleküle im Microarray reicht eine einheitliche Markierung aus, um differenziert das Vorhandensein von einzelnen Analyten in der Probe nachzuweisen. Die relative Quantifizierung der vorhandenen Proteinmengen in Bezug auf eine Referenzprobe oder im Vergleich von mehreren Proben kann in ratiometrischen Ansätzen erreicht werden [31, 33, 34]. Hierfür werden verschiedene Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, gemischt und in einem einzigen Ansatz auf einer Microarray-Oberfläche untersucht. Das Verhältnis der Signalintensitäten der unterschiedlichen Farbstoffe gibt Auskunft über relative Konzentrationsunterschiede zwischen den Analyten in den untersuchten Proben. Eine viel versprechende Alternative zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen sind Halbleiter-*Quantum-Dots*, die – abhängig von ihrer Größe – stabile Fluoreszenzsignale in allen Farben erzeugen können und bereits zum Markieren von Proteinen in Zellen eingesetzt wurden [35].

Außer dem Risiko falschpositiver Signale aufgrund von unspezifischen Adsorptionsprozessen besteht bei der direkten Markierung der Analytmoleküle prinzipiell die Gefahr, dass die Affinität zwischen Analyt- und Fängermolekülen gestört wird. Als Alternative zur direkten Probenmarkierung können Analytmoleküle, die an eine Affinitätsoberfläche angebundenen haben, in so genannten Sandwich-Assays auch indirekt nachgewiesen werden. Dafür ist ein zweiter Inkubationsschritt mit markierten Detektionsmolekülen notwendig, die wie die Fängermoleküle spezifische Affinitäten zu den Analyten besitzen, aber ein anderes Epitop

erkennen. Die Detektionsmoleküle sind entweder wie bei der direkten Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert [36] oder z. B. mit kolloidalen Goldpartikeln, die durch resonante Lichtstreuung nachgewiesen werden [37]. Um eine Signalverstärkung zu erreichen, werden auch Enzyme als Marker eingesetzt. Sie setzen bei der Detektion ein Substrat um, das sich über die Zeit anhäuft. Zwei Beispiele sind das *Rolling Circle Amplification*-System (RCA) [38] und das *Tyramide Signal Amplification*-System (TSA) [39]. Das RCA basiert auf der enzymatischen Verlängerung eines DNA Primers, der mit dem Detektionsmolekül verbunden ist und dem anschließenden Nachweis des entstandenen DNA- Stranges durch Hybridisierung mit fluoreszierender DNA. Mit RCA wurde im Vergleich zu direkter Signaldetektion eine 30- bis 1000-fache Signalverstärkung beobachtet [40].

Für die markierungsfreie Auslese von Bindeereignissen auf Oberflächen werden beispielsweise Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie und Wellenleiter-Spektroskopie [41] genutzt. Beide Methoden basieren auf der Ausbildung eines evaneszenten elektromagnetischen Feldes an der Sensoroberfläche, welches empfindlich auf Veränderung des komplexen Brechungsindexes an dieser Oberfläche reagiert. Die Anbindung von Molekülen an Fängermoleküle auf der Oberfläche bewirkt eine Veränderung des Brechungsindex in Oberflächennähe. Wie bei Tests mit direkt markierten Proben hängt die Spezifität der markierungsfreien Nachweise von der Affinität der Bindereaktion und der Unterbindung unspezifischer Adsorption ab.

Eine weitere markierungsfreie Detektionstechnik ist die Massenspektrometrie, mit der die Massen von nicht-kovalent an Oberflächen gebundenen Molekülen bestimmt werden können.

Der Vorteil von massenspektrometrischer Analytik besteht darin, dass die Masse Auskunft über posttranslationale Modifikationen an Proteinen gibt, die wie beispielsweise der Phosphorylierungsgrad den Aktivitätsstatus eines Proteins bestimmen können. Im Idealfall können unbekannte Analytmoleküle direkt anhand ihrer Masse identifiziert werden. Eine ratiometrische Quantifizierungstechnik für die Massenspektrometrie besteht in der Modifizierung von Proben mit verschiedenen Markern, die schwere und leichte Isotopen enthalten [42]. Weder die spektroskopischen Methoden noch die Massenspektrometrie erreichen jedoch bisher standardmäßig die typische Ortsauflösung von Microarrays in der Größenordnung von einigen hundert Mikrometern [43, 44]. Die *Surface-Enhanced Laser-Desorption-Ionisation*-Technologie (SELDI) ist eine Adaptation der Massenspektrometrie für die Erstellung von differentiellen Protein-Profilen im Format eines Macroarray. Die ProteinChips® der Firma Ciphergen mit Spotdurchmessern von einigen Millimetern bieten unterschiedliche chromatographische Oberflächen zur Abtrennung einzelner Proteinfraktionen aus komplexen Proben. Im Vergleich von Massenspektren der gleichen Proteinfraktionen aus verschiedenen Proben können differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden [45].

Anwendungen

Pioniere der Microarray-Entwicklung sind Mendoza *et al.*, die einen Multiplex-Assay aus 144 Einzelspots in den Wells von Mikrotiterplatten entwickelt haben [46]. MacBeath und Schreiber demonstrierten zum ersten Mal Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die Identifizierung von Enzymsubstraten durch Kinase-vermittelte Phosphorylierung von immobilisierten Proteinen im Microarray-Format [47]. Zhu *et al.* bildeten als Erste das komplette Proteom eines Organismus auf einen Protein-Microarray ab: Sie exprimierten 5800 *ORFs (Open Reading Frames)* aus dem Genom von *Saccharomyces cerevisiae* und druckten sie in Form eines Microarrays auf Glas-Objektträger. Sie untersuchten unter anderem die Wechselwirkung der immobilisierten Proteine mit Calmodulin. Neben sechs von zwölf bekannten Calmodulin-bindenden Proteinen detektierten sie 33 neue, potentielle Calmodulin-Binder und identifizierten aufgrund dieser Daten ein spezifisches Bindemotiv [20]. Haab *et al.* erstellten anhand von 115 Antigen-Antikörper-Paaren die ersten systematischen differentiellen Protein-Profile. Sie markierten Protein-Standards mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen und inkubierten diese in unterschiedlichen Verhältnissen mit Microarray-Oberflächen. Die Auswertung der Signalverhältnisse ergab für 20 % der immobilisierten Antigene und 50 % der immobilisierten Antikörper spezifische und akurate Messergebnisse bei der Detektion der relativen Mengen ihrer Wechselwirkungspartner in den Proben [31]. Mehrere Studien zur Bewertung der Microarray-Technik ergaben eine gute Übereinstimmung von ELISAs und quantitativen Microarray-Untersuchungen mit Fluoreszenzdetektion [48].

Silzel *et al.* haben ein Testdesign vorgestellt, das eine Alternative zum störungsfreien Messen von Analytkonzentrationen im Sinne der *Ambient-Analyte* Tests darstellt und als *Mass-Sensing* bezeichnet wird. Die Methode zielt darauf ab, einen möglichst großen Anteil der in der Probe vorhandenen Analytmoleküle auf der Affinitäts-Oberfläche zu binden um eine hohe Signal-intensität zu erreichen [49]. Die dafür verwendeten Microarrays bestehen aus Spots mit möglichst großer Fängerdichte und hoher Analyt-Bindekapazität.

In einem Ansatz zur Parallelisierung von MALDI-MS Untersuchungen an Proteingemischen druckten Scrivener *et al.* Antikörper auf Acrylamid-Hydrogel-Pads und isolierten damit aus enzymatisch verdauten Protein-Mischungen Peptide, die sie mit MALDI-Massenspektrometrie nachweisen konnten [44]. Die kurzen Proteinfragmente hatten homogenere physikochemische Eigenschaften als intakte Proteine und ermöglichten daher auch für komplexe Proben-Gemische ein einheitliches Test-Design.

Neuere Arbeiten bringen Erkenntnisse über molekulare Mechanismen bei Autoimmun-Krankheiten [48, 50], in der Krebsforschung und bei der Aufklärung von Signalwegen. Die Charakterisierung von Plasma und Serum von Krebspatienten mittels Protein-Microarrays führte

zur Identifizierung bekannter und neuer Markerproteine [45, 51]. Paweletz *et al.* entwickelten organ- bzw. krankheitsspezifische Microarrays in *Reversed-Phase*-Technik: Sie immobilisierten jeweils das komplette Set an Proteinen aus Patienten-Gewebeproben und erfassten den Phosphorylierungsstatus wichtiger Signal-Proteine in verschiedenen Krankheitsstadien [52].

Die Vielzahl von Entwicklungen und technischen Ansätzen auf dem Gebiet der Protein-Microarrays spiegelt das breite Anwendungsspektrum der Technik. Sie ist aber auch Ausdruck der Schwierigkeiten bei der Etablierung der Methode.

Obwohl die Chip-Technik zur Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen auf Proteinebene oberflächlich der DNA-Chip-Technologie gleicht, ist die Entwicklung von Protein-Microarrays aufgrund der Heterogenität und Instabilität von Proteinen immer wieder eine neue komplexe technische Herausforderung.

Bei der Untersuchung von Proteinen in biologischen Proben besteht außerdem die Schwierigkeit extrem kleine Analyt-Mengen nachweisbar zu machen, da - anders als für Nukleinsäuren mit der Polymerase-Kettenreaktion PCR - keine Methode für die direkte Vervielfältigung von Proteinen existiert. Die Mengen, in denen Proteine in Zellen vorkommen sind außerdem sehr unterschiedlich. Die Schwankungsbreite der Konzentrationen wird auf sieben bis elf Größenordnungen geschätzt [53, 54], wobei 90 % der Proteine zusammen nur 10 % der Gesamt-Proteinmasse ausmachen. Mit einfachen Modellsystemen aus einigen wenigen Antikörpern und wenigen Test-Analyten wurden bisher Nachweisgrenzen im picomolaren bis mittleren femtomolaren Bereich erreicht [11, 55]. In komplexen Proben wie Serum lag dieser Wert um mindestens drei Größenordnungen höher im nano- bis picomolaren Bereich, wenn direkt markierte Proben untersucht wurden [56]. Für die Proteomforschung sind deshalb Untersuchungsmethoden erforderlich, die sehr geringe Nachweisgrenzen und einen breiten dynamischen Bereich besitzen.

Nanopartikel in der Biotechnologie

Die Nanotechnologie ist die neue Dimension, in der sich Materialwissenschaften, klassische Naturwissenschaften und Lebenswissenschaften gegenseitig inspirieren und Synergien schaffen. Nanopartikelsuspensionen sind ein vielseitiges Material mit sehr großer spezifischer Oberfläche. Forschung und Entwicklungen in neuerer Zeit haben funktionelle Nanopartikel hervorgebracht, für die bereits ein hohes Anwendungspotenzial in der Biotechnologie und in der Medizin besteht.

Organische Nanopartikel dienten beispielsweise als Trägermaterial für die gezielte Applikation von Medikamenten [57, 58] und wurden für analytische oder diagnostische Tests [59] eingesetzt. Nanoskopische Halbleiter-*Quantum Dots* und Metall-Kolloide haben spezielle optische Eigenschaften und wurden als fluoreszierende Markierungen zum hochempfindlichen Nachweis

von Biomolekülen verwendet und zur Signalverstärkung in spektroskopischen Methoden wie *SES (Surface-Enhanced Spectroscopy*) und Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie eingesetzt [60, 61]. In einigen Arbeiten wurden Ansätze vorgestellt, die diese Methoden auch für Anwendungen im Microarray-Format verfügbar machen [62, 63].

Im kommerziell erhältlichen xMAP®-Assay der Firma LUMINEX werden Mikrometer-Partikel mit farbcodiertem Kern und unterschiedlich biofunktionalisierter Oberfläche eingesetzt, um bis zu 100 verschiedene biologische Wechselwirkungen in einer Probe nachzuweisen. Der Assay wird direkt in Suspension durchgeführt wodurch Massentransportprobleme minimiert werden. Da in einem Test mehrere 100 Partikel jeder Funktionalisierung ausgelesen werden, erhält man außerdem statistisch sehr gut abgesicherte Ergebnisse. Um diesen Vorteil des partikelbasierten Assays mit den Vorzügen eines Microarrays zu kombinieren und auf kleinster Fläche mit wenig Material eine Vielzahl von Tests zu ermöglichen, entwickelten Stevens *et al.* [64, 65] einen Array aus funktionalisierten Partikeln, die sie in Microspots auf einem planaren Substrat immobilisierten und nach Inkubation mit Analytlösung einzeln auswerteten.

In anderen Arbeiten wurden Nanopartikel in Kombination mit biologischen Strukturen auf Oberflächen immobilisiert: Rekristallisierte S-Layer aus Bakterien-Zellwänden bildeten beispielsweise Protein-Gitter auf Feststoffoberflächen oder in Suspension und dienten als Matrizes für die räumliche Anordnung von Nanopartikeln [66]. In einer weiteren Arbeit wurden Partikel mit Hilfe von partikelgebundenen Oligonukleotidsequenzen gezielt an ein Substrat gekoppelt, welches mit den komplementären Basen-Sequenzen funktionalisiert worden war [67].

Organische und anorganische Partikel wurden auch genutzt, um die Möglichkeit der indirekten Strukturierung auf physikalisch-chemisch differenzierten Substratoberflächen zu demonstrieren [68-71]. In diesen Arbeiten wurden mikrostrukturierte Schichten aus Nanopartikeln erzeugt, indem die Partikel ortsselektiv an vorstrukturierten Oberflächen abgeschieden wurden. Als Haftvermittler dienten Polyelektrolytschichten [70, 71] oder *Self-Assembled Monolayers* (*SAMs*) [68, 70], an denen die Partikel aufgrund von verschiedenen physikalischen Wechselwirkungen selektiv hafteten. Die strukturierte Substrat-Funktionalisierung erfolgte mittels Softlithographie (*µ-contact printing*) [70], Photoablation oder mit Hilfe von photolithographischer Maskentechnik [68, 71].

Die Adsorption von Nanopartikeln an planare Substrat-Oberflächen ist von speziellem Interesse für die Microarray-Technologie, denn durch die Partikel wird eine zusätzliche Oberfläche als Kontaktfläche für die biologische Probe in das System eingeführt. Im Hinblick auf den Aufbau eines flexiblen Microarrays mit großen Bindekapazitäten besteht somit eine vielseitige Innovation in der Kombination von Mikrostrukturierungstechniken mit *biofunktionellen* Nanopartikeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Herstellung von modular aufgebauten Microarrays aus mikrostrukturierten Nanopartikelschichten vorgestellt. Die Verwendung von Nanopartikel-Oberflächen zur Immobilisierung von Fängerelementen, beispielsweise Proteinrezeptoren, und die Verarbeitung von funktionalisierten Partikelsuspensionen zu dreidimensionalen Affinitäts-oberflächen erlaubt die Separation von Oberflächenfunktionalisierung und Mikrostrukturierung in zwei getrennte Prozess-Schritte. Die Funktionalisierung der Nanopartikel-Oberflächen kann zunächst unter optimalen Konditionen in Suspension stattfinden. Dabei können die Partikel-Oberflächen den individuellen Anforderungen zur Anbindung verschiedener biologischer Molekülen flexibel angepasst werden. Unterschiedlich funktionalisierte Partikel können anschließend im Microarray-Format auf einem Trägermaterial immobilisiert werden. Durch das Abscheiden von dreidimensionalen Schichten werden nanoskopische Strukturen erzeugt, die eine vergrößerte funktionelle Oberfläche darstellen.

3.1 Aufgabenstellung

Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Entwicklung von mikrostrukturierten Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln und die Erprobung des Potenzials derartiger Schichten als dreidimensionale Rezeptoroberfläche für Proteinnachweise im Microarray-Format.

Im Rahmen dieser Zielsetzung sollten Proteine mittels unterschiedlicher Kopplungsmechanismen derart auf Nanopartikel-Oberflächen immobilisiert werden, dass ihre spezifische Affinität erhalten bleibt. Der Erhalt der Proteinfunktion sollte auch nach dem Abscheiden der Partikel auf einer Substrat-Oberfläche gewährleistet werden. Für die Kopplung von Proteinen an Partikel-Oberflächen sollten Kern-Schale Partikel eingesetzt werden, deren anorganische Silica-Kerne mit einer nanoskopisch dünnen organischen Schale umgeben sind, welche Amino- oder Carboxylfunktionen bereitstellt, um damit Proteine kovalent zu immobilisieren. Die biofunktionalisierten Nanopartikel-Schichten sollten im Gebrauch als Rezeptoroberflächen für Proteinnachweisreaktionen getestet werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die neuartigen dreidimensionalen Microarray-Oberflächen kompatibel sind mit der Standard-Fluoreszenzdetektion und ob sie geeignet für die Analyse mittels moderner MALDI-Massenspektrometrie sind.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Verwendete Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
3-Aminopropyltriethoxysilan, CAS 919-30-2	ABCR, Karlsruhe
Alexa Fluor®546-carboxylic acid, succinimidyl ester, CAS 393512-12-4	Molecular Probes, USA
Alexa Fluor®647-carboxylic acid, succinimidyl ester, CAS unveröffentlicht	Molecular Probes, USA
Bernsteinsäureanhydrid, CAS 108-30-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin-4- Fluorescein, CAS unveröffentlicht	Molecular Probes, USA
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N´-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC), CAS 25952-53-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (HPLC), CAS 64-17-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EZ-Link™ NHS-PEO_4-Biotin, CAS 459426-22-3	Pierce Biotechnology, USA
H_2O_2-Lösung (30 %), CAS 7722-84-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hellmanex, alkalischer Glasreiniger	Hellma, Müllheim
NH_3-Lösung (25 %), CAS 7664-41-7	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyacrylsäure (PAA), 35 % (M/M) in Wasser, typisches MW 70 000 Da, CAS 9003-01-4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyallylamin Hydrochlorid (PAH), typisches MW 70 000 Da, CAS 30551-89-4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sinapinsäure (99 %), CAS 530-59-6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetraethoxysilan (TEOS), CAS 78-10-4	ABCR, Karlsruhe
Tetrahydrofuran (THF), CAS 109-99-9	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium Chlorid (NaCl), CAS 7647-14-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), CAS 144-55-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalium Chlorid (KCl), CAS 7447-40-7	Honeywell Riedel de Haen, New Jersey, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), CAS 10049-21-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), CAS 10039-32-4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X 100, CAS 9002-93-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril, HPLC grade,	J. T. Baker,
Trifluoressigsäure (TFA), purum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Verwendete Proteine	Hersteller/Bezugsquelle
Anti-Maus IgG aus Kaninchen, FITC-Konjugat (IgG Fraktion)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyklonale Cy3 Anti-Kaninchen-IgG aus Esel, affinitätsgereinigt. Minimale Kreuzreaktion mit Rind-, Huhn-, Ziege-, Meerschweinchen-, Hamster-, Pferd-, Mensch-, Maus-, Ratte- und Schaf-Serum-Proteinen.	Dianova, Hamburg
Polyklonale Cy5 Anti-Ziege-IgG aus Maus, affinitätsgereinigt. Minimale Kreuzreaktion mit Mensch-, Maus- und Kaninchen-Serum-Proteinen.	Dianova, Hamburg
Cytochrom C (*horse heart*), CAS 9007-43-6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GammaBind™ G Type 2- Protein G (Molekulargewicht 22 600 g mol^{-1})	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Insulin (*bovine pancreas*), CAS 11070-73-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin, Biotin labelled (*bovine pancreas*)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kälberserum (Newborn)	Biochrom AG, Berlin
Maltose-bindendes Protein MBP2* (theoretisches Molekulargewicht 42 482 g mol^{-1})	New England Biolabs, Ipswich, USA
Neurotensin ~ 95 % (Molekulargewicht 1672,92 g mol^{-1}) CAS 58889-67-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Polyklonale Anti-Tsa1p Antikörper aus Kaninchen	Abteilung „Molekulare Biotechnologie“, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
Streptavidin, Molekulargewicht ~ 52 000 g mol^{-1} (Tetramer)	Uptima, Montlucon, Frankreich
Thiol-Specific Antioxidant-Like Protein , konjugiert mit Maltose-bindendem Protein (Tsa1p-MBP)	Abteilung „Molekulare Biotechnologie“, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Bezugsquelle
Siliziumträger, poliert, 5 mm x 5 mm x 0,5 mm	Plano GmbH, Wetzlar
Erie Scientific Company-Glasobjektträger	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperFrost® Plus Glasobjekträger mit positiv geladene Oberfläche	Menzel, Braunschweig
MaxiSorp™ C 96 *Well*-Mikrotiterplatten für das Drucken von Microarrays	Nunc, Wiesbaden
Millex® HA Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Millipore, Bedford, MA USA
FluoroNunc™, 96 Well-Mikrotiterplatten für Fluoreszenz-messungen	Nunc, Wiesbaden
Sjostrand TEM Gitterchen	Plano GmbH, Wetzlar
Microcon YM 50 Ultrafiltrationskartuschen (MWCO 50 000)	Millipore, Bedford, MA USA
Spectra/Por® Membrane Dialyseschlauch (MWCO 8 000)	Spectrum Laboratories, INC., Rancho Domingues, USA
Norm-Ject 10 mL Spritzen	Henke-Sass-Wolf, Tuttlingen

Geräte	Hersteller
Heraeus Biofuge® fresco	Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, USA

ArrayWoRx^{e} Biochip Reader Fluoreszenzscanner	Applied Precision, Issaquah, USA
Autoprobe CP Rasterkraftmokroskop (AFM)	TM Microscopes (früher: Park Scientific Instruments), Sunnyvale, CA, USA
Axis Ultra Elektronenspektroskop zur chemischen Analyse (ESCA)	Kratos Analytical, Manchester, UK
GEMINI 1530VP Rasterelektronenmikroskop	Zeiss (früher: LEO), Oberkochen
GMS 417Nadel-Ring-Drucker	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Pen-Ray® Quecksilberdampflampe Modell 90-0012-01 (11SC-1)	UVP Inc., Upland, CA, USA
Modifiziertes HP 2025A MALDI-Massenspektrometer mit TLF-Einheit	GSG-Analytics, Bruchsal
Multiskop Ellipsometer	Optrel, Berlin
Olympus Bx-60 Lichtmikroskop, ausgestattet mit CCD Kamera	Olympus Optical Co. Europe, Hamburg
SPECTRA Fluor Plus Fluoreszenzspektrometer	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim
Zetasizer® 4000 HSA	Malvern Instruments, Worcestershire, UK

4.2 Kern-Schale Nanopartike

Für die Herstellung von Biochip-Oberflächen aus funktionellen Nanopartikelschichten wurden in dieser Arbeit Kern-Schale Nanopartikel verwendet. Nanopartikel-Kerne aus anorganischem Siliziumoxid (SiO_x, Silica) wurden mit funktionellen Organosilanen umgesetzt, die eine organische Schale um den Partikelkern ausbildeten und die Partikeloberfläche so für die kovalente Anbindung von Biomolekülen aktivierten. Synthese und Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln sowie die kovalente Anbindung von Streptavidin an die funktionalisierten Partikel-Oberfläche erfolgte gemäß einer Vorschrift des Instituts für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT) der Universität Stuttgart [72].

4.2.1 Synthese anorganischer Silica-Kerne nach dem Stöber-Verfahren

Die Synthese anorganischer Silica-Nanopartikel-Kerne erfolgte nach dem Stöber Verfahren [73]. Mit diesem Verfahren wurden über eine Sol-Gel-Reaktion monodisperse Suspensionen sphärischer Silica-Partikel hergestellt. Die Reaktionsparameter wurden so gewählt, dass sich Nanopartikel mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 117 ± 16 nm (N = 22, N Anzahl vermessener Partikelansätze) und einer Polydispersität von 0,23 bis 0,075 (N=8) ausbildeten. Es wurden 400 mL Ethanol (HPLC grade), 5 mg TEOS, 20 mL Wasser und 10,3 mL NH_3 –Lösung (25 %) gemischt und die Reaktanten wurde bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Die fertigen Nanopartikel wurden mittels Zentrifugation aus der Suspension abgetrennt (20 442 x g, 15 min), im Ultraschallbad in 100 mL Wasser resuspendiert und 6- bis 8-mal für 12 h gegen 5 L Wasser dialysiert. Anschließend wurde die Partikelsuspension durch ein 0,45 µm Filter filtriert.

4.2.2 Funktionalisierung der Partikel-Oberfläche mit organischer Schale

Die Protokolle zur Funktionalisierung der Oberflächen von Silica-Nanopartikeln mit primären Aminogruppen und mit Carboxylgruppen sind ausführlich in [72] beschrieben.

Amino-Partikel: Zur Funktionalisierung der Partikel-Oberfläche mit primären Aminogruppen wurde der anorganische SiO_x-Kern mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) umgesetzt. Dafür wurden zu 1000 mg Silica-Nanopartikel in Wasser mit 8 mL NH_3 –Lösung (25 %) und 200 mg APS umgesetzt. Je nach Feststoffgehalt der verwendeten Silica-Partikel Suspension war das Gesamtreaktionsvolumen leicht unterschiedlich. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur genau 1 h gerührt. Anschließend wurden die Partikel zweimal in 80 mL Acetatpuffer mit pH 4,7 (Ac47) gewaschen, in 35 mL Ac47 aufgenommen und durch ein 0,45 µm Filter filtriert. Suspensionen aminofunktionalisierter Partikel konnten in Ac47 bei 4°C bis zu sechs Monaten gelagert werden.

Carboxy-Partikel: Durch Reaktion mit zyklischem Bernsteinsäureanhydrid wurden die Aminofunktionen auf der Partikel-Oberfläche in Carboxylgruppen überführt.

200 mg NH_2-Partikel wurden abzentrifugiert, einmal in PP70 gewaschen und 5 min im Ultraschallbad in 10 mL THF resuspendiert. Es wurden 353,3 mg Bernsteinsäureanhydrid zugegeben und die Mischung auf Eis innerhalb einer Stunde viermal für 5 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde der Ansatz 20 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Unreagiertes Bernsteinsäureanhydrid wurde anschließend durch Zugabe von Wasser hydrolysiert. Die carboxylfunktionalisierten Partikel wurden abzentrifugiert, in 35 mL Wasser aufgenommen und gegen Wasser dialysiert, bis die Leitfähigkeit des Dialysewassers unter 1,3 µS gesunken war. Anschließend wurden die Partikel durch ein 0,45 µM Filter filtriert. Die Partikel konnten bei 4°C bis zu sechs Monaten gelagert werden.

4.2.3 Partikel-Charakterisierung

Feststoffgehalt der Suspensionen

Der Feststoffgehalt von Suspensionen unmodifizierter Silica-Nanopartikel wurde nach der Synthese gravimetrisch bestimmt. Kleine Glasgefäße wurden bei 120° C getrocknet und anschließend abgedeckt mit der Umgebung äquilibriert. In drei Gefäße wurden jeweils 300 µL Nanopartikelsuspension einpipettiert und das Glas wurde mit Inhalt gewogen (m_1/mg). Die Partikelsuspension wurde anschließend bei 120° C eingetrocknet. Während des Abkühlprozesses fand wiederum ein Ausgleich des Wassergehalts mit der Umgebung statt. Nach dem Abkühlen wurden die Gläser abermals gewogen (m_2/mg) und der Feststoffgehalt wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$FS = \frac{m_2 - m_1}{300} \cdot 1000 \text{ mg mL}^{-1} \qquad \textbf{Gleichung 4-1}$$

Alle anschließenden Funktionalisierungsschritte wurden mit Partikelmengen durchgeführt, die über den ermittelten Feststoffgehalt bestimmt wurden.

Bei der Herstellung der hochkonzentrierten Partikelsuspensionen zum Drucken von Microarrays wurde die benötigte Menge Partikel jeweils in dem Volumen suspendiert, das rechnerisch dem nominellen Endvolumen der Suspension entsprach. Die Konzentrationsangaben verstehen sich also als Partikelmasse pro Volumen Suspensionsmedium. Das reale Volumen der fertigen

Suspension war jeweils um das Eigenvolumen der Partikel größer. Beispiele: Zur Herstellung von Suspension mit dem nominellen Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} wurde ein Milligramm Partikel in 50 µl Medium suspendiert, zur Herstellung von Suspension mit einem nominellen Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1}, wurde ein Milligramm Partikel in 12,5 µL Medium suspendiert.

Hydrodynamischer Durchmesser

Als Maß für die Partikelgröße ist der hydrodynamische Durchmesser der Partikel angegeben. Der hydrodynamische Durchmesser ist ein Äquivalentdurchmesser, der einem Partikel aufgrund seiner Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser zugeordnet wird. Der hydrodynamische Durchmesser bezieht sich auf die Diffusion einer festen Kugel und wird allen Partikeln mit der gleichen Diffusionsgeschwindigkeit zugeordnet. Je nach Oberflächenbeschaffenheit der Partikel kann die Beweglichkeit der Partikel beispielsweise durch die Ausbildung einer Hydrathülle, Anlagerung von Gegenionen oder durch Quellung eingeschränkt werden. Der hydrodynamische Durchmesser von oberflächenfunktionalisierten Partikeln ist deshalb meist größer als der tatsächliche Durchmesser der Partikel. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser (z-Average) der Partikel wurde mit einem Zetasizer® 4000 HSA (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) nach der Methode der Photonenkorrelationsspektroskopie [74, 75] bestimmt. Die Polydispersität wurde im Contin-Modus ausgewertet. Für die Messungen wurden Partikelsuspensionen in Wasser verwendet (100-400 kCps). Zur Charakterisierung jeder Probe erfolgten drei Hauptmessungen à zehn Teilmessungen.

Zetapotenzial

Oberflächenladungen an festen Phasen werden gemäß dem Stern-Modell in elektrolythaltigen Medien durch die Ausbildung einer fest adsorbierten Doppelschicht aus hydratisierten Gegenionen, der so genannten Helmholtz-Schicht kompensiert [76]. Innerhalb dieser Doppelschicht fällt das elektrochemische Potenzial auf einen Wert ab, der als Zetapotenzial ζ definiert wird. Angrenzend an die elektrische Doppelschicht fällt das elektrochemische Potenzial innerhalb einer diffusen Schicht aus hydratisierten Anionen und Kationen weiter ab. Diese diffuse Schicht kann bei relativer Bewegung der festen zur flüssigen Phase abgeschert werden. Unter der Annahme, dass bei der Bewegung von geladenen Partikeln im elektrischen Feld eine Abscherung der Ionenwolke an der Grenzfläche zwischen Helmholtz-Schicht und diffuser Schicht stattfindet, kann das Zetapotenzial von Partikeln durch Mikroelektrophorese bestimmt werden.

Die Oberfläche von amorphem SiO_x besteht hauptsächlich aus verhältnismäßig unreaktivem Siloxan – Si – O – Si –, das zu unterschiedlichem Grad durchsetzt ist mit Silanolen, ≡ Si – OH, = $Si(OH)_2$ oder – $Si(OH)_3$ [77]. Silanole entstehen, wenn durch die Adsorption von

Wassermolekülen Siloxanbrücken aufgebrochen werden. Die Adsorption eines Wassermoleküls resultiert in der Bildung zweier benachbarter ≡ Si – OH Gruppen. Aufbrechen zweier Bindungen an einem Siliziumatom führt zur Bildung von zwei ≡ Si – OH und einer = $Si(OH)_2$ Gruppe etc.. Silanole können Protonen sowohl abgeben als auch aufnehmen. Die Azidität der Hydroxylgruppen der Silanole ist zum einen abhängig von der Azidität des Protons in den Silanolen, welche wiederum abhängt von der Anzahl der Siloxan-Bindungen des zugehörigen Silizium-Atoms. Zum anderen haben die Silanol-Dichte auf der Oberfläche und Verunreinigungen des Materials Einfluss auf den Protonierungszustand der Silanole. Eine ausgeglichene Nettoladung auf der Oberfläche, das heißt gleiche Oberflächendichten von positiv geladenen $SiOH_2^+$- und negativ geladenen SiO^--Gruppen, wird je nach Materialbeschaffenheit und Messbedingungen ungefähr bei pH 3 erreicht. Chemisch oxdierte Oberflächen von Silizium und unmodifizierte Silica-Oberflächen sind daher bei pH-Werten oberhalb pH 3 negativ geladen [72, 77].

Die Funktionalisierung der Partikel-Oberfläche mit primären Aminen resultierte für pH-Werte oberhalb pH 7 in einem positiven Zetapotenzial auf der Partikel-Oberfläche. Bei pH 7 war das Zetapotenzial leicht negativ. Das Zetapotenzial von carboxylfunktionalisierten Partikel war bei pH 7 und bei pH 4,7 negativ [72]. Die Messung des Zetapotenzials der Partikel-Oberflächen wurde zur Qualitätskontrolle bei der Partikel-Synthese herangezogen. Zur Bestimmung des Zetapotenzials wurde die Mikroelektrophorese-Einheit des Zetasizer® 4000 HSA (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) eingesetzt. Die Messungen wurden bei 1000-4000 kCps durchgeführt.

4.2.4 Kovalente Proteinanbindung mittels Carbodiimid-Chemie

Proteine können kovalent an Oberflächen angebunden werden oder nicht-kovalent aufgrund von spezifischen oder unspezifischen Affinitäten auf Oberflächen immobilisiert werden. Die Anbindung kann in zufälliger Orientierung erfolgen oder in definierter Ausrichtung. Eine Möglichkeit, Proteine an Partikel zu koppeln, ist die Ausbildung von Amidbindungen zwischen Aminogruppen des Proteins und Carboxylgruppen auf der Partikel-Oberfläche. Die Ausbildung von Amidbindungen läuft nicht spontan ab. Es bedarf dafür einer Aktivierung der Carboxylgruppen. Zur Aktivierung wurde das wasserlösliche Carbodiimid N-(3-Dimethylaminopropyl) -N´-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) verwendet. Carbodiimide bilden mit Carboxylgruppen eine Aktivester-Zwischenstufe aus, die mit nukleophilen Aminen zu Amidbindungen reagiert. Dabei entstehen N,N´-Dialkyl-Harnstoffe als Nebenprodukte, die im Fall von wasserlöslichen Carbodiimiden ebenfalls wasserlöslich sind [78, 79]. Für die Reaktion werden Puffer-Lösungen im Bereich pH 4,7 bis pH 7,5 empfohlen, wobei im Puffer keine Amine oder Carboxylate enthalten sein dürfen. Die EDC-vermittelte Anbindung von Streptavidin auf carboxylmodifizierten Silica-

Nanopartikeln erfolgte wie in [72] beschrieben. Auf der Grundlage dieser Vorschrift wurden Protokolle für die kovalente, ungerichtete Anbindung von Protein G und IgG Antikörpern ausgearbeitet.

Streptavidin-Anbindung

Streptavidin ist ein aus vier Untereinheiten aufgebautes Molekül (~52 000 g mol^{-1}), das ursprünglich aus *Streptomyces avidinii* isoliert wurde. Jede der vier Untereinheiten bindet ein Biotin-Molekül mit einer Affinität $K_a \approx 10^{15}$ M^{-1}. Aufgrund der hohen Stabilität der Streptavidin-Biotin-Verbindung wird diese Kombination sehr häufig als Kopplungssystem zwischen Proteinen eingesetzt. Biotin ist ein kleines Molekül (244,31 g mol^{-1}) und kann als N-Hydroxysuccinimidyl-Ester statistisch verteilt an freiliegende Aminogruppen von Proteinen konjugiert werden. Dies gelingt häufig, ohne dass die Proteinfunktion beeinträchtigt wird. Streptavidin ist die bakterielle Entsprechung zu Avidin, das im Eiklar von Vogeleiern vorkommt. Es wird jedoch im Gegensatz zu diesem nicht glykosyliert, hat einen isoelektrischen Punkt (pI) bei pH 6 [80] und ist daher weniger anfällig für unspezifische Proteinadsorption.

Ansatz für 25 mg Partikel [72]:

In einem Gesamtvolumen von 50 mL MES 50 wurden 25 mg carboxylmodifizierte Partikel mit 24 µmol EDC (191,7 g mol^{-1}) und 13,4 nmol Streptavidin 3h bei Raumtemperatur geschüttelt und einige Male mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (16 060 x g, 10 min). Der Überstand wurde für die Bestimmung der Bindekapazität der Partikel aufbewahrt. Das Partikel-Pellet wurde im Ultraschallbad in 25 mL PP70 resuspendiert, aliquotiert und bei –18° C gelagert.

Die Bindekapazität jedes Ansatzes wurde nach der von Kada *et al.* [81] entwickelten Methode mit Biotin-4-Fluorescein bestimmt [72]. Ein Milligramm Streptavidin-Nanopartikel besaß eine mittlere Biotin-Bindekapazität von 524 ± 116 pmol Biotin-4-Fluorescein (N=16, N Anzahl der vermessenen Ansätze).

4.3 Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Biotinyliertes Cytochrom C wurde als Modellanalyt für die Versuche mit Streptavidin-modifizierten Nanopartikeln verwendet. Zur Biotinylierung wurde das EZ-Link™ NHS-PEO_4-Biotin von Pierce verwendet. Zwei Milligramm Cytochrom C wurden im molaren Verhältnis 1:10 mit dem Biotinylierungsreagenz in PP70 umgesetzt. Weil das Protein anschließend noch mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert werden sollte, der wie das Biotinylierungsreagenz an die

Aminogruppen des Proteins bindet, wurde die Reaktionszeit auf 30 Minuten beschränkt. Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben, dass nach dieser Inkubationszeit der größte Teil der Moleküle mit drei bis vier Biotinmolekülen konjugiert waren und nur noch sehr wenig unbiotinyliertes Protein vorlag. Insgesamt konnten bis zu sieben aminreaktive Gruppen pro Cytochrom C-Molekül gebunden werden, so dass durch die Beschränkung der Reaktionszeit bei der Biotinkonjugation drei bis vier potentielle Bindestellen für die Farbstoffanbindung frei blieben. Biotinylierungsreagenz, das nicht an das Protein gebunden hatte, wurde durch viermalige Ultrafiltration abgetrennt. Das biotinylierte Protein wurde in Carbonatpuffer (0,1 M, pH 8,3) aufgenommen und bis zur Umsetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff eine Stunde auf Eis aufbewahrt.

Das biotinylierte Cytochrom C wurde mit Alexa Fluor®647-Succinimidylester umgesetzt. Ein Milligramm des Farbstoffs wurde den Herstelleranweisungen entsprechend in 100 µL DMSO gelöst und zu 2 mL der Proteinlösung (1 mg mL^{-1}) hinzu gegeben. Das Massenverhältnis von Fluoreszenzfarbstoff zu Protein wurde mit 1:2 sehr hoch gewählt um möglichst viele der bis dahin unbesetzten Aminogruppen mit einem Farbstoffmolekül zur Reaktion zu bringen. Nach 1 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und 5 Tage gegen große Volumina PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration nach der Dialyse wurde spektrometrisch bestimmt. Die Absorption des Konjugats wurde bei 410 nm und bei 280 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient des verwendeten Cytochrom C wurden aus Konzentrationsreihen ermittelt (ε_{410} = 9,8 mg $mL^{-1}cm^{-1}$, ε_{280} = 2,4 mg $mL^{-1}cm^{-1}$). Die Absorption bei 280 nm wurde nach Herstelleranweisung um den Beitrag des Farbstoffs korrigiert. Die ermittelte Konzentration des markierten Proteins nach Dialyse betrug 0,36 $\pm$ 0,02 mg mL^{-1} bezogen auf das Molekulargewicht von Cytochrom C. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt.

Das Konjugat Tsa1p-MBP aus dem *Candida albicans*-Protein *Thiol-Specific Antioxidant-like Protein* (Tsa1p) und dem Maltose-bindenen Protein (MBP) sowie polyklonale Anti-Tsa1p Antikörper wurden ebenfalls mit Alexa Fluor®647-Succinimidylester umgesetzt. Die Reaktion fand in Carbonatpuffer (0,1 M, pH 8,3) mit 0,2 M NaCl statt. Zur Stabilisierung des Tsa1p-MBP wurde zusätzlich Maltose mit einer Endkonzentration von 0,01 M zugegeben. Tsa1p-MBP wurde mit einer Endkonzentration von 3 mg mL^{-1} eingesetzt, Anti-Tsa1p mit einer Endkonzentration von 0,7 mg mL^{-1}. Der Farbstoff wurde in einem Massenverhältnis von 1:10 zugegeben. Nach einer Stunde Reaktion wurden die Reaktionslösungen in Dialyseschläuche überführt und 5 Tage gegen große Volumina PBS (Tsa1p gegen PBS mit 0,01 M Maltose) dialysiert. Die Konzentrationen der Proteine nach Dialyse waren 1,9 mg mL^{-1} Tsa1p und 0,36 mg mL^{-1} Anti-Tsa1p. Die Lösungen wurden aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt.

4.4 Biochip-Herstellung und Charakterisierung

Als Substrate für das Aufbringen von nanopartikulären Affinitätsschichten wurden Glasobjektträger oder 5 mm x 5 mm große Stücke aus einseitig polierten Siliziumwafern verwendet. Aufgrund der Ähnlichkeit der chemischen Zusammensetzung von Quarz-Glas und oxidiertem Silizium [82] wurden beide Substrate identisch behandelt und nach Bedarf eingesetzt: Für die Untersuchungen zur Oberflächencharakterisierung mittels Ellipsometrie oder Elektronen-Spektroskopie zur chemischen Analyse (ESCA) sowie für die Herstellung von MALDI-auslesbaren Affinitätsschichten wurden Siliziumwafer verwendet. Für die Herstellung von Affinitätsoberflächen für fluoreszenzbasierte Signalauslese wurden Glasobjektträger eingesetzt. Die Ergebnisse aus der Oberflächenanalyse an Siliziumoxid-Oberflächen wurden im Rahmen dieser Dissertation jeweils als für Glas gleichermaßen gültig angenommen.

4.4.1 Reinigung und Hydroxylierung der Substrat-Oberflächen

Glas-Objektträger oder Siliziumträger wurden zunächst 1 h bei 40°C in einer wässrigen Lösung des alkalischen Glasreinigers Hellmanex® (2 Volumen-%, pH 12) gereinigt. Danach wurden sie dreimal in Reinstwasser (18,3 MΩ cm^{-1}) aus der Barnstead eaSyPUR-Anlage (Wasser) gewaschen und dann 40 min in einem Reaktionsgemisch aus NH_3 (25 %) und H_2O_2 (30 %) (3:1 v/v, pH 12) behandelt, das im Wasserbad bei 70°C siedend gehalten wurde. Anschließend wurden die Träger wiederum in Wasser gewaschen und aus dem Wasser direkt in Polykationen-Lösung überführt. Alle nasschemischen Schritte wurden in Glas- oder Kunststoffbehältern ausgeführt. Die Glas-Slides wurden in Chargen von je acht Slides in Behältern zum Färben von Objektträger-Präparaten behandelt. Die Temperaturen wurden im Wasserbad eingestellt.

Die Hauptverunreinigung auf den Oberflächen, der Kohlenstoffanteil, konnte durch Behandlung mit dem alkalischen Glasreiniger Hellmanex® und NH_3 / H_2O_2-Lösung von 14,6 Atom-% auf 6,3 Atom-% reduziert werden [83]. Der Glasreiniger verringert die Oberflächenspannung und enthält Tenside und Emulgatoren, die die Ablösung von Schmutzpartikeln und hydrophoben Oberflächenverunreinigungen bewirken. Bei der Behandlung mit NH_3 / H_2O_2-Lösung laufen an der SiO_2-Oberfläche simultan zwei Reaktionen ab. Die wässrige NH_3-Lösung bewirkt an der Substrat-Elektrolyt-Grenzfläche den von OH^--Ionen katalysierten Abtrag von SiO_2 durch Hydrolyse. Dadurch werden Ablagerungen unterätzt und so von der Oberfläche entfernt. Das H_2O_2 oxidiert gleichzeitig an der Si-SiO_2 Grenzfläche Si zu SiO_2, so dass an der Substratoberfläche eine Oxidschicht erhalten bleibt. Man erhält SiO_2-Oberflächen mit oberflächenständigen Hydroxylgruppen. Diese Oberflächen sind stark hydrophil. Die Silanolgruppen sind potentielle Protonendonatoren, das heißt auf den hydroxylierten SiO_2-Oberflächen befinden sich

insbesondere bei hohem pH-Wert immer deprotonierte Silanol-Gruppen. Die gereinigten und hydroxylierten Silizium-Oberflächen sind deshalb negativ geladen [84].

4.4.2 Substratbeschichtung mittels Layer-by-Layer Technik

Die Beschichtung von Silizium- und Glasoberflächen mit Polyelektrolyt-Multischichten mittels der von Gero Decher und anderen entwickelten *Layer-by-Layer* (LbL) Tauch-Technik ist etabliert und in der Literatur ausführlich beschrieben [85, 86]. Polymere mit ionischen oder ionisierbaren funktionellen Gruppen werden nasschemisch abwechselnd auf Oberflächen aufgebracht und bilden dort amorphe Multischichten aus. Der Adsorptionsprozess ist entropisch stark begünstigt und praktisch irreversibel, weil durch die Anbindung der vielfach geladenen Makromoleküle kleine Ionen in die wässrige Phase freigesetzt werden. Bei der Adsorption einer Lage werden jeweils die auf der Oberfläche vorhandenen Ladungen überkompensiert, so dass eine entgegengesetzte Nettoladung der Oberfläche resultiert. Die Methode lässt sich auch auf die Adsorption von Proteinen oder Kolloiden anwenden sofern diese elektrische Ladungen aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyallylamin (PAH) und Polyacrylsäure (PAA) [87] als Haftvermittler für die stabile Adsorption biofunktionalisierter Silica-Nanopartikel auf Glas- oder Siliziumoxidoberflächen etabliert.

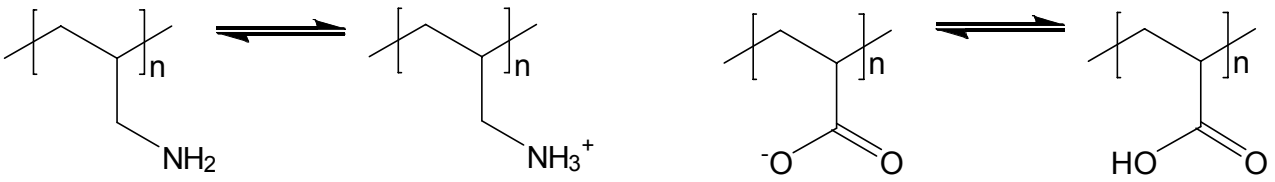

Abbildung 4-1

Monomereinheiten der Polyionen Polyallylamin (PAH, links) und Polyacrylsäure (PAA, rechts). Das Gleichgewicht zwischen geladenen und ungeladenen funktionellen Gruppen ist abhängig vom pH Wert der Polyelektrolytlösung.

Polyallylamin und Polyacrylsäure sind so genannte „schwache“ Polyelektrolyte, d.h. die Ladungsdichte entlang der Polymerketten ist abhängig vom Protonierungsgrad der funktionellen Gruppen $-NH_3^+$ / $-NH_2$ bzw. -COOH / $-COO^-$ und damit vom pH-Wert der Lösung. Die Eigenschaften von schwachen Polyelektrolyten im Layer-by-Layer Prozess wurde von Michael F. Rubner und Mitarbeitern ausführlich untersucht [88, 89]. Das in der Literatur beschriebene pH-abhängige Verhalten von PAH und PAA im Beschichtungsprozess ließ sich in

unserem Labor in Vorversuchen reproduzieren [83]. Für die Standardbeschichtung der Substrate wurde der pH-Wert der Lösungen auf 8,5 eingestellt.

Polyelektrolyt-Lösungen

Es wurden wässrige 0,01 M PAH- und PAA-Lösungen hergestellt (bezogen auf das Monomer). Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 0,1 M Natronlauge auf 8,5 eingestellt. Die Lösungen wurden immer frisch hergestellt und vor Gebrauch durch ein Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Polydiallyldimethylammoniumchlorid-Lösung (PDADMAC) wurde 0,02 M in Wasser verwendet. Die gereinigten und hydroxylierten Glas- oder Silizium-Substrate wurden jeweils 20 Minuten in Polyelektrolyt-Lösung getaucht und anschließend für fünf Minuten in Wasser gespült. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Glasobjektträger trocken zentrifugiert (50 x g, 4 min). Siliziumträger wurden mit Stickstoff trocken geblasen. In einigen Fällen wurde das „starke“ Polykation Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) verwendet, dessen Ladungsdichte vom pH-Wert der Lösung unabhängig ist.

4.4.3 Null-Ellipsometrie

Die schichtweise Adsorption von PAH und PAA wurde mittels Null-Ellipsometrie an hydroxylierten Siliziumoxid-Oberflächen nachgewiesen. Die Schichtdickenmessungen wurden mit dem computergesteuerten Ellipsometer *Multiskop* der Firma Optrel GbR (Berlin, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem HeNe-Laser (632,8 nm) ausgestattet war. Das *Multiskop* ist bei Harke et al. [90] beschrieben und besteht aus einem schrittmotorgesteuerten Polarisator (Glan-Thompson-Prisma), einem Kompensator (Phasenretardierungsplatte), einem justierbaren Probentisch, einem Analysator (baugleich mit Polarisator) und einem Detektor (Vierquadranten-Photodetektor). Es wurde bei einer Kompensatorstellung von – 45° und einem Einfallswinkel von 70° gemessen. Die Simulation der Schichtdicken erfolgte mit dem Programm *Elli* der Firma Optrel. Zur Bestimmung der Dicke der Siliziumoxid-Schicht wurden in einem Drei-Schichten-Modell Silizium als Substrat und Luft als Medium eingesetzt. Zur Bestimmung der Dicke von Polyelektrolyt-Schichten wurde ein Vier-Schichten-Modell verwendet, in das die zuvor ermittelte Siliziumoxid-Schichtdicke einging. Für die Berechnung wurden die in Tabelle 4-1 aufgeführten Brechungsindizes zugrunde gelegt. Alle ellipsometrischen Messungen wurden an Silizium-Substraten durchgeführt, weil es wegen der Transparenz von Glas an der oberen und unteren Grenzfläche von Objektträgern zu Mehrfachreflektionen des Laserstrahls kommt. Aufgrund der Ähnlichkeit von Siliziumoxid- und Glas-Oberflächen wurden die auf Silizium-Oberflächen erhaltenen Ergebnisse als für Glas gleichermaßen gültig angenommen.

Tabelle 4-1

Liste der komplexen Brechungsindizes n* = n – 1k der verwendeten Materialien

Material	Realteil *n* des Brechungsindex	Imaginärteil *k* des Brechungsindex
Silizium [91]	3,865	0,02
Siliziumoxid [92]	1,456	0
Polyelektrolyt [93]	1,45	0
Luft	1,00	0

4.4.4 UV-Ablation von Polyelektrolytschichten

Zur Charakterisierung des Einflusses von energiereichem UV-Licht auf PAH-PAA-Filme wurde eine Quecksilberdampf-Lampe (Pen-Ray® 90-0012-01 (11SC-1), UVP Inc., Upland, CA, USA) mit einem Strahlungsmaximum bei 254 nm und einer Leistungsdichte von 4,5 mW cm^{-2} im Abstand von 20 mm über den beschichteten Siliziumträgern installiert. Die Proben wurden mit UV-Licht bestrahlt und die Polymerschichtdicke wurde nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mittels Null-Ellipsometrie an jeweils fünf Probenstellen gemessen. Die Mikrostrukturierung von PAH- und PAA-Schichten gelang mittels UV-Ablation unter Verwendung einer mikrostrukturierten Kupfermaske (TEM-Gitterchen „Sjostrand“, Plano GmbH, Wetzlar).

4.4.5 Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (ESCA)

Die Untersuchung des Einflusses der UV-Bestrahlung auf die Schichtzusammensetzung von Polyelektrolytschichten auf Siliziumoberflächen erfolgte mit einem Kratos Axis Ultra (Kratos Analytical, Manchester, UK) mit monochromatisierter AlK_α-Strahlung. Die Nachweisgrenze des Gerätes liegt bei 0,2 Atom-%. Dies entspricht dem Hundertstel einer Monolage eines Elements.

4.4.6 Drucken von Microarrays

Nanopartikel-Microarrays wurden mit Hilfe des Nadel-Ring-Druckers GMS 417 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) auf Glas- oder Siliziumträger gedruckt.

Pro Nadel-Substrat-Kontakt werden gemäß Herstellerangabe 50 pL Flüssigkeit auf die Oberfläche übertragen. Diese Angabe wurde für den Übertrag von wässrigen Partikelsuspensionen bestätigt [94].

4.4.7 Rasterkraftmikroskopie

Nanopartikel-Microspots auf Siliziumträgern wurden mit einem Autoprobe CP Rasterkraft-Mikroskop (TM Microscopes, Sunnyvale, CA, USA) im Non-Kontakt-Modus untersucht.

4.5 Inkubation der Microarray-Oberflächen mit Proteinlösungen

Bevor Microarray-Oberflächen mit Analytlösung in Kontakt gebracht wurden, wurden sie bei Raumtemperatur eine Stunde in 3 % iger (Gewicht/Volumen) Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS blockiert. Nach der anschließenden Inkubation mit Analytlösung wurden sie standardmäßig je 30 Minuten in PBS mit 0,1 Volumen-% Triton X 100 (PBS/Tr), in PBS und in Wasser gewaschen. Sofern nicht anders angegeben wurden Microarrays auf Glasobjekträgern in Färbebehältern aus Glas oder Kunststoff in 80 mL Volumen blockiert, inkubiert und gewaschen. Die Behälter standen auf einem Wippschüttler und wurden bei Bedarf abgedunkelt, indem sie in eine Box gestellt wurden. Inkubationen von Siliziumwafern oder MALDI-Targets erfolgten ebenfalls in Volumina von mehr als 20 mL und wurden je nach Aufbau gerührt, nicht geschüttelt.

4.6 Signaldetektion

4.6.1 Fluoreszenzdetektion

Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem ArrayWoRx^{e} Biochip Reader (Firma Applied Precision, Issaquah, USA) und der Arrayworx 2.1.4 Software. Das Gerät war mit einer Weißlichtquelle ausgerüstet. Verschiedene Filtersets ermöglichten die gezielte Anregung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe und die Detektion der emittierten Fluoreszenz (Tabelle 4-2). Die Belichtungsdauer wurde zwischen 0,1 s und 2 s so gewählt, dass das Signal im dynamischen Bereich des Gerätes lag. Eine CCD Kamera sammelte das emittierte Licht während der Belichtungszeit. Die detektierten Fluoreszenzintensitäten wurden als 16 bit-Graustufenbilder an die Auswerte-Software übergeben. Die laterale Auflösung der Oberflächenscans wurde auf 10 µm x 10 µm eingestellt.

Die Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe des Programms Aida, Version 3.45.039 (Firma Raytest, Straubenhardt, Deutschland). Die Software integrierte die Signalstärke pro Spot über eine kreisförmige Fläche mit wählbarem Radius. Die Fläche war für alle Spots eines Arrays gleich groß (*Fixed Circle* Modus). In einem lokalen Ring mit wählbarer Fläche wurde um jeden Spot das Hintergrundsignal aufintegriert und vom Signal des Spots abgezogen.

Tabelle 4-2

Filtersets des Arrayworx Biochip-Reader für Anregung und Detektion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Für die Filter sind jeweils Transmissionsmaximum und Bandbreite in nm angegeben.

Farbstoffe	Alexa 546, Cy 3	Alexa 647, Cy 5	FITC
Anregungsfilter	540 / 25	635 / 30	480 / 30
Detektionsfilter	595 / 50	685 / 40	530 / 40

4.6.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist eine Analysemethode mit der die Molekülmassen schwerer und/oder schwerflüchtiger Substanzen bestimmt werden können. Sie ist daher besonders geeignet, um Biomakromoleküle wie Proteine zu untersuchen. Vor allem in der Proteinanalytik hat sich die MALDI-TOF MS in den letzten Jahren als besonders empfindliche und zeitsparende Methode etabliert [95-98]. Für die Matrix-unterstützte Laser-Desorption und Ionisation wird die zu untersuchende Substanz in eine Matrix aus organischen niedermolekularen Molekülen wie beispielsweise Sinapinsäure oder α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure eingebettet, welche Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Das Probe-Matrix-Gemisch wird in der Ionenquelle des Massenspektrometers mit Laser-Pulsen bestrahlt. Dadurch werden die Matrixmoleküle angeregt und desorbieren explosionsartig von der Oberfläche des Probenträgers, wobei sie die Moleküle des Analyten mit in die Gasphase reißen. Gleichzeitig werden die Moleküle des Analyten ionisiert, indem Protonen oder Alkaliionen von der Matrix auf die Probenmoleküle übertragen werden. Durch den Laserpuls entsteht direkt über der Bestrahlungsstelle eine Wolke mit hoher Moleküldichte. Die gebildeten Ionen werden anschließend in einem elektrostatischen Feld über eine definierte Strecke beschleunigt und erhalten so eine ihrer Masse und Ladung entsprechende kinetische Energie. An die Ionenquelle schließt sich ein feldfreies Flugrohr an, welches die beschleunigten Ionen mit der erreichten Endgeschwindigkeit durchfliegen. Am Ende des Flugrohrs treffen die Ionen auf einen Detektor mit dem die Flugzeit gestoppt wird. Aus der Flugzeit kann aufgrund des in Gleichung 4-2 dargestellten Zusammenhangs die ursprüngliche kinetische Energie und somit die Molekülmasse der Ionen ermittelt werden (Gleichung 4-3).

Dabei steht m für die Molekülmasse, v für die Endgeschwindigkeit der Ionen nach Durchfliegen des Beschleunigungsfeldes, z für die Anzahl der Molekülladungen, U für die Spannung des

Beschleunigungsfeldes, d für die Driftstrecke im feldfreien Flugrohr, t für die Flugzeit und e für die Elementarladung.

$$\frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\frac{d^2}{t^2} = ezU$$ **Gleichung 4-2**

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{d^2}t^2$$ **Gleichung 4-3**

Der massenspektrometrische Nachweis von Analytanbindungen an nanopartikulären Affinitätsoberflächen erfolgte im Haus an einem linearen MALDI-TOF-Massenspektrometer. Das verwendete Gerät war ein modifiziertes HP Massenspektrometer 2025 A (Firma GSG-Analytics, Bruchsal, Deutschland) mit *Time-Lag-Focusing* Einheit (TLF) und LeCroy 9350 CM-Oszilloskop. Zur Analyse von Nanopartikel-gebundenen Analytmolekülen wurden die zum Gerät gehörenden Probenträger zunächst mit Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln beschichtet und anschließend in Probelösung mit biotinyliertem und unbiotinyliertem Insulin inkubiert. Als externe Kalibrierung wurde eine lineare Zweiparameter-Kalibrierung mit Cytochrom C und Insulin vorgenommen.

Die Messungen an Nanopartikel-Microspots wurden bei der Firma Bruker Daltonics an einem Bruker Ultraflex II Reflektron-Massenspektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland) ausgeführt.

4.7 Bestimmung von systematischen Fehlern bei der Chipherstellung

Um Parameter zu identifizieren, die bei der Chipherstellung einen Einfluss auf die spätere Messgenauigkeit der Chips hatten, wurden Arrays in vielfacher Ausführung gedruckt und in *derselben* Probe inkubiert. Signalschwankungen, die daraufhin zwischen Spots identischer Ausführung messbar waren, wurden ausschließlich auf Schwankungen der Chip- beziehungsweise der Spot-Qualität zurückgeführt. Inhomogenitäten in der Probelösung oder ein möglicher Fehler des Fluoreszenzscanners wurden nicht berücksichtigt. Zur Quantifizierung des systematischen Fehlers wurden die Standardabweichungen σ der Signalintensitäten von Spots identischer Ausführung (Gleichung 4-4) und die mittleren Standardabweichung $\overline{\sigma}$ der Fluoreszenzintensitäten innerhalb identischer Spotgruppen berechnet (Gleichung 4-5, Gleichung 4-6).

Zur Bestimmung der mittleren Standardabweichung innerhalb mehrfach vorhandener Spot-Gruppen i, wurden zunächst die Mittelwerte $\bar{x}_i$ der Signalintensitäten aller Spots innerhalb der einzelnen Gruppen berechnet. Daraus wurden nach Gleichung 4-5 die Varianzen σ_i^2 der Messwerte innerhalb der einzelnen Gruppen ermittelt. Die Quadratwurzel aus dem Mittelwert aller Varianzen $\overline{\sigma^2}$ ergab die mittlere Standardabweichung der betrachteten Gruppen (Gleichung 4-6). Programme zur statistischen Analyse geben die mittlere Standardabweichung aus mehreren Datensätzen als *Root Mean Square (residual)* aus [99].

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_j (x_j - \bar{x})^2} \qquad \textbf{Gleichung 4-4}$$

$$\sigma_i^2 = \frac{1}{N-1}\sum_j x_{ij} - \bar{x}_i \qquad \textbf{Gleichung 4-5}$$

$$\bar{\sigma} = \sqrt{\overline{\sigma^2}} \qquad \textbf{Gleichung 4-6}$$

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um ihren Mittelwert. Sie ist jedoch abhängig vom Stichprobenumfang N und wird umso kleiner, je mehr Messungen berücksichtigt werden. Für den Vergleich unterschiedlicher Messsysteme auf Grundlage der auftretenden Standardabweichungen wurden daher immer gleich große Stichproben betrachtet.

4.8 Bestimmung des Auflösungsvermögens

Die Begriffe Empfindlichkeit, Nachweisgrenze und Auflösungsvermögen und ihre Bedeutung für die Charakterisierung eines Messsystems werden in der Literatur kontrovers diskutiert [100, 101]. In dieser Arbeit wird der Begriff Empfindlichkeit verwendet, um anzugeben wie groß die Signaländerung eines Messsystems ist, mit dem es auf eine Änderung der Messgröße reagiert. In diesem Sinne ist ein System, bei dem eine Änderung im Wert der Messgröße zu einer großen Änderung des Signals führt, ein empfindliches System, wohingegen ein System, das auf dieselbe Änderung im Wert der Messgröße mit einer kleinen Signaländerung reagiert, ein weniger empfindliches System ist. Als Maß für die Empfindlichkeit eines Messsystems dient die Steigung S der Kalibrierkurve. Der Quotient aus der doppelten Standardabweichung σ der Messwerte und der Empfindlichkeit eines Messsystems beschreibt den Fehler ΔC, mit dem die Bestimmung des Wertes der Messgröße behaftet ist (Gleichung 4-7).

$$\Delta C = \frac{2\sigma}{S}$$ **Gleichung 4-7**

$$R = \frac{C}{\Delta C} = \frac{S}{2\sigma} \cdot C$$ **Gleichung 4-8**

ΔC legt das Auflösungsvermögen R eines Messystems fest. In Anlehnung an die Definition des Auflösungsvermögens bei spektroskopischen Methoden kann der Messfehler ΔC zum gemessenen Mittelwert C ins Verhältnis gesetzt werden (Gleichung 4-8). Man erhält dadurch Zahlenwerte, die unabhängig vom betrachteten Messbereich miteinander vergleichbar sind.

Zum Vergleich der Auflösungsvermögen von Nanopartikel-Microarrays mit unterschiedlichen Partikeldichten pro Spot wurden die Signalantworten der Messsysteme über vier Größenordnungen Analytkonzentration aufgenommen. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Messsysteme wurde zwischen den Messpunkten linear interpoliert.

Abbildung 4-2 veranschaulicht den Zusammenhang von Empfindlichkeit, Standardabweichung und Auflösungsvermögen.

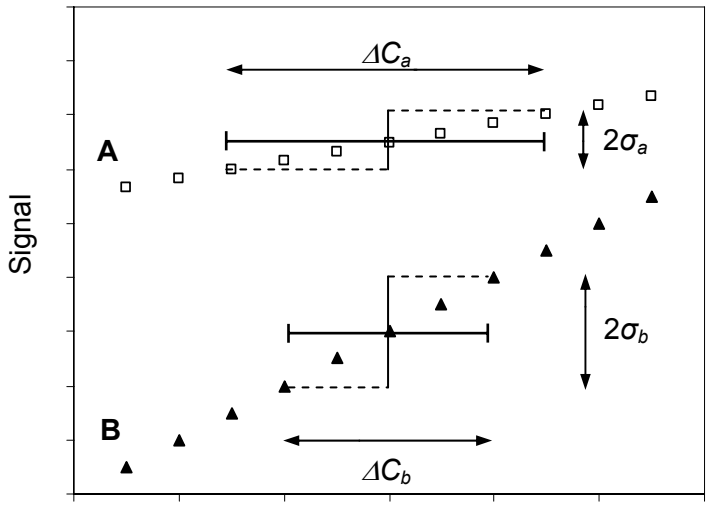

Abbildung 4-2

Veranschaulichung des Einflusses von Empfindlichkeit und Standardabweichung auf das Auflösungsvermögen eines Messsystems. **A** System mit geringer Empfindlichkeit (□), **B** System mit größerer Empfindlichkeit (▲). Der Fehlerbalken in y-Richtung stellt die Standardabweichung σ der gemessenen Werte dar. ΔC ist die Genauigkeit mit der der Wert der Messgröße (die Konzentration) aus dem gemessenen Signal abgeleitet werden kann. Obwohl der Messfehler in System A kleiner ist, ist wegen der geringen Empfindlichkeit des Systems die Messunsicherheit größer. System A besitzt daher ein geringeres Auflösungsvermögen als System B.

4.9 Identifizierung von Messwert-Ausreißern

Messwerte, die weit von der Mehrzahl gleichwertiger Messergebnisse abweichen, stehen unter dem Verdacht durch andere Einflüsse als den der Probe bestimmt worden zu sein. Oft ist es sinnvoll, solche Ausreißer aus der Auswertung auszuschließen, es sei denn man interessiert sich für Ursache und Auswirkung von Störungen im Messprozess. In dieser Arbeit wurden Messwerte dann als Ausreißer klassifiziert, wenn sie

- mehr als den 1,5-fachen Interquartil-Bereich oberhalb des 75 %- Quantils lagen, oder
- mehr als den 1,5-fachen Interquartil-Bereich unterhalb der 25 %- Quantils.

Das „25 % Quantil“ ist derjenige Messwert einer Messreihe, der größer oder gleichgroß ist als 25 % der gemessenen Werte. Das „75 % Quantil“ ist derjenige Messwert, der größer oder gleichgroß ist als 75 % der gemessenen Werte. Der „Interquartil-Bereich“ ist die Differenz von 75 % Quantil und 25 % Quantil (Abbildung 4-3).

Die Ausreißer-Analyse wurde mit Hilfe des Progamms „JmpIn“ 5.1 der Firma SAS, Cary, NC, USA durchgeführt.

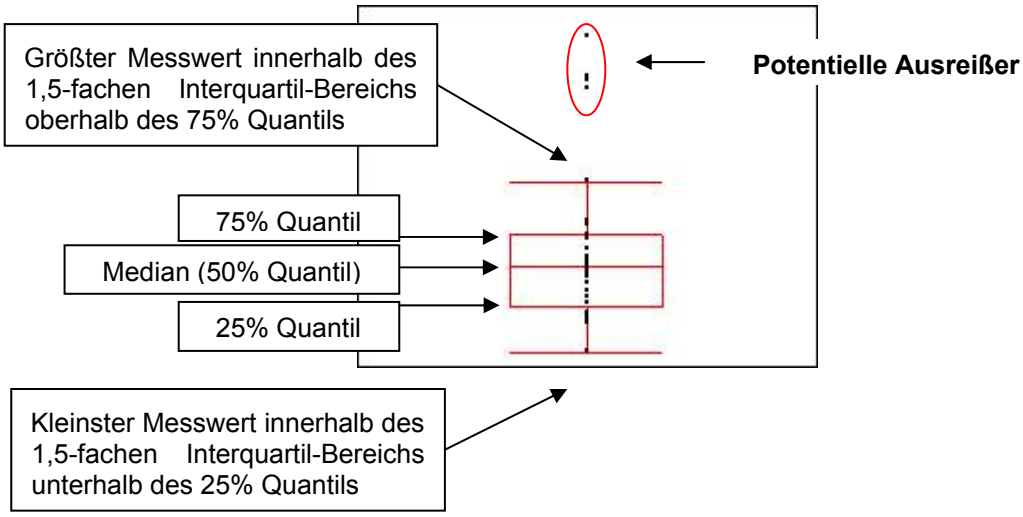

Abbildung 4-3

Box-Whisker-Plot zur Veranschaulichung der Ausreißer-Analyse. Die schwarzen Punkte stellen die gemessenen Werte dar. Obere und untere Begrenzung der Box markieren das 75 %-Quantil bzw. das 25 %-Quantil. Die mittlere Linie in der Box bezeichnet den Median. Die Ausläufer oder „Whiskers“ enden beim größten Messwert, der in den 1,5-fachen Interquartil-Bereich oberhalb des 75 %-Quantils fällt bzw. beim kleinsten Messwert, der in den 1,5-fachen Interquartil-Bereich unterhalb des 25 %-Quantils fällt. Messwerte die darüber oder darunter liegen sind potentielle Ausreißer.

4.10 Normierung von Messwerten

Ergebnisse wurden dann normiert, wenn sie aus unterschiedlichen Inkubationen stammten und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten aufgrund von Unterschieden in den verwendeten Analytkonzentration nicht vergleichbar waren. Zur Normierung von Einzelexperimenten wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten aller Spots eines Experiments aufsummiert und die Summen normiert. Die Fluoreszenzintensitäten der Einzelspots wurden mit den so ermittelten Korrekturfaktoren multipliziert und aus den korrigierten Werten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

4.11 Modellierungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes

In den späten 80er-Jahren des 20. Jahrhunderts haben Roger Ekins und Mitarbeiter mit der Ausarbeitung der *Ambient-Analyte*-Theorie den Grundstein gelegt für die Entwicklung der heutigen Microarray Technologie [102]. Ekins leitete aus dem Massenwirkungsgesetz verschiedene Gleichungen ab, die es unter der Annahme idealer Bedingungen erlauben, Vorhersagen über die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts bei Ligandenbindungstests zu machen [8]. Zentrale Größe bei den Berechnungen ist der Anteil Fängermoleküle *F*, der im Gleichgewichtszustand mit Analyt besetzt ist:

$$F = \frac{c(AB)}{c(b)} \qquad \textbf{Gleichung 4-9}$$

Dabei steht *c(AB)* für die Konzentration der Fänger-Analyt Komplexe im Gleichgewicht und *c(b)* für die Konzentration der insgesamt eingesetzten Fängermoleküle. Im Weiteren stehen entsprechend *c(a)* für die Konzentration des insgesamt eingesetzten Analyts und *c(A)* beziehungsweise *c(B)* für die Konzentration ungebundener Analyt- beziehungsweise Fängermoleküle im Gleichgewicht. Aus dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 4-10) folgt durch Umformung unter Verwendung des oben stehenden Ausdrucks Gleichung 4-11. Sie gibt den Zusammenhang an zwischen den Konzentrationen der eingesetzten Fänger- und Analytmoleküle, der Assoziationskonstanten K_a der Bindereaktion und dem resultierenden Anteil F der besetzten Fängermoleküle im Gleichgewicht.

Um die Auswirkung von Veränderungen der Fänger- und Analytkonzentrationen in einem Ligandenbindungssystem ableiten zu können, wurde Gleichung 4-11 mit Hilfe des Programms

Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA) in Kurvenscharen umgesetzt, die den Zusammenhang der Parameter veranschaulichten.

$$\frac{c(AB)}{c(A)\cdot c(B)} = \frac{c(AB)}{(c(a)-c(AB))(c(b)-c(AB))} = K_a \qquad \textbf{Gleichung 4-10}$$

$$F^2 - (\frac{1}{K_a \cdot c(b)} + \frac{c(a)}{c(b)} + 1)F + \frac{c(a)}{c(b)} = 0 \qquad \textbf{Gleichung 4-11}$$

$$F = (\frac{1}{K_a \cdot c(b)} + \frac{c(a)}{c(b)} + 1)\cdot\frac{1}{2}) - \sqrt{(\frac{1}{K_a \cdot c(b)} + \frac{c(a)}{c(b)} + 1)\cdot\frac{1}{2})^2 - \frac{c(a)}{c(b)}} \qquad \textbf{Gleichung 4-12}$$

4.11.1 Das Ambient-Analyte Modell und massensensitive Tests

Ekins et al. leiteten aus Modellierungen des in Gleichung 4-11 beschriebenen Zusammenhangs Aussagen über die Auswirkung einer reduzierten Fängerkonzentration auf das Assayverhalten ab [8] und erstellten unter anderem auf dieser Grundlage die *Ambient-Analyte* Theorie. Eine Darstellung seiner Modellierungen ist in Abbildung 4-4 zu sehen. Die durchgezogenen Kurven geben für vier verschiedene Analytkonzentrationen an, wie der Anteil der im Gleichgewicht besetzten Fängerstellen von der angebotenen Fängerkonzentration abhängt. Alle Konzentrationen sind in Einheiten von K_a^{-1} angegeben, so dass die Grafik unabhängig von der Assoziationskonstanten K_a gültig ist. Man erkennt, dass für die dargestellten Verhältnisse der Anteil der besetzten Fängerstellen im Gleichgewicht von Veränderungen der Fängerkonzentration praktisch unbeeinflusst bleibt, sofern die Fängerkonzentration kleiner als 0,01 K_a^{-1} bleibt. Die Konzentration der Fänger-Analyt-Komplexe wird in diesem Fall ausschließlich durch die Analytkonzentration bestimmt. Die durchbrochenen Kurven in Abbildung 4-4 zeigen für vier verschiedene Analytkonzentrationen, wie das Verhältnis von gebundenen zu freien Analytmolekülen im Gleichgewicht abhängt von der Konzentration der Fängerstellen im System. Für die dargestellten Analytkonzentrationen im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 K_a^{-1} und 10 K_a^{-1} bleibt der Anteil des in Bindung vorliegenden Analyts kleiner als ein Prozent, sofern die Fängerkonzentration kleiner ist als 0,01 K_a^{-1}. Die Verarmung des Analyten in der Probe wird dadurch vernachlässigbar und die Gleichgewichtsverteilung spiegelt die tatsächliche Analytkonzentration in der Probe wider, nicht einen durch die Messung verminderten Wert. Aus diesen Überlegungen schloss Ekins, dass der Anteil der besetzten Fänger ein direktes Maß für

die tatsächliche Analytkonzentration in der Probe wird, wenn die Fängerkonzentration in einem Testsystem auf unter 0,01 K_a^{-1} vermindert wird. Ekins nannte diese Bedingung für ein quasi störungsfreies Testdesigns *Ambient-Analyte*-Bedingung [8].

Die Verminderung von Fängerstellen bei gegebener Analytkonzentration ist bei einem Ligandenbindungstest im thermodynamischen Gleichgewicht jedoch gleichbedeutend mit einer Reduktion von Fänger-Analyt-Komplexen und damit auch mit einer Verringerung des Gesamtsignals. Ekins postulierte deshalb die Verminderung von Fängerstellen bei konstanter Fänger*dichte* und entwickelte Ligandenbindungstests im Microarray-Format. Die Verkleinerung der verfügbaren Affinitätsoberfläche zu Microspots resultiert nach Gleichung 4-11 trotz der Abnahme des Gesamtsignals in einer Steigerung der Signal*dichte*, weil die Analytkonzentration in der Probe durch die Messung kaum verringert wird [8]. Ein Test unter *Ambient-Analyte* Bedingungen minimiert das Absinken der Analytkonzentration in der Probe. Dadurch wird im thermodynamischen Gleichgewicht das Verhältnis von besetzten zu vorhandenen Fängerstellen maximiert und man erreicht im Bezug auf den Materialverbrauch die optimale Signalstärke. Sofern die *Ambient-Analyte*-Bedingung erfüllt ist, wird das Testergebnis unabhängig vom Probenvolumen und von der Fängerkonzentration und spiegelt direkt die Analytkonzentration in der Probe.

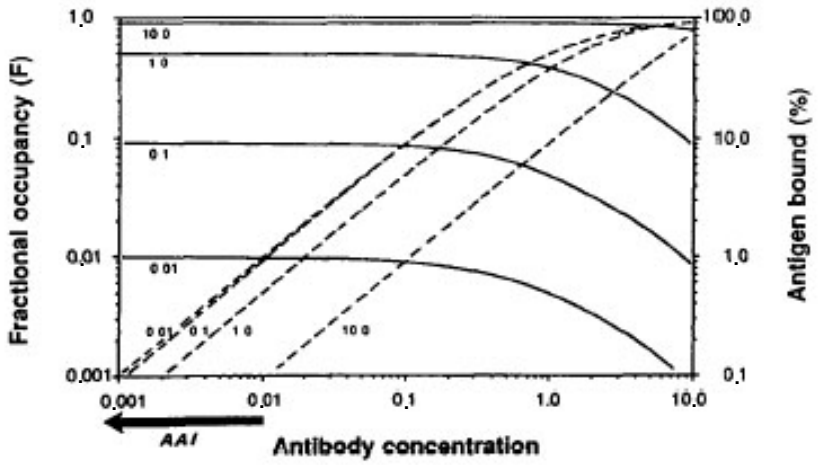

Abbildung 4-4

Grafik aus [102]. Darstellung des Anteils besetzter Fängerstellen (—, linke Ordinate) und des in Bindung vorliegenden Analyts (- - - , rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der angebotenen Fängerkonzentration. Aufgetragen sind die Verhältnisse für vier verschiedene Analytkonzentrationen. Alle Konzentrationen sind in Einheiten von K_a^{-1} angegeben. Dadurch ist die Grafik unabhängig von der Assoziationskonstanten K_a der Bindereaktion gültig. Konkrete Werte ergeben sich durch Einsetzen der jeweiligen Assoziationskonstanten. Beispielsweise ist die *Ambient-Analyte* Bedingung für eine Antikörper-Antigen Wechselwirkung mit $K_a = 1x10^{10}$ M^{-1} dann gegeben, wenn die Antikörper-Konzentrationen < 10^{-12} M ist; der Anteil gebundenen Analyts liegt dann für Analytkonzentrationen im Bereich von 1 nM bis 1 pM unterhalb von 1 %.

Bei einem Ligandenbindungstest ist allerdings nicht zwangsläufig die Bestimmung der Analyt*konzentration* von Interesse. Häufig geht es wie beispielsweise bei einem diagnostischen Test um den absoluten empfindlichen Nachweis einer Analytsubstanz in einer Probe. In diesem Fall erscheint es vorteilhaft, die Fängerdichte innerhalb der Microspots möglichst hoch zu wählen und soviel Analyt wie möglich für den Nachweis zu immobilisieren. Silzel *et al.* haben ein Testdesign vorgestellt, das darauf abzielte einen möglichst großen Anteil der in der Probe vorhandenen Analytmoleküle auf der Affinitäts-Oberfläche zu binden [49]. Diese Methode diente dem Nachweis der vorhandenen Analyt-Masse und wurde als *Mass-Sensing* bezeichnet. Die Fängerkonzentrationen der vorgestellten Assays lagen um ein bis zwei Größenordnungen oberhalb der *Ambient-Analyte* Bedingung.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Anbindung von Fänger-Proteinen auf der Nanopartikel-Oberfläche

Für die Erprobung nanopartikulärer Biochip-Oberflächen sollten mehrere, mit unterschiedlichen Fängermolekülen ausgestattete Nanopartikel-Varianten eingesetzt werden. In Ergänzung zu dem weit verbreiteten Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem wurde Protein G als vielseitiges Fängermolekül ausgewählt. Protein G ist ein IgG-Rezeptor aus der Zellwand von *Streptococcus spec.* der Gruppe G. Wie Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet Protein G Immunglobulin G- (IgG-) Antikörper von Säugetieren bevorzugt über den Fc-Teil. Protein G weist für IgG-Moleküle vieler Spezies eine signifikant höhere Affinität auf als Protein A [103]. Protein G bindet alle humanen und murinen IgG-Subklassen. Die Assoziazionskonstanten von Protein G zu den humanen IgG-Subklassen liegen im Bereich von 3,3 bis 8,4 x 10^8 M^{-1} [104]. Anders als Protein A bindet Protein G nicht an humane IgM-, IgD- und IgA-Moleküle.

Für die Funktionalisierung von carboxylmodifizierten Silicapartikeln wurde GammaBind™G Type 2 Protein G (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eingesetzt. GammaBind™G Type 2 ist ein rekombinantes Protein G mit einer Polylysin-Region aus zehn Lysinresten. Diese Region ermöglicht eine vorzugsweise gerichtete Konjugation des Proteins. Den Angaben des Herstellers zufolge besitzt GammaBind™G Type 2 ein Molekulargewicht von 22 600 Da, der isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei pH 4,5 und der optimale pH-Wert für die IgG-Bindung ist pH 5. Natürliches Protein G bindet an Serum-Albumin und an Zelloberflächen, dem rekombinanten Protein G fehlt die Bindungsstelle für humanes Serum-Albumin.

Protein G-modifizierte Partikel sollten in Kombination mit fluoreszenzmarkierten IgG-Antikörpern als Modellsystem für Tests zur Charakterisierung biofunktionalisierter Nanopartikel-Oberflächen und Microarrays aus mikrostrukturierten Nanopartikel-Schichten eingesetzt werden. Zusätzlich sollten Protein G-modifizierte Nanopartikel als Affinitäts-Oberfläche für die gerichtete Immobilisierung von IgG-Molekülen dienen.

Gammaglobulin-Fraktionen aus Kaninchen- und Ziegenserum sollten eingesetzt werden, um stellvertretend für kostenintensive Antikörper mit exklusiven Antigen-Affinitäten die kovalente Anbindung von Antikörpern an Partikel-Oberflächen zu optimieren. Für die Charakterisierung von IgG-modifizierten Partikel-Oberflächen wurden fluoreszenzmarkierte sekundäre Anti-Kaninchen und Anti-Ziege Antikörper eingesetzt. Die kovalente, ungerichtete IgG-Funktionalisierung von Nanopartikel-Oberflächen und die gerichtete IgG-Modifizierung über Protein G sollten hinsichtlich ihrer Effektivität verglichen werden.

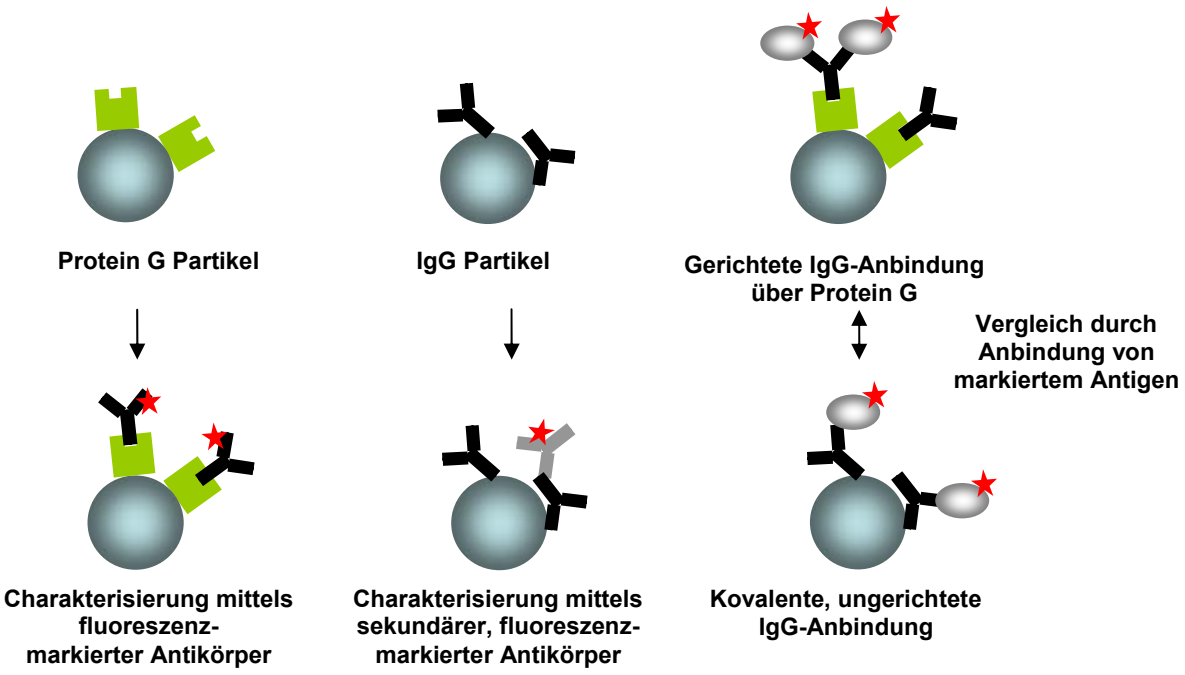

Abbildung 5-1

Veranschaulichung der verwendeten Nanopartikel-Modellsysteme.

5.1.1 Kovalente Proteinanbindung mittels Carbodiimid-Chemie

Für die kovalente Anbindung von Proteinen an Nanopartikel-Oberflächen wurden Silica-Partikel mit carboxylfunktionalisierter Schale verwendet. Die Carboxylgruppen wurden mit Hilfe von N-(3-Dimethylaminopropyl)-N´-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) in einen aktivierten Zustand gebracht, aus dem sie in Gegenwart von Aminogruppen bevorzugt Amidbindungen eingehen. Proteine können über Aminogruppen, die in ihrer Struktur frei zugänglich sind, an die aktivierten partikelständigen Carboxylgruppen binden. Die Anbindung der Proteine erfolgt im Allgemeinen in zufälliger Ausrichtung.

Anbindung von Protein G

Für die EDC-vermittelte Anbindung von Protein G an carboxylmodifizierte Partikel wurde das Mengenverhältnis von EDC zu Partikeln aus der Vorschrift für die Streptavidin-Funktionalisierung übernommen. Außerdem wurde die eingesetzte Protein-Masse konstant gehalten, um den unterschiedlichen Molmassen von Protein G (22 600 g mol^{-1}) und Streptavidin (~ 52 000 g mol^{-1}) Rechnung zu tragen. Es wurde das pH-Optimum der Kopplungsreaktion, die optimale Reaktionszeit und die optimale Reaktionstemperatur bestimmt.

Durchführung

Das Reaktionsmaximum von EDC liegt im sauren Bereich zwischen pH 4,7 und pH 6 [78]. Für die Pufferung der Reaktion wurde Morpholinoethansulfonsäure (MES)-Puffer verwendet, der mit 0,1M NaOH-Lösung auf verschiedene Werte im genannten pH-Bereich eingestellt wurde. In einem Gesamtvolumen von 1 mL MES-Puffer wurde jeweils 1 mg carboxylmodifizierte Partikel mit 1,3 nmol Protein G und 800 nmol EDC gemischt und unter den angegebenen Bedingungen geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (16 060 x g, 10 min) und in MES 50 und MES 50/Tr gewaschen. Zum Nachweis der Protein G-Anbindung auf den Partikel-Oberflächen wurden die Partikel aus allen Ansätzen gleichermaßen für 30 min in einer 3 % igen Lösung aus bovinem Serum-Albumin (BSA) in PBS blockiert und anschließend mit 800 nM FITC-markiertem Kaninchen-IgG in MES 50 umgesetzt. Als Negativkontrolle dienten carboxylfunktionalisierte Partikel. Nach der Umsetzung wurde der Überstand abgenommen und die Fluoreszenz der darin verbliebenen Menge FITC-IgG vermessen. Die Partikel wurden mehrfach in MES 50 gewaschen und anschließend ebenfalls vermessen.

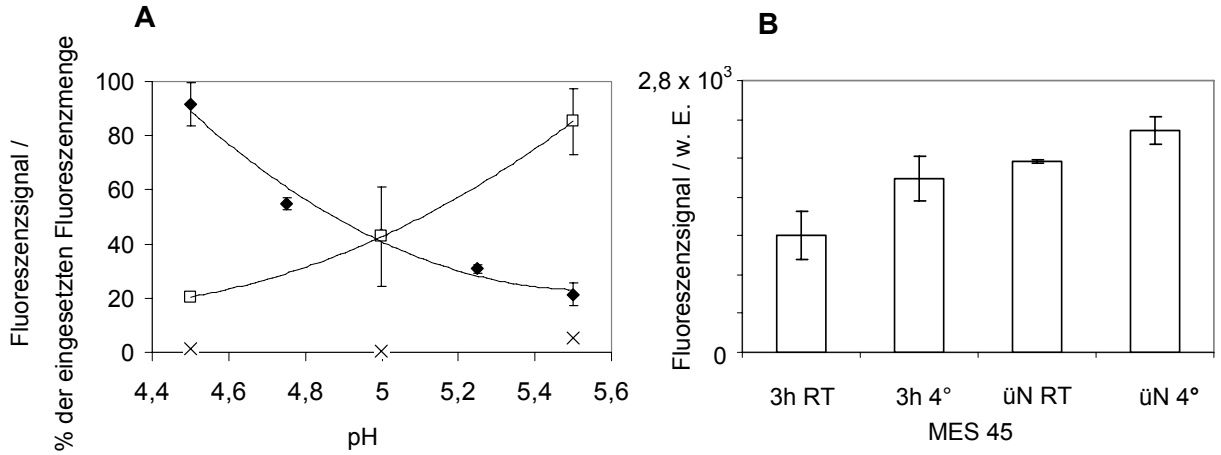

Abbildung 5-2

Einfluss der Reaktionsparameter pH-Wert, Temperatur und Reaktionsdauer bei der Immobilisierung von Protein G auf carboxylmodifizierten Partikeln. **A** IgG-Bindekapazität von Protein G-Partikeln in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Protein G Immobilisierung. Dargestellt ist die Fluoreszenzmenge auf den Partikel-Oberflächen (♦) und die Fluoreszenzmenge im Überstand (□) nach der Umsetzung der Protein G-Partikel mit fluoreszenzmarkiertem IgG und das Fluoreszenzsignal auf carboxylmodifizierten Kontroll-partikeln (x). **B** Fluoreszenzsignal auf Partikel-Oberflächen, die unter den angegebenen Reaktion-bedingungen mit Protein G modifiziert und anschließend einheitlich mit fluoreszenzmarkiertem IgG umgesetzt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 5-2 sind die Fluoreszenzmenge im Überstand und die auf der Partikel-Oberfläche nachweisbare Fluoreszenzmenge dargestellt, beide aufgetragen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Bindereaktion von Protein G an die Partikel-Oberfläche. Die Fluoreszenzmenge auf den Partikeln diente als Maß für die Menge an markiertem IgG, das an die Protein G-modifizierten

Partikel gebunden hat und damit als indirektes Maß für die Protein G-Menge auf den Partikel-Oberflächen.

Auf den Kontrollpartikeln wurde kein FITC-markiertes IgG detektiert. Die Anbindung beruhte demnach auf der Affinität der Antikörper zu den Protein G-modifizierten Partikel-Oberflächen. Folglich besaß Protein G, nachdem es auf den Partikel-Oberflächen immobilisiert worden war, weiterhin seine native Konformation zur spezifischen Bindung von IgG-Molekülen. Partikel, die bei pH 4,5 mit Protein G funktionalisiert worden waren, wiesen die größte IgG-Bindekapazität auf. Mit steigendem pH-Wert während der EDC-vermittelten Protein-G Anbindung nahm die resultierende IgG-Bindung stetig ab. Der nichtgebundene Anteil des fluoreszenzmarkierten IgG konnte jeweils im Überstand nachgewiesen werden.

Der Vergleich verschiedener Reaktionszeiten und -temperaturen ergab, dass die carbodiimid-vermittelte Anbindung von Proteinen auf den carboxylmodifizierten Partikel-Oberflächen durch niedrige Temperatur und lange Reaktionszeit gesteigert werden konnte. In Abbildung 5-2 zeigen die Fluoreszenzintensitäten, die durch Inkubation der verschiedenen Partikelansätze mit FITC-markierten Antikörpern erzielt wurden, die IgG-Bindekapazitäten der Protein G-Partikel an. Bei 12 h Reaktionszeit auf 4°C wurde deutlich mehr funktionsfähiges Protein G auf der Partikel-Oberfläche nachgewiesen als bei kürzerer Reaktionszeit und bei Raumtemperatur. In wässrigen Lösungen ist die Hydrolyse des carbodiimidaktivierten Zwischenproduktes eine Konkurrenz-reaktion zur Ausbildung von Amiden. Offenbar stabilisierte die niedrige Temperatur im Vergleich zur Reaktion bei Raumtemperatur das aktive Zwischenprodukt gegen Hydrolyse und die Reaktionsbilanz wurde zugunsten der Amidbildung verschoben. Aufgrund der Ergebnisse wurde folgendes Standardprotokoll für die Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln mit Protein G festgelegt: Ein Milligramm carboxylmodifizierter Partikel wurde in einem Gesamtvolumen von 1 mL MES 45 mit 1,3 nmol Protein G und 800 nmol EDC gemischt und über Nacht bei 4° C geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel in MES 50/Tr und MES 50 gewaschen und kurzfristig bei 4 °C gelagert.

Anbindung von IgG

Bei der EDC-vermittelten Ausbildung von Amidbindungen werden auch Carboxylgruppen innerhalb der Proteinmoleküle aktiviert. Daher war davon auszugehen, dass auf der Partikel-Oberfläche auch Protein-Cluster oder Protein-Mehrfachlagen verankert werden. Um zu verhindern, dass sich insbesondere für die kostenintensiven IgG-Antikörper ein ungünstiges Verhältnis von Materialverbrauch und Bindekapazität ergibt, indem ein Teil der immobilisierten Fänger-Moleküle für Analyt-Moleküle sterisch nicht zugänglich ist, wurde die optimale Proteinmenge für die Absättigung der Partikel-Oberflächen ermittelt.

Für die ungerichtete kovalente Anbindung von IgG-Molekülen an carboxylmodifizierte Partikel-Oberflächen wurden die Reaktionsparameter übernommen, die für die Herstellung von Protein G-funktionalisierten Partikeln etabliert worden waren.

Durchführung

In einem Gesamtvolumen von 1 mL MES 45 wurden jeweils 1 mg carboxylmodifizierte Partikel, 800 nmol EDC und 15 pmol, 30 pmol, 60 pmol, 300 pmol oder 1500 pmol Kaninchen-IgG gemischt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach Waschen in MES 50 und MES 50/Tr wurden alle Partikelansätze gleichermaßen in BSA-Lösung (3 %) blockiert und anschließend mit Cy3-markiertem Anti-Kaninchen Antikörper in PBS inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Fluoreszenzintensität der markierten Detektionsantikörper aufgenommen, die spezifisch an die Kaninchen-IgG modifizierten Partikel-Oberflächen angebunden hatten.

Ergebnisse und Diskussion

Als Maß für die zugängliche Menge Kaninchen-IgG auf den Partikel-Oberflächen diente das Fluoreszenzsignal von sekundären Anti-Kaninchen Antikörpern, die bevorzugt den Fc-Teil der gebundenen Kaninchen-IgG erkannten. In Abbildung 5-3 ist die Fluoreszenzintensität der Detektions- Antikörper auf den Partikel-Oberflächen in Abhängigkeit von der Menge Kaninchen-IgG aufgetragen, die zur Funktionalisierung der Partikel eingesetzt worden war.

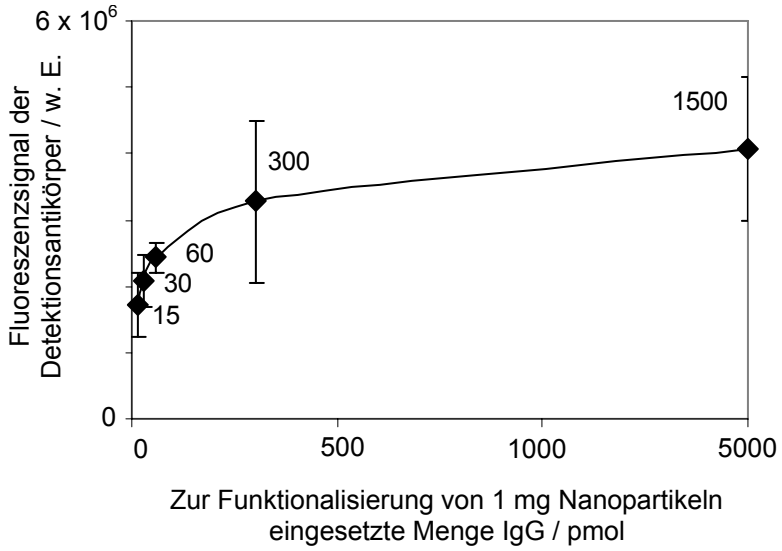

Abbildung 5-3

Fluoreszenzsignal der markierten Anti-Kaninchen-IgG Antikörper, die an die kovalent mit Kaninchen-IgG funktionalisierten Nanopartikel angebunden haben. Die Fluoreszenzintensität ist aufgetragen über der Menge Kaninchen-IgG, die zur Funktionalisierung der Partikel eingesetzt wurde. Das Reaktionsvolumen bei jeder Umsetzung war 1 mL.

Der Verlauf der Kurve beschreibt die graduelle Absättigung der Partikel-Oberflächen bei steigendem IgG-Angebot während der EDC-vermittelten Oberflächen-Modifizierung. Bei der Umsetzung von 300 pmol IgG pro Milligramm Partikel waren die Oberflächen weitgehend gesättigt: Eine Vervielfachung des IgG-Angebots bei der Partikel-Modifizierung hatte keine deutliche Steigerung der Bindekapazität der IgG-Oberflächen für den Detektions-Antikörper zur Folge. Das wies darauf hin, dass die verfügbare Partikel-Oberfläche durch Anbindung von 300 pmol Immunoglobulinen belegt war und höhere IgG-Mengen bei der Modifizierung zur Bildung von Protein-Clustern und Mehrfachlagen auf der Partikel-Oberfläche führten, die keine zusätzliche Bindekapazität schufen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde folgendes Standardprotokoll zur kovalenten IgG-Modifizierung von Silica-Partikeln festgelegt: In einem Gesamtvolumen von je 1 mL MES 45 wurde 1 mg carboxylmodifizierte Partikel mit 300 pmol IgG und 800 nmol EDC gemischt und über Nacht bei 4° C geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (16 060 x g, 10 min), in PBS/Tr und PBS gewaschen und kurzfristig bei 4 °C gelagert.

5.1.2 Gerichtete Anbindung von IgG an Protein G-modifizierte Partikel

Alternativ zu der kovalenten aber ungerichteten Anbindung von IgG-Antikörpern auf Partikeloberflächen sollten Antikörper auch gerichtet an Protein G-modifizierten Partikeln immobilisiert werden. Zur Optimierung des IgG-Verbrauchs bei der gerichteten Immobilisierung wurden Protein G-Nanopartikel mit unterschiedlichen IgG-Mengen inkubiert und die Sättigung der Partikel-Oberflächen wurde anhand der Fluoreszenzmarkierung der verwendeten IgG-Moleküle verfolgt. Zur Überprüfung der unspezifischen Adsorption von IgG an die Partikel-Oberflächen wurden auch carboxylmodifizierte Partikel mit IgG inkubiert.

Durchführung

Protein G-funktionalisierte Partikel wurden nach dem zuvor etablierten Protokoll hergestellt. Die Protein G-Partikel und carboxylfunktionalisierte Partikel wurden zuerst in BSA-Lösung blockiert und anschließend 3 h mit 10 pmol, 100 pmol, 200 pmol, 400 pmol, 800 pmol und 1600 pmol FITC-markiertem IgG pro Milligramm Partikel in 1 mL MES 50 umgesetzt. Nach mehreren Waschschritten wurde die Fluoreszenz auf den Partikel-Oberflächen gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 5-4 ist die Fluoreszenzmenge aufgetragen, die auf den Protein G-Partikel-Oberflächen nach der Inkubation in unterschiedlich konzentrierten IgG-Lösungen nachgewiesen wurde. Auch bei diesem System beschreibt eine Sättigungskurve den Zusammenhang zwischen

IgG-Angebot in der Lösung und der immobilisierten IgG-Menge auf den Protein G-Partikeln. Wurden IgG-Mengen von mehr als 800 pmol für die Funktionalisierung eingesetzt, entwickelte sich der Signalzuwachs parallel zur zunehmenden unspezifische Adsorption von IgG an die carboxylmodifizierten Kontroll-Partikel. Demnach wurde die spezifische Sättigung der Protein G Oberflächen durch Umsetzung von einem Milligramm Partikel mit etwa 800 pmol IgG erreicht. Im Vergleich mit der oben beschriebenen kovalenten Immobilisierung von IgG auf Partikel-Oberflächen, bei der die Sättigung der Oberfläche von einem Milligramm Partikel mit 300 pmol IgG erreicht wurde, war der Antikörper-Bedarf bei der gerichteten Immobilisierung demnach mehr als doppelt so hoch. Eine Abschätzung der Bindekapazitäten der IgG-modifizierten Partikel sollte zeigen, welche Kopplungsstrategie effizienter ist.

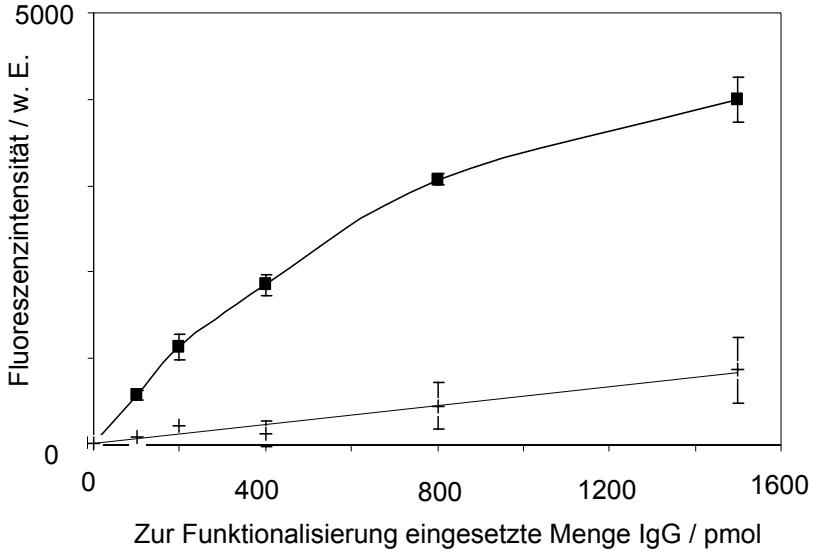

Abbildung 5-4

Auf der Oberfläche von 1 mg Nanopartikel nachweisbare Fluoreszenzmenge in Abhängigkeit von der IgG Konzentration, mit der die Partikel inkubiert wurden. Die obere Kurve (■) repräsentiert die Menge FITC-IgG, die an Protein G-modifizierte Partikel gebundenen hat. Die untere Kurve (+) repräsentiert die Menge FITC-IgG, die unspezifisch an COOH-Partikel adsorbierte.

5.1.3 Vergleich von ungerichteter und gerichteter IgG-Immobilisierung

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern erfolgte zunächst eine *indirekte* Abschätzung der Antigen-Bindekapazitäten IgG-modifizierter Partikel, da die verwendeten Modellsysteme keine spezifische Affinität gegen ein bestimmtes Antigen besaßen. Zur Abschätzung der Bindekapazität von *kovalent* IgG-modifizierten Partikeln wurden die Partikel mit fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern inkubiert, die an den Fc-Teil der partikel-gebundenen IgG-Moleküle binden: Die Bindekapazität der Partikel für den sekundären Antikörper

wurde bestimmt, indem die Fluoreszenzsignale der angebundenen Detektionsantikörper auf den Partikel-Oberflächen mit Signalen von Antikörper-Lösungen definierter Konzentrationen verglichen wurden. Die Antigen-Bindekapazität wurde dann aus der Bindekapazität für sekundäre Antikörper abgeleitet indem angenommen wurde, dass bei zufälliger Orientierung der Fänger-Antikörper auf der Partikeloberfläche im Mittel immer ein Molekül-Ende für die Bindung des spezifischen Wechselwirkungspartners frei zugänglich ist. Weil IgG-Antikörper an zwei Molekül-Enden Antigen-Bindestellen aufweisen, während die Erkennungsstellen für den sekundären Antikörper am dritten Molekül-Ende lokalisiert sind, wurde die Antigen-Bindekapazität der IgG-Partikel doppelt so groß geschätzt wie ihre Bindekapazität für sekundäre Antikörper.

Die Antigen-Bindekapazität von Nanopartikeln, auf denen die Fänger-Antikörper über Protein G immobilisiert waren, wurde anhand der Belegung der Protein G-Partikel mit Antikörper abgeschätzt: Es wurde angenommen, dass aufgrund der definierten Ausrichtung der Antikörper pro IgG-Molekül auf der Partikel-Oberfläche zwei Antigen-Bindestellen verfügbar sind.

Durchführung

Carboxypartikel wurden nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll kovalent mit Kaninchen-IgG funktionalisiert (300 pmol pro Milligramm Partikel). Als Negativkontrolle wurden Carboxypartikel auf die gleiche Weise mit Ziege-IgG umgesetzt. Die Partikel wurden mit 288 pmol Cy3-markiertem Anti-Kaninchen Antikörper pro Milligramm Partikel inkubiert. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert und gewaschen. Es wurde die Fluoreszenzintensität in den Überständen und auf den Partikeln bestimmt und mit den Fluoreszenzsignalen bekannter Mengen der Anti-Kaninchen IgG verglichen.

Zur Abschätzung der IgG-Bindekapazität von Protein G-modifizierten Partikeln wurden die Fluoreszenzsignale der in Abschnitt 5.1.2 verwendeten Partikel mit Signalen von definierten Mengen der verwendeten Detektionsantikörper in Lösung verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Aus den Graphen in Abbildung 5-5 lassen sich die Bindekapazitäten IgG-modifizierter und Protein G-modifizierter Nanopartikel für fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper ablesen. Mittels der Kalibriergeraden in Abbildung 5-5 **A** wurde bestimmt, dass nach Inkubation der Kaninchen-IgG Partikel mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Kaninchen Antikörper 104 ± 22 pmol Detektionsantikörper auf den Oberflächen von einem Milligramm Kaninchen-IgG Partikel angebunden waren. Gemäß der oben beschriebenen Modellvorstellung, nach der jedes dritte IgG-Molekül auf der Partikeloberfläche von einem Detektionsantikörper erkannt wurde, folgte, dass bei EDC-vermittelter Kopplung auf der Oberfläche von einem Milligramm Partikel zwischen

246 pmol und 378 pmol Fängerantikörper angebunden wurden. Da 300 pmol zur Funktionalisierung eingesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die in der Reaktionsmischung angebotenen IgG-Moleküle vollständig auf den Partikeloberflächen immobilisiert wurden. Die Kontrollpartikel, die mit Ziege-IgG funktionalisiert worden waren, zeigten keine Affinität zu dem Anti-Kaninchen Detektionsantikörper.

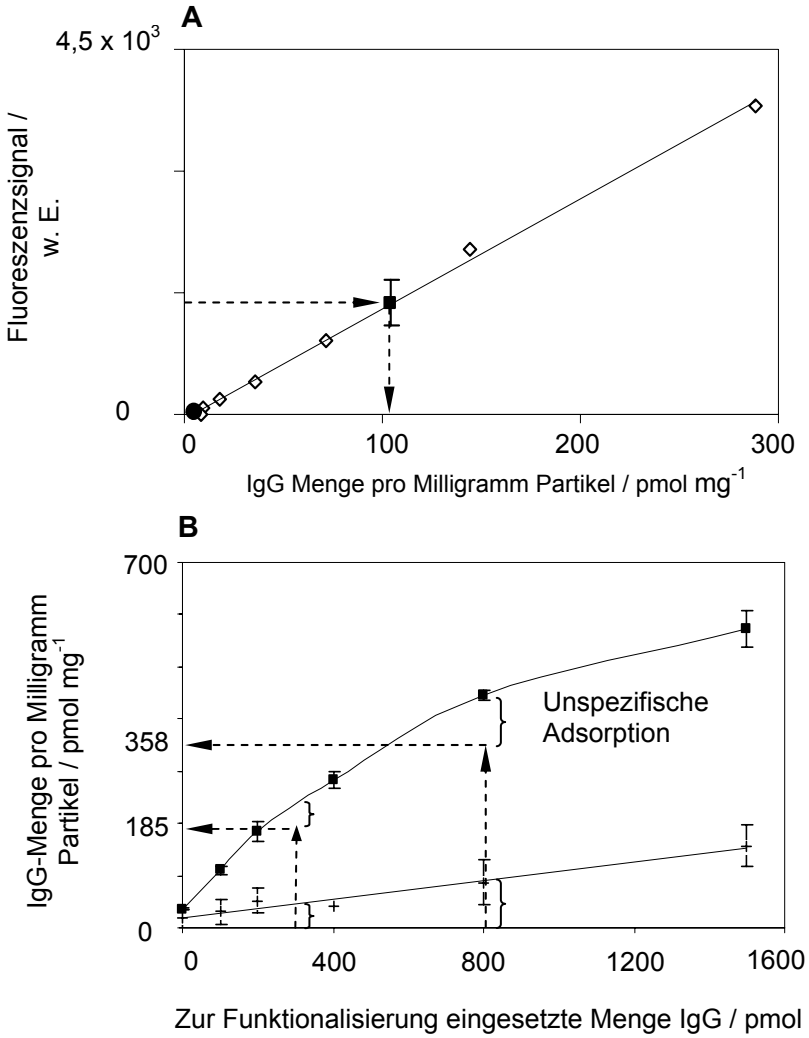

Abbildung 5-5

Graphen zur Quantifizierung der Anbindung von fluoreszenzmarkierten Detektions-Antikörpern an IgG-Partikel **(A)** und an Protein G Partikel **(B)**. **A** Kalibriergerade zur Bestimmung der Anti-Kaninchen IgG-Bindekapazität von einem Milligramm Kaninchen-IgG modifizierter Partikel. ◊ Fluoreszenzsignale einer Verdünnungsreihe von Cy3-markierten Anti-Kaninchen IgG, ■ Fluoreszenzsignal von 1 mg Kaninchen-IgG Partikel nach Inkubation mit Cy3-markierten Anti-Kaninchen IgG, ● Fluoreszenzsignal auf Ziege-IgG Partikeln (Negativkontrolle). **B** Graph aus Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**. Die Skala der Ordinate gibt hier jedoch die pro Milligramm Partikel gebundene Menge fluoreszenzmarkierter Antikörper an. Die Umrechnung der Fluoreszenzsignale in Stoffmenge erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus FITC-IgG Lösung erstellt wurde. ■ FITC-IgG auf Protein G-Partikeln in Abhängigkeit von der IgG-Konzentration, mit der die Partikel inkubiert wurden, + FITC-IgG Menge auf carboxylmodifizierten Partikeln (Negativkontrolle).

Abbildung 5-5 **B** zeigt den Zusammenhang zwischen der IgG-Menge, die zur Funktionalisierung von Protein G-Partikeln verwendet wurde und der erzielten Antikörper-Belegung der Partikel. Die in Kapitel 5.1.2 ermittelten Fluoreszenzsignale der partikelgebundenen Antikörper wurden hierfür mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen von Antikörperlösungen bekannter Konzentration in Stoffmenge umgerechnet.

Nach Abzug der unspezifischen Adsorption ergab sich für Protein G-modifizierte Partikel, die mit 800 pmol mL^{-1} Antikörperlösung umgesetzt worden waren, eine Antikörper-Belegung von 358 ± 8 pmol pro Milligramm Partikel.

Aus den Ergebnissen ließ sich im Rahmen der Experimentiergenauigkeit ableiten, dass die Bindekapazität von einem Milligramm Nanopartikel unabhängig von der Kopplungsstrategie auf etwa 350 pmol IgG-Antikörper begrenzt war. Dies weist auf eine sterische Limitierung der Anbindung hin. Ein Milligramm Partikel mit einem Durchmesser von 120 nm besitzt eine Oberfläche von $24{,}4 \times 10^{12}$ nm^2. Mittels geometrischer Überlegungen ergibt sich daraus, dass bei einer Belegung von 350 pmol IgG pro Milligramm Partikel jedes IgG Molekül im Mittel eine Fläche von 115 nm^2 einnahm. Dies entspricht einer Belegungsdichte von $8{,}2 \times 10^{11}$ Molekülen cm^{-2}. In der Literatur werden für die Immobilisierung von Fab-Fragmenten auf planaren Substraten Belegungsdichten von 6×10^{11} bis $1{,}2 \times 10^{12}$ Molekülen cm^{-2} genannt [105]. Der Vergleich bestätigt die Interpretation, dass sowohl nach der kovalenten Anbindung als auch nach der Immobilisierung über Protein G die Partikel-Oberflächen dicht mit IgG-Molekülen belegt waren.

Aus den Daten lassen sich nach den oben beschriebenen Modellvorstellungen folgende Antigen-Bindekapazitäten abschätzen: Ein Milligramm Partikel mit zufällig orientierten IgG-Molekülen könnte 208 ± 44 pmol Antigen binden und ein Milligramm Partikel mit gerichtet angebundenen IgG-Molekülen auf Protein G-modifizierten Oberflächen könnte 720 pmol Antigenbinden, falls zwei Antigen-Bindestellen pro Antikörper zugänglich sind. Bei dieser Rechnung ist zu beachten, dass für die maximal erreichte Belegung der Protein G-Partikel 800 pmol IgG eingesetzt wurden. Für die Sättigung der Partikel-Oberflächen mit ungerichtet gebundenen Antikörpern wurden hingegen nur 300 pmol IgG umgesetzt. Da Antikörper mit spezifischen Affinitäten limitiert und teuer sind, macht es Sinn abzuschätzen, ob die gerichtete Antikörper-Immobilisierung über Protein G auch dann einen Vorteil bringt, wenn zur Partikelfunktionalisierung dieselbe Antikörper-Menge eingesetzt wird wie für die Herstellung kovalent funktionalisierter Partikel. Anhand der Daten, die in Abbildung 5-5 **A** dargestellt sind, ließ sich ermitteln, dass bei einer Umsetzung von 300 pmol IgG pro Milligramm Protein G-Partikel etwa 185 pmol IgG spezifisch an die Partikel-Oberflächen ankoppelten. Daraus ließ sich eine theoretische Antigen-Bindekapazität von 370 pmol pro Milligramm Partikel ableiten. Demnach ist zu erwarten, dass die gerichtete IgG-

Immobilisierung auf Protein G-Partikeln die Antigen-Bindekapazität von Antikörper-Partikeln etwa um den Faktor 1,8 steigern kann.

5.1.4 Zetapotenzial proteinmodifizierter Nanopartikel-Oberflächen

In Tabelle 5-1 sind die Zetapotenziale von Silica-Nanopartikeln mit unterschiedlichen organischen Schalen in verschiedenen Suspensionsmedien aufgeführt. Die Oberflächenladungen der modifizierten Silica-Partikel waren pH-Wert abhängig. Dies lässt sich auf die Anwesenheit von Carboxy-und Aminogruppen auf den Partikel-Oberflächen zurückführen, deren Protonierungsgrad die Nettoladung der Partikel beeinflusst. Bei proteinfunktionalisierten Partikeln war die Oberflächenladung dementsprechend vom isoelektrischen Punkt (pI) der Proteine und vom pH-Wert der Suspensionen abhängig. Alle verwendeten proteinmodifizierten Partikel waren bei neutralem pH negativ geladen. Trehaloselösung erwies sich als geeignetes Suspensionmedium, wenn Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln auf Oberflächen abgeschieden wurden, weil die Trehalose nach dem Abtrocknen des Wassers die native Konformation der partikel-gebundenen Proteine stabilisierte (siehe Kapitel 5.5, Seite 77). Die Zetapotenzialmessungen zeigten, dass proteinbeschichtete Partikel auch in 5 % iger Trehaloselösung (Gewicht/Volumen) eine negative Oberflächenladung besaßen.

Tabelle 5-1

Typische Zetapotenziale von Carboxy-und Aminopartikeln sowie von proteinbeschichteten Silicapartikeln in PP70, Ac47 und 5 %iger Trehaloselösung. Alle Angaben sind in mV. N gibt die Anzahl der vermessenen Ansätze an.

Partikelfunktionalisierung	**pI**	**pH 7**	**pH 4,7**	**Trehaloselösung (5 %)**
Streptavidin	5,5 – 6,2 [80]	- 23,6 ± 1,5 (N=4)	-9,9 ± 0,9 (N=3)	-27,4 ± 7,8 (N=2)
Protein G	4,5 [106]	- 27,1 ± 5,6 (N=2)	-18,1 (N=1)	-46,0 ± 2,7 (N=1)
Kaninchen-IgG		- 40 ±1		-34,5 ± 6,6 (N=3)
Ziege-IgG		- 36 ±1		-26,7 ± 6,3 (N=3)
	pK_a	**pH 7**	**pH 4,7**	
Unmodifizierte Silicapartikel		-30 ± 16	-13 ± 5 (N=26)	
NH_2/NH_3^+	~ 9 [82]	-15 ± 7	45 ± 7 (N=30)	
COOH/ COO-	~ 3,8 [107]	- 46 ± 18	-27 ± 6 (N=18)	

Das negative Zetapotenzial von aminofunktionalisierten Partikeln bei neutralem pH wurde darauf zurückgeführt, dass die negativen Ladungen der SiO^--Oberfläche durch die Amino-funktionalisierung nicht vollständig ausgeglichen wurden [72]. Aus dem gleichen Grund könnten die auf Carboxy-Oberflächen immobilisierten Streptavidin- und Protein G-Hüllen bei pH 4,7 eine negative Nettoladung aufweisen, obwohl die partikelgebundenen Proteine ihrem pI entsprechend mehr positive als negative Ladungen tragen müssten.

5.2 Mikrostrukturierte Schichten aus proteinbeschichteten Nanopartikeln

Die negative Oberflächenladung von biofunktionalisierten Silicapartikeln wurde ausgenutzt um die Partikel aufgrund von Physisorption aus der Suspension auf einer positiv geladenen Oberfläche abzuscheiden. Es wurden zwei Strukturierungsmethoden untersucht, um Nanopartikelschichten mit einer definierten lateralen Struktur herzustellen. Indirekt strukturierte Nanopartikelschichten sollten dadurch erzeugt werden, dass die Substrat-Oberfläche mit mikrostrukturierten Polyelektrolyt (PE)-Schichten modifiziert werden, an die im Kontakt mit Partikelsuspension eine selektive Partikeladsorption stattfinden kann. Für die direkte Strukturierung von Nanopartikel-schichten sollte Partikelsuspension mit Hilfe eines Microarrayers selektiv auf ein durchgehend adsorbierendes Substrat gedruckt werden.

5.2.1 Partikeladsorption an mikrostrukturierte Polyelektrolytschichten

Oberflächen von Glas- oder Silizium-Substraten sind nach der Vorbehandlung in NH_3/H_2O_2-Lösung temporär stark negativ geladen (siehe Kapitel 4.4.1, Seite 32). Um die Oberflächen dauerhaft und kontrolliert mit elektrischen Ladungen auszustatten, wurden die Substrate mittels *Layer-by-Layer* Technik mit ultradünnen Polyelektrolytschichten beschichtet. Diese Schichten sollten durch Bestrahlung mit UV-Licht teilweise abgetragen werden um vorstrukturierte Oberflächen für die selektive Partikeladsorbtion zu erzeugen. Für die Beschichtung wurden größtenteils Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) und Polyacrylsäure (PAA) verwendet. PAH und PAA sind schwache Polyelektrolyte, deren Ladungsdichte vom Protonierungsgrad der funktionellen Gruppen $-NH_2/-NH_3^+$ und $COO^-/COOH$ entlang der Polymerkette abhängt. Für einzelne Versuche wurde auch das starke Polykation Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) eingesetzt, welches unabhängig vom pH Wert in jeder Monomereinheit eine positive Ladung trägt [70]. Zur Charakterisierung des Einflusses von energiereichem UV-Licht auf PAH-PAA-Filme wurde mittels Null-Ellipsometrie die Zeitabhängigkeit der Ablation verfolgt. Außerdem wurde die chemische Zusammensetzung von PAH-PAA-beschichteten Oberflächen vor und nach UV-Bestrahlung mittels Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (ESCA) untersucht. Mikrostrukturierte Polyelektrolytschichten wurden erzeugt, indem die UV-Bestrahlung der

Schichten unter Verwendung einer mikrostrukturierten Maske erfolgte. Es wurden unterschiedlich beschichtete Substrate mit Nanopartikelsuspensionen inkubiert um die Partikeladsorption an verschiedene Oberflächen zu bewerten.

Durchführung

Siliziumträger wurden standardmäßig gereinigt und hydroxyliert und bei pH 8,5 mit Schichten aus PAH und PAA oder mit PDADMAC belegt. Die Ablationskurven wurden an unstrukturierten Einfach-, Doppel- und Dreifach-Schichten aus PAH und PAA aufgenommen. ESCA Messungen wurden an einem Siliziumträger durchgeführt, der mit einer Dreifachschicht aus PAH und PAA belegt worden war. Nach der Messung wurde die Polyelektrolyt-Schicht 90 min mit UV-Licht bestrahlt und direkt anschließend erneut vermessen. Als Referenz diente eine gereinigte Siliziumoxid-Oberfläche. Siliziumträger mit strukturierter Polyelektrolyt-Oberfläche wurden für zehn Minuten mit einem Tropfen wässriger Partikelsuspension belegt, anschließend gründlich mit Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Ergebnisse und Diskussion

Substratbeschichtung

In Abbildung 5-6 sind die Schichtdicken von PAH-PAA-Schichten nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mit UV-Licht aufgetragen. Die Ablationskurven zeigen, dass die Schichtdicken unter dem Einfluss der UV-Strahlung abnahmen. Dies weist darauf hin, dass durch die energiereiche Strahlung Bindungen innerhalb der Polymerketten aufgebrochen wurden und Polymerbruchstücke von der Oberfläche verdampften. Die Schichtdicke der PAH-PAA-PAH-Schicht war nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten auf 2,5 Å, also auf weniger als 10 % der ursprünglichen Schichtdicke abgesunken und tendierte für lange Bestrahlungszeiten gegen Null. Einfach- und Doppelschichten erreichten nach 20 Minuten etwa denselben mittleren unteren Grenzwert. Die Einfachschicht degradierte langsamer als die Mehrfachschichten und auch bei den Mehrfachschichten verlangsamte sich der Materialabtrag mit abnehmender Schichtdicke. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass für die Desorption von Molekülfragmenten mit Substratkontakt aufgrund vielfacher Wechselwirkungen zwischen Substrat und Polymerkette mehr Energie erforderlich war als für die Desorption von Fragmenten, die aus dem Polymernetz herausgelöst wurden. Die Ellipsometrie-Daten zeigten, dass PE-Dreifachschichten durch 90 minütige UV-Bestrahlungen fast vollständig von den Oberflächen abgetragen werden konnten.

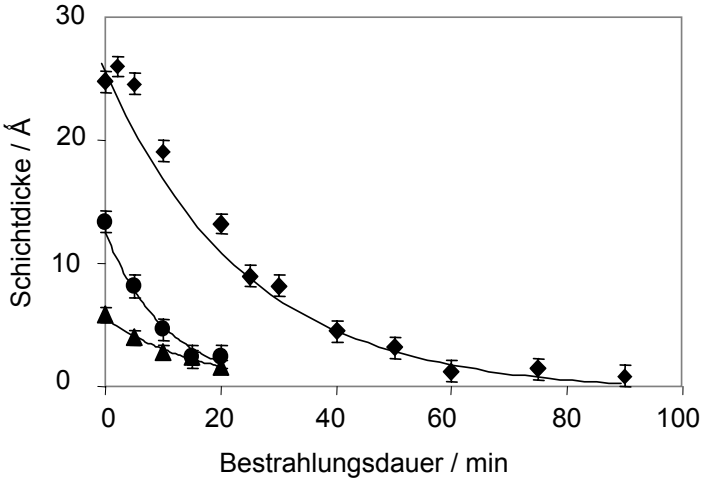

Abbildung 5-6

Schichtdickenabnahme von PAH-PAA-Schichten auf Silizium aufgrund von Photoablation durch UV-Strahlung. Die Schichtdicken wurden mittels Null-Ellipsometrie bestimmt und sind in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer aufgetragen. ♦ PAH-PAA-PAH-Schicht, ● PAH-PAA-Doppelschicht, ▲ PAH-Einfachschicht.

In Tabelle 5-2 sind die Ergebnisse einer quantitativen Auswertung der Signale aus der Oberflächenanalyse mittels ESCA zusammengefasst. Die ESCA an einer gereinigten Siliziumfläche lieferte ein Signal, das sich zu 54 % aus dem Signal des metallischen Siliziums des Substrats und außerdem hauptsächlich aus den Signalen von oxidiertem Silizium und Sauerstoff zusammensetzte. Dazu wurden geringe Mengen Kohlenstoff gemessen, der seinen Bindungsenergien zufolge in aliphatischen Kohlenstoffketten (285,6 eV) oder in C–O beziehungsweise C–N Gruppen (287,1 eV) gebunden war [108]. Der detektierte Stickstoff stammte seiner niedrigen Bindungsenergie zufolge allerdings aus anorganischen Siliziumnitrid-verbindungen.

Durch die Beschichtung mit PAH und PAA erhöhte sich erwartungsgemäß der Anteil aliphatischer Kohlenstoffketten sowie der Kohlenstoff in C–O und C–N Bindungen am Signal. Hinzu kamen Signale von Kohlenstoff in einer Doppelbindung mit Sauerstoff (289,8 eV), die auf das Vorhandensein der Carboxylgruppen der Polyacrylsäure hinwiesen. Zusätzliche Stickstoffsignale von Stickstoffatomen in Amino-Verbindungen (400,7 eV) und in geladenen Ammonium-Verbindungen (402,6 eV) wurden den Polyallylaminschichten zugeordnet. Der prozentuale Anteil von Silizium, Siliziumoxid und Sauerstoff am Gesamtsignal war nach der Beschichtung erwartungsgemäß geringer als davor [109].

Tabelle 5-2

Elementzusammensetzung von Siliziumoberflächen nach Reinigung und Hydroxylierung (Referenz), nach Beschichtung mit einer Dreifachlage aus Polyallylamin und Polyacrylsäure und nach UV-Ablation der Polyelektrolytschicht.

Element	**C**	**C**	**C**	**C**	**O**	**N**	**N**	**N**	**Si**	**Si**
Bindungsenergie [eV]	**289,8**	**288,6**	**287,1**	**285,6**	**gesamt**	**402,6**	**400,7**	**398,3**	**ox**	**met**
	Zusammensetzung in Atom-%									
Referenz	Spuren		0,8	3,1	30,0			0,7	11	54
PAH-PAA-PAH	1,0	2,9	6,2	24,1	24,2	2,3	1,9	0,4	7,4	29,7
PAH-PAA-PAH nach UV-Ablation	0,4	0,4	2,6	5,6	35,5	0,5	0,3	0,8	12,9	41,2

Nach UV-Ablation der Polyelektrolyt-Schicht war der Anteil von Kohlenstoffverbindungen und Stickstoff wiederum stark verringert und der Silizium-Anteil am Gesamtsignal entsprechend gestiegen. Dies bestätigte die bereits aus den Ellipsometrie-Daten ersichtliche Verringerung der Polymerschichtdicken durch die UV-Bestrahlung. Allerdings wurden die an der gereinigten Siliziumoxidoberfläche gemessenen Werte nicht vollständig reproduziert. Der Anteil an aliphatischem Kohlenstoff blieb erhöht wie auch der Anteil sauerstoffgebundenen Kohlenstoffs. Auch das Siliziumoxid-Signal und das Sauerstoff-Signal waren stärker als an der Referenzoberfläche. Dies weist darauf hin, dass die UV-Bestrahlung eine Oxidation der Oberfläche bewirkte. Im Hinblick auf die Adsorption negativ geladener Partikel war von besonderem Interesse, ob nach der UV-Ablation der PE-Schichten positiv geladene Gruppen auf der Oberfläche zurückblieben. Die ESCA Messung ergab, dass der Anteil ionischer Ammoniumverbindungen weitgehend aber nicht vollständig reduziert wurde. Im Weiteren ging jedoch aus den Adsorptions-Versuchen hervor, dass negativ geladene Partikel nicht an die UV-degradierten Bereiche adsorbierten.

Partikeladsorption

An den intakten Bereichen von Polyelektrolyt-Schichten, die eine PAH-Oberfläche aufwiesen, bildete sich eine gleichmäßige Schicht aus negativ geladenen Partikeln aus. In Abbildung 5-7 zeigen REM Aufnahmen (A bis F) scharf voneinander getrennte adsorbierende und nicht-adsorbierende Bereiche auf einer Silizium-Oberflächen, die mit einer mikrostrukturierten PAH-Schicht modifiziert worden waren.

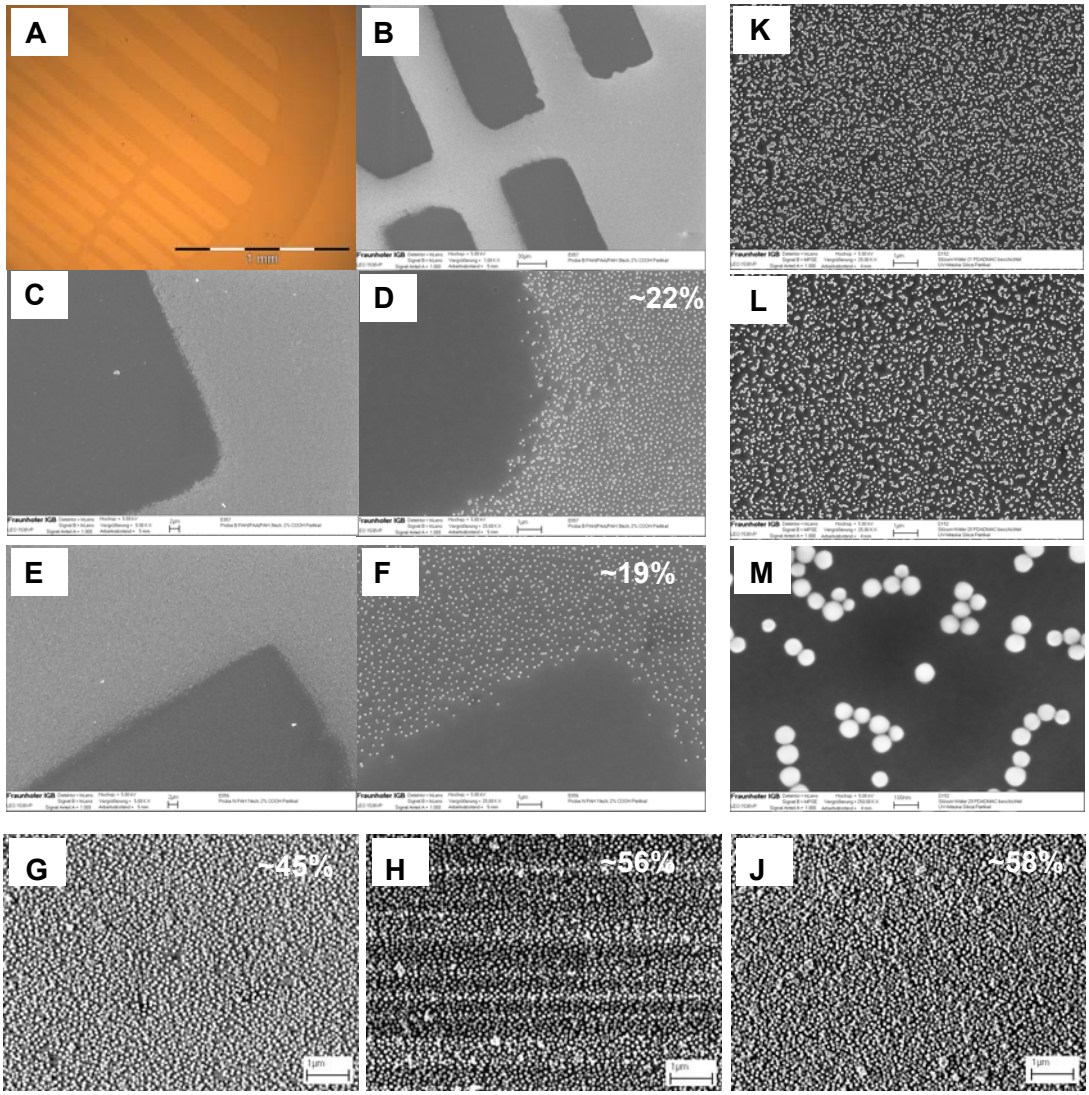

Abbildung 5-7

A – F Mikrostrukturierte Nanopartikelschicht auf Siliziumträgern. Carboxylmodifizierte Partikel wurden aus wässriger Suspension mit einem Feststoffgehalt von 1 mg mL^{-1} auf mikrostrukturierte Polyelektrolytschichten abgeschieden. Die Partikel adsorbierten selektiv an den intakten PAH-Schichten, während sie an den UV-degradierten Bereichen nicht hafteten. **A – D** Carboxylmodifizierte Partikel auf mikrostrukturierter PAH-PAA Dreifachschicht. Lichtmikroskopische Aufnahme (500x) und elektronenmikroskopische Aufnahmen (1 000x, 5 000x, 25 000x). Belegung: ~22 %. **E – F** Carboxylmodifizierte Partikel auf PAH-Einfachschicht (5 000x, 25 000x). Belegung: ~19 %. **G – J** Belegungsdichte nach Immersion der Polyelektrolytoberfläche in Partikel-Suspensionen mit unterschiedlichen Feststoffgehalten. **G** Feststoffgehalt: 1 mg mL^{-1}, Belegung: ~45 %, **H** Feststoffgehalt: 5 mg mL^{-1}, Belegung: ~56 %, **J** Feststoffgehalt: 10 mg mL^{-1}, Belegung: ~58 %. Die verwendeten Substratoberflächen waren hier mit dem starken Polykation Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) beschichtet, welches in jeder Monomereinheit eine positive Ladung trägt. Die Belegungsdichten waren daher insgesamt höher als auf den PAH-PAA Schichten. **K** PDADMAC-beschichtete Siliziumoberfläche nach einmaliger Immersion in Partikelsuspension, **L** nach zweimaliger Immersion in Partikelsuspension (25 000x), **M** Partikelcluster nach Abtrocknen der Oberfläche (250 000x).

Die Dichte der abgeschiedenen Partikelschichten war unter anderem abhängig vom Schichtaufbau der PE-Schicht. Auf PAH-Einfachschichten wurde eine Belegungsdichte von 19 % erreicht, an einer PAH-PAA-PAH Dreifachschicht eine Belegungsdichte von 22 %.

Die Adsorption der Partikel lässt sich in erster Näherung als zufälliger, sequentieller Prozess beschreiben (*Random Sequential Adsorption RSA*) [110]. Nach diesem Modell können Partikel in Oberflächennähe an die Oberfläche adsorbieren, wenn dort eine offene Adsorptionsstelle zur Verfügung steht. Andernfalls verlassen sie den oberflächennahen Bereich wieder und bleiben in Suspension. Dieser Prozess läuft solange, bis die Oberfläche mit Partikeln gesättigt ist und keine offenen Adsorptionsstellen mehr verfügbar sind.

Das Modell berücksichtigt für die Absättigung nur die sterische Hinderung durch bereits adsorbierte Partikel. Für diesen Fall beträgt die maximal erreichbare Oberflächenbelegung 54,7 % [110]. Da die Immersion der untersuchten PAH- und PAH-PAA-PAH-beschichteten Oberflächen in derselben Suspension und über die gleiche Zeitdauer erfolgte, kann die unterschiedliche Belegungsdichte auf ein unterschiedliches Angebot an Adsorptionsstellen zurückgeführt werden. Es ist belegt, dass während des Schichtaufbaus mittels *LbL*-Technik an „raue“ Polyionen-Oberflächen, welche eine Vielzahl Schlaufen und lose Enden aufweisen, mehr Polymer adsorbiert als an ebene Polyionen-Schichten aus eher gestreckten Polymerketten oder an eine ebene Substrat-Oberfläche [85]. Bei der Adsorption der ersten PAH-Einzelschicht auf die Substrat-Oberfläche wurde daher möglicherweise eine geringere Menge Polykationen abgeschieden als im nächsten Adsorptionszyklus an das bereits aufgebaute Polymernetzwerk der PAH-PAA-Doppelschicht. Eine Zunahme der Einzelschichtdicken bei der Abscheidung von Mehrfachlagen konnte auch mittels Null-Ellipsometrie direkt verfolgt werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend war die Menge positiver Ladung auf der Oberfläche nach Aufbringen der dritten Polykation-Schicht möglicherweise größer als nach dem Aufbringen der ersten Schicht und es bestand eine höhere Dichte potentieller Adsorptionsstellen.

Die Partikeldichte auf der Oberfläche war auch größer, wenn die Partikel in zwei Schritten abgeschieden wurden, wobei die Oberfläche nach der ersten Immersion in Wasser gewaschen und mit Stickstoff getrocknet wurde (Abbildung 5-7, K bis L). Dies könnte auf eine Neuordnung der Partikel während des Trocknungsprozesses auf der Substratoberfläche zurückzuführen sein. Sofern die abgeschiedenen Partikel ausreichend nahe beisammen lagen, entstanden beim Abtrocknen des Wassers zwischen benachbarten Partikeln Kapillarkräfte. Diese werden wirksam, wenn der Flüssigkeitsfilm die Partikel-Oberflächen nur noch teilweise bedeckt und sich zwischen den Partikeln Flüssigkeitsmenisken ausbilden [111]. Diese Kapillarkräfte sind stärker als die elektrostatischen Kräfte zwischen Substrat und Partikeln, so dass die Partikel sich auf der Oberfläche bewegen und zu kleinen Clustern zusammenschließen [70]. Die Clusterbildung war

auf den getrockneten Oberflächen zu erkennen (Abbildung 5-7, M). Durch die Neuordnung der Partikel auf der Oberfläche wurden Adsorptionsstellen frei, die vorher besetzt waren und die im zweiten Immersionsschritt wiederbesetzt werden konnten.

Es wurde weiterhin beobachtet, dass durch Steigerung des Feststoffsgehalts der Suspension von 1mg mL^{-1} auf 5 mg mL^{-1} und 10 mg mL^{-1} höhere Belegungsdichten erreicht wurden (Abbildung 5-7, G bis J). Da die Partikeladsorption an die geladenen Oberflächen ebenso wie die Abscheidung der Polyelektrolytketten entropisch stark begünstigt ist, ist die Anbindung nahezu irreversibel. Die Anbindung der Partikel auf der Oberfläche ist daher kein Gleichgewichtsprozess. Es stellt sich demnach kein Gleichgewicht zwischen der Konzentration adsorbierter und suspendierter Partikel ein. Die erreichbare Belegungsdichte ist also nicht abhängig von der Partikelkonzentration der Suspension, sondern von der verfügbaren Menge Partikel und der Anzahl der Adsorptionsstellen auf der Oberfläche. Die höhere Belegungsdichte nach Immersion in Suspensionen mit erhöhtem Feststoffgehalt kann daher als Massentransport-Phänomen betrachtet werden: Bei hoher Partikelkonzentration gelangten pro Zeiteinheit mehr Partikel in die Reichweite elektrostatischer Wechselwirkung mit dem Substrat, so dass die Belegung der Oberfläche nach der gleichen Zeit dichter war als bei geringer Partikelkonzentration.

Der Einfluss des Feststoffgehalts auf die Belegungsdichte und die Auswirkung wiederholter Immersion wurden an Substraten untersucht, die mit dem starken Polykation PDADMAC beschichtet waren. Aufgrund der höheren Ladungsdichte entlang der Polymerketten war die Anzahl der Adsorptionsstellen insgesamt größer und die Belegungsdichten waren höher als auf PAH-Schichten bei neutralem pH. Die Belegungsdichte, die nach Inkubation mit Suspension eines Feststoffgehalts von 10 mg mL^{-1} bestimmt wurde, betrug etwa 58 %. Der Vorhersage des *RSA*-Modells zufolge war damit die maximale Belegung erreicht, die durch einfache sequentielle Adsorption von Partikeln an eine Oberfläche erzielt werden kann.

Funktionelle Partikel konnten demnach ortselektiv aus einer Suspension auf vorstrukturierten Polyelektrolyt-Schichten abgeschieden werden. Die Dichte der Partikelbelegung war abhängig von der Ladungsdichte entlang der Polyelektrolyt-Ketten sowie von der Nanotopologie der Polyelektrolyt-Beschichtung. Sie konnte außerdem über die Konzentration der Partikel in der Suspension und durch Änderung der Anzahl von Mehrfachaufbringungen kontrolliert werden.

5.2.2 Das Drucken von Microarrays

Mit Hilfe eines Nadel-Ring Spotters wurde Nanopartikelsuspension auf Polyelektrolyt-beschichtete Substrate aufgedruckt um direkt mikrostrukturierte Nanopartikelschichten zu erzeugen. Durch das Eintauchen eines Rings in Partikelsuspension bildete sich im Ring ein Flüssigkeitsfilm aus. Durch diesen wurde eine Nadel hindurch gestochen, die anschließend die

Substrat-Oberfläche berührte. Pro Nadel-Substrat Kontakt (*hpd*) wurden etwa 50 pL Suspension auf die Oberfläche übertragen [94].

Ergebnisse und Diskussion

Mit dem Nadel-Ring Druckverfahren entstanden beim Übertrag von Nanopartikelsuspension auf Polyelektrolyt-beschichtete Substrate kreisrunde Spots [112]. Abbildung 5-8 zeigt licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nanopartikelspots sowie dreidimensionale Rekonstruktionen der Spots auf der Grundlage von Untersuchungen mittels Rasterkraft-mikroskopie (AFM). Der Spotdurchmesser betrug unabhängig vom Feststoffgehalt der Partikelsuspension 159 ± 12 µm (N = 86, N Anzahl der vermessenen Spots). Die Untersuchungen der Partikelspots mittels AFM und REM zeigten, dass die pro Spot auf die Oberfläche übertragene Partikelmenge vom Feststoffgehalt der verwendeten Partikel-Suspension abhängig war. Mit fünf Nadel-Substrat Kontakten wurden 250 pL Suspension pro Spot auf die Substrat-Oberfläche übertragen. Bei Verwendung von Partikelsuspension mit einem Feststoff-gehalt von 20 mg mL^{-1} waren dies rechnerisch 5 ng Partikel pro Spot. Dies entspricht $2{,}8 \times 10^{6}$ Partikeln pro Spot, wenn für die Partikelkerne ein Radius von 60×10^{-9} m und eine Dichte von 2×10^{9} mg m^{-3} zugrunde gelegt wird. Die geometrische Oberfläche der Partikel ist in diesem Fall 6,2 fach größer als die belegte Spot-Grundfläche. Wird Suspension mit höherem Feststoffgehalt gedruckt, erhöhen sich der Partikelübertrag und die theoretisch verfügbare Oberfläche entsprechend.

$$n = \frac{Feststoffgehalt(mg/mL) \cdot Spotvolumen(mL)}{Dichte(mg/m^3) \cdot Partikelvolumen(m^3)} \qquad \textbf{Gleichung 5-1}$$

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 5-8 zeigen, dass bei Verwendung von Suspension mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} Monolagen und mehrlagige Cluster aus Partikeln entstanden, wobei die Spotfläche nicht dicht mit Partikeln belegt war. Dieses Ergebnis wurde durch AFM-Untersuchungen bestätigt, die eine Partikelschichtdicke von 100 nm bis 300 nm ergaben. Suspensionen mit 160 mg mL^{-1} Feststoffgehalt resultierten in der Ausbildung ebener Zwei- bis Dreifachschichten.

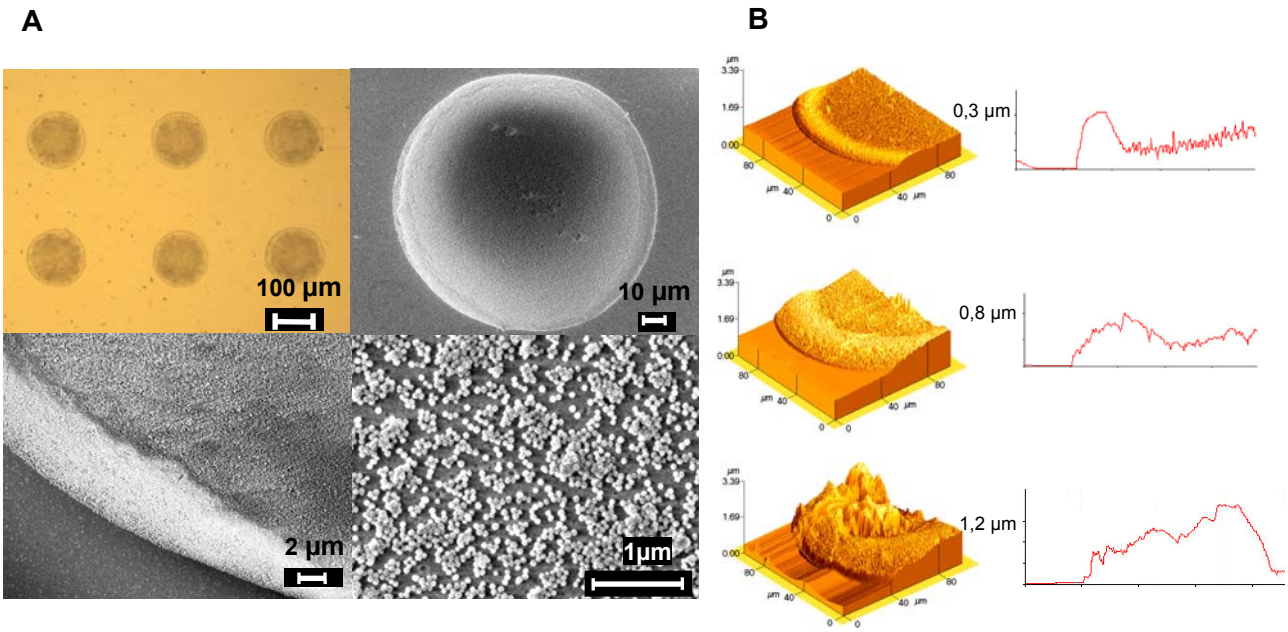

Abbildung 5-8

A Lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme von sechs Nanopartikelspots auf einem Glassubstrat (25x) und rasterelektronenmiskroskopische Aufnahmen eines typischen Nanopartikelspots, gedruckt aus Suspension mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} (1 600x, 5 000x, 25 000x). **B** AFM-Bilder und Höhenprofile von Nanopartikelspots, die mit unterschiedlichem Feststoffgehalt gedruckt wurden. Oben: 20 mg mL^{-1}, Mitte 160 mg mL^{-1}, unten: 320 mg mL^{-1}. Die Ordinaten der Höhenprofile sind unterschiedlich skaliert.

An den Rändern der Spots bildete sich jeweils ein Ring aus Partikelmehrfachlagen aus. Dieser Effekt hängt mit der Veränderung der Tropfenform zusammen, die resultieren kann, wenn sich durch Verdampfen der Flüssigkeit das Tropfenvolumen verkleinert [111, 113]. In idealen Dreiphasensystemen aus einer Flüssigkeit, einer homogenen, ebenen Festkörper-Oberfläche und einer Gasphase ist der messbare makrokopische Kontaktwinkel ϑ zwischen Flüssigkeits-oberfläche und Festkörperoberfläche nur abhängig von den Oberflächenspannungen γ_s und γ_L der Fest *(S)*- und der Flüssigphase *(L)* und der Grenzflächenspannung der Fest-Flüssig-Grenzfläche γ_{SL} (Abbildung 5-9). Der Zusammenhang wird durch die Young-Gleichung beschrieben (Gleichung 5-2).

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cdot \cos\vartheta$$ **Gleichung 5-2**

Der Kontaktwinkel ϑ ist eine Materialkonstante. Er ändert sich nicht, wenn sich das Tropfenvolumen ändert. Auf ebenen Festkörper-Oberflächen bleibt die Form des Tropfens bei Vergrößerung oder Verkleinerung des Tropfenvolumens daher konstant, während sich die benetzte Grundfläche vergrößert oder verkleinert. Auf rauen Oberflächen ist jedoch der mikroskopische Kontaktwinkel relevant: Der Kontaktwinkel bildet sich zwischen der flüssigen Phase und der lokalen Festphasenoberfläche aus, die in einer anderen Richtung verlaufen kann als die makroskopische Oberfläche. Dies führt häufig dazu, dass makroskopisch bei Veränderung des Tropfenvolumens keine Verschiebung der Kontaktlinie zu beobachten ist und stattdessen eine Verkleinerung oder Vergrößerung des makroskopischen Kontaktwinkels [114].

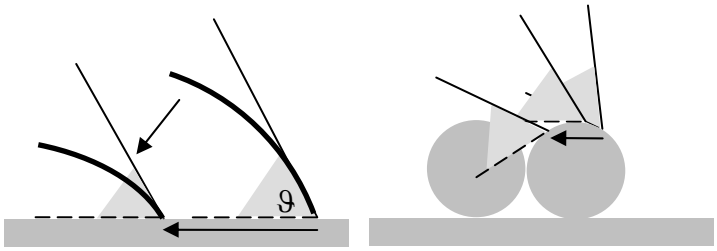

Abbildung 5-9

Skizze zur Veranschaulichung des Zusammenhangs von makroskopischem und mikroskopischem Kontaktwinkel auf ebenen Festkörper-Oberflächen und Grenzflächen mit mikroskopischen Unebenheiten. Links: Schrumpfung des Tropfenvolumens bei konstantem Rückzugswinkel auf ebener Festkörper-grenzfläche. Rechts: Änderung des makroskopischen Kontaktwinkels bei konstantem mikroskopischen Kontaktwinkel auf unebener Oberfläche.

Im beschriebenen Druckprozess wird beim Absetzen von Partikelsuspension augenblicklich eine raue, partikelbelegte Oberfläche erzeugt, da die Nadel in direkten Kontakt mit dem Substrat tritt und die physikalische Adsorption der Partikel ein sehr rascher Prozess ist, bei dem keine Aktivierungsenergie aufgebracht werden muss. Ändert sich anschließend das Tropfenvolumen durch Verdunsten des Suspensionsmediums, wandert die Kontaktlinie über die Partikel-Oberfläche. Wo die Phasengrenze auf einem Partikel liegt, bewirken die Grenzflächenenergien, die den mikroskopischen Kontaktwinkel konstant halten, dass der Tropfen bei konstanter Grundfläche steiler oder flacher wird, anstatt unter Beibehalten seiner Form zu wachsen oder zu schrumpfen. Dies erklärt einerseits, dass der Spot-Durchmesser nicht von der Anzahl der abgesetzten Suspensionströpfchen abhängt. Wenn andererseits bei der Evaporation des Wassers der Tropfen zunächst abflacht, während die Grundfläche konstant bleibt, muss ein Fluss bestehen, der beständig Wasser aus dem Tropfenzentrum an die Kontaktlinie nachliefert. Dieser Fluss wird durch Kapillarkräfte angetrieben, die wirksam werden, wenn die Flüssigkeitsoberfläche absinkt und sich zwischen den Partikeln Flüssigkeitsmenisken ausbilden. Suspendierte Partikel können der radialen Konvektion folgen und bilden einen wachsenden Wall an der

Tropfenperipherie. Der Prozess kommt zum Stillstand wenn die Flüssigkeitsoberfläche unter die Höhe der Partikelschichten abgesunken ist [111]. In Suspensionen höherer Viskosität trat der Effekt in abgeschwächter Form auf (siehe Kapitel 5.5, S. 77), was dem Modell zufolge auf verminderte Fließgeschwindigkeit des Suspensionsmediums und verminderte Beweglichkeit der Partikel zurückzuführen sein kann. War der Feststoffgehalt der Suspension sehr hoch, bildeten sich Partikelhaufen auf der Oberfläche aus. Die Kapillarkräfte wurden dann überall dort wirksam, wo Partikeloberflächen nur noch von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt waren. Wie die AFM-Aufnahme eines Spots aus 320 mg mL^{-1} Suspension in Abbildung 5-8 **B** zeigt, fand in diesem Fall auch keine geordnete Ausbildung eines ringförmigen Partikelwalls statt.

Die direkte Strukturierungstechnik ermöglicht es im Gegensatz zur ortsselektiven Abscheidung von Partikeln aus einer Suspension, sowohl parallel als auch sequentiell unterschiedlich funktionalisierte Nanopartikel auf ein Substrat zu übertragen. Im Folgenden wurde deshalb das Nadel-Ring Druckverfahren zur Erzeugung mikrostrukturierter Partikelschichten eingesetzt.

5.2.3 Stabilität adsorbierter Nanopartikel-Multilagen

Beim Trocknen von Suspensionströpfchen auf dem Substrat ist die Ausbildung von Partikelschichten nicht abhängig von verfügbaren Bindungsstellen, sondern von der Menge übertragener Partikel. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, entstanden beim Drucken von Microspots in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt der verwendeten Suspensionen verschieden hohe Partikelhaufen. Versuche zur Haftung solcher Strukturen sollten zeigen, ob die Substratbeschichtung einen Einfluss auf die Stabilität von Partikel-Monolagen ausübte und ob Partikel-Multilagen den Standard-Waschprozeduren stabil standhielten.

Durchführung

Um den Einfluss der Substratbeschichtung auf die Stabilität von Partikel-Schichten zu beurteilen, wurden unter Verwendung von Suspension mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} Monolagen aus Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln auf Substrate gedruckt, welche entweder mit einer PAH-Einfachschicht oder mit $(PAH\text{-}PAA)_2$ PAH-, $(PAH\text{-}PAA)_5$ PAH- oder $(PAH\text{-}PAA)_{10}$ PAH-Schichten belegt waren. Zum Vergleich wurden außerdem kommerziell erhältliche Glasobjektträger mit positiv geladener Oberfläche bedruckt. Die fertigen Chips wurden in einer Lösung aus biotinyliertem Alexa 647-markiertem Cytochrom C (bA647CytC) inkubiert. Nach den standardmäßigen Waschschritten wurden die Chips getrocknet und als Maß für die vorhandene Partikelmenge pro Spot wurde die Fluoreszenz des markierten Cytochroms detektiert, welches auf den Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikel-Spots angebunden hatte.

Außerdem wurden die negativ geladenen Streptavidin-Partikel auf ebenfalls negativ geladenen, mit PAH-PAA-Doppelschichten belegten Siliziumsubstraten eingetrocknet, um den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen auf die Stabilität der Partikelbeschichtung zu untersuchen. Die entstandene Partikelschicht wurde durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentiert. Anschließend wurde die Schicht in Wasser gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und abermals mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Um die Stabilität von Nanopartikel-*Multi*lagen im Kontakt mit wässrigen Medien zu untersuchen, wurden Suspensionen IgG-beschichteter Nanopartikel mit Feststoffgehalten von 20 mg mL^{-1}, 40 mg mL^{-1}, 80 mg mL^{-1}, 160 mg mL^{-1} und 320 mg mL^{-1} auf PAH-beschichtete Substrat-Oberflächen gedruckt. Die Spots wurden anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. Anschließend wurden die Oberflächen je eine Stunde in PBS/Tr, PBS und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nach der Waschprozedur wurde der Zustand der Partikelschichten mit dem Elektronenmikroskop kontrolliert.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Quantifizierung der Menge stabil gebundener Streptavidin-Partikel auf unterschiedlich beschichteten Oberflächen diente die Analytbindekapazität der Streptavidin-Partikel Spots. Wie im Säulendiagramm in Abbildung 5-10 dargestellt, ergaben sich aus den vergleichenden Versuchen zur Stabilität von Streptavidin-Partikelschichten auf unterschiedlichen, positiv geladenen Substrat-Oberflächen nur geringfügige Unterschiede. Die konstante Signalintensität auf allen Substraten mit positiv geladener Oberfläche zeigte, dass es für die Herstellung stabiler Microarray-Oberflächen aus mikrostrukturierten Nanopartikel-Schichten ausreichte, die Chip-Oberflächen standardmäßig mit einer einfachen Polykationschicht auszurüsten.

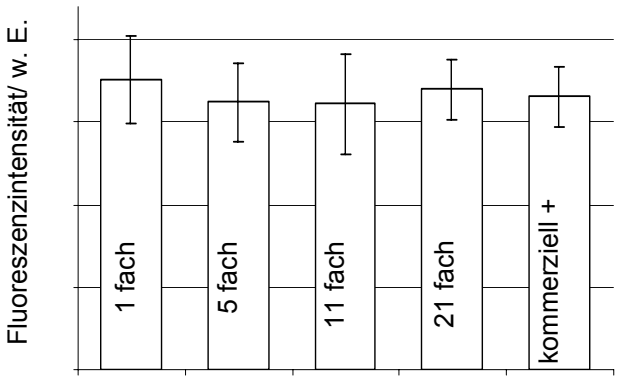

Abbildung 5-10

Einfluss der Substratbeschichtung auf die Spotstabilität. Die Fluoreszenzsignale der Analytmoleküle, die an Streptavidin-Partikel Spots auf unterschiedlich beschichteten Substratoberflächen angebundenen haben, dienten als Maß für die Menge stabil adsorbierter Streptavidin-Partikel. Jede Säule stellt den Mittelwert der Signalintensitäten aus 108 Spots von insgesamt 9 Chips dar (N=108/9).

Negativ geladene Streptavidin-Partikel, die auf einer ebenfalls negativ geladenen PAA-beschichteten Oberfläche eingetrocknet wurden, bildeten keine homogenen Schichten aus, sondern lagerten sich zu Clustern zusammen, wie die REM-Aufnahmen in Abbildung 5-11 **A** zeigen. Aufgrund der Potenzialbarriere auf der gleichsinnig geladenen Substrat-Oberfläche war es vermutlich energetisch günstiger, dass die Partikel in Suspension verblieben solange Wasser auf der Oberfläche vorhanden war, sodass in dem schrumpfenden Flüssigkeitsvolumen eine Aufkonzentrierung der Partikel stattfand. Obwohl die Partikel eine negative Nettoladung besaßen, lag bei neutralem pH sicher ein Teil der Aminogruppen des partikelgebundenen Streptavidins auch in protonierter Form vor. Diese positiv geladenen Gruppen könnten lokale Potenzialsenken darstellen, die zu attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Partikeln führten. Dies könnte erklären, dass die Partikel oberhalb einer bestimmten Konzentration verklumpten und stabile Cluster bildeten. Bei Immersion der Schichten in Wasser lösten sich nur kleine Teile der Schichten von der Oberfläche ab. Offenbar waren an der Bindung der Partikel an die Oberfläche auch attraktive Wechselwirkungen beteiligt, die entgegen der repulsiven elektrostatischen Kraft verhinderten, dass alle Partikel bei Rehydrierung der Oberfläche in Suspension gingen. In unmittelbare Nähe zur Oberfläche könnten attraktive van der Waals-Kräfte wirksam sein. Außerdem können die Carboxylgruppen der PAA-Polymerschicht je nach Protonierungsgrad sowohl als Donor wie auch als Akzeptor für Wasserstoffbrücken fungieren [93]. Diese könnten sich zwischen den Proteinen auf der Partikel-Oberfläche und der PE-Schicht auf dem Substrat ausgebildet haben und so die Partikel auf der Substratoberfläche stabilisieren. Zusätzlich sind zwischen hydrophoben Bereichen der partikelgebundenen Proteine und der hydrophoben Kohlenwasserstoff-Hauptkette des PAA möglicherweise wasserausschließende Bereiche entstanden, die einer Abwaschung der Partikelschicht von der Oberfläche entgegenwirkten.

Die Ausbildung von Partikelclustern aus negativ geladenen Streptavidin-Partikel auf kationischer Oberfläche und deren Stabilität gegen Waschen in Wasser hat gezeigt, dass die Partikel aufgrund der fehlenden attraktiven elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Partikeln und Substratoberfläche zwar keine homogenen Partikelschichten ausbildeten. Verschiedene Wechselwirkungen stabilisierten jedoch die Partikellagen und die Verankerung protein-beschichteter Partikel auf polyelektrolytbeschichteten Oberflächen.

Diese Stabilisierung innerhalb von Partikel-Mehrfachlagen wurde auch an Spots beobachtet, die unter Verwendung hochkonzentrierter Partikelsuspensionen gedruckt wurden. Wie aus den AFM-Untersuchungen in Abschnitt 5.2.2 ersichtlich wurde, entstanden beim Drucken von Suspensionen mit Feststoffgehalten von mehr als 160 mg mL^{-1} Partikel-Mehrfachschichten zunehmender Dicke. Die Stabilität der Partikel-Multilagen wurde anhand von REM-Aufnahmen untersucht.

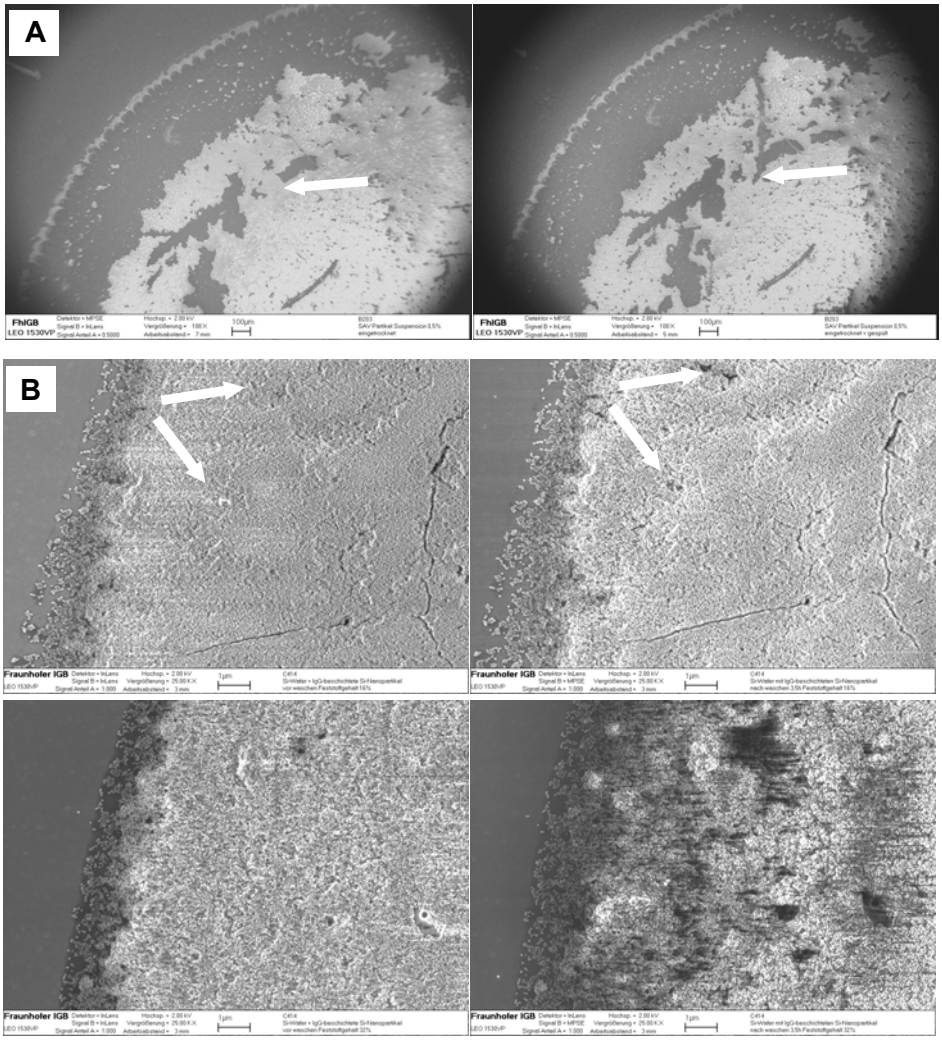

Abbildung 5-11

Einfluss der Substratbeschichtung auf die Spotstabilität. **A** REM Aufnahmen (100x) von getrockneter Streptavidin-Partikel Suspension auf negativ geladener PAA-beschichteter Siliziumoberfläche. Links: nach dem Eintrocknen der Suspension, rechts: nach Inkubation der Oberfläche in Puffer und Wasser. **B** REM-Aufnahmen (25 000x) von IgG-Partikel Spots aus 160 mg mL^{-1} Suspension (oben) und 320 mg mL^{-1} Suspension (unten). Links: Nach Eintrocknen der Suspension, rechts: nach Inkubation der Chips in PBS/Tr PBS und Wasser. Die Pfeile markieren Stellen, an denen sich Partikel von der Oberfläche gelöst haben.

Abbildung 5-11 **B** zeigt REM-Aufnahmen von Partikelspots aus Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} und 320 mg mL^{-1} vor und nach dem Standard Inkubations- und Waschprozess. Die Spots aus 160 mg mL^{-1} Suspension widerstanden Waschprozeduren in PBS/Tr, PBS und Wasser stabil. Spots aus Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von 320 mg mL^{-1} hingegen erodierten während der Waschprozedur. Wie aus den dreidimensionalen Rekonstruktionen der Spotmorphologie aus AFM-Daten ersichtlich (Abbildung 5-8), besaßen Spots aus 320 mg mL^{-1} Suspension eine stark aufgeworfene Oberfläche. Spots aus Suspension

mit 160 mg mL^{-1} Feststoffgehalt hatten dagegen eine näherungsweise ebene Oberfläche. Da die Waschlösungen während der Inkubation bewegt wurden, traten an den Chip-Oberflächen möglicherweise Scherkräfte auf und die Partikelhaufen wurden durch die mechanische Belastung während des Waschprozesses teilweise abgetragen.

Mikrostrukturierte Nanopartikelschichten hafteten stabil auf Glasobjektträgern, die mit einer Polyelektrolyt-Einfachschicht präpariert waren. Eine attraktive elektrostatische Wechselwirkung zwischen Substratoberfläche und Partikeln begünstigte eine gleichmäßige Partikeladsorption. Die Stabilität von Partikelschichten, die durch Verdampfen des Suspensionsmediums auf der Polyelektrolyt-beschichteten Oberfläche abgeschieden wurden, war jedoch auf das Zusammenwirken verschiedener Wechselwirkungen zurückzuführen. Dreidimensionale Microspots aus Nanopartikeln waren in Waschprozessen stabil, wenn sie eine ebene Oberfläche besaßen. Zur Erzeugung derartiger Strukturen eignete sich Partikelsuspension mit einem Feststoffgehalt von maximal 160 mg mL^{-1}.

5.3 Maximierung der Bindekapazität von Microspots aus biofunktionellen Nanopartikeln

Die große geometrische Oberfläche von dreidimensionalen Microspots aus Nanopartikeln erlaubte es, eine große Menge Fängermoleküle auf der Spot-Grundfläche zu integrieren. Es war jedoch nicht klar, in welchem Maße diese Affinitätsoberfläche für Analytmoleküle aus der Probe real zugänglich ist. Zur Bestimmung der maximal erreichbaren Bindekapazitätssteigerung bei der Herstellung von Microarrays aus Nanopartikelsuspension wurden Microspots aus Partikelsuspensionen mit steigendem Feststoffgehalt gedruckt. Die Affinitätsoberflächen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Analyt in Lösung inkubiert und die Signaldichten der Spots unterschiedlicher Fängerdichte wurden miteinander verglichen [112].

Zur Bestimmung der absoluten Bindekapazitäten von Microspots mit unterschiedlichen Partikeldichten wurden außerdem definierte Mengen des fluoreszenzmarkierten Analyts mit Partikelsuspension gemischt. Diese Kalibrierstandards aus Partikelsuspension und einer bekannten Menge des fluoreszenzmarkierten Analyts wurden auf Chipoberflächen gedruckt und mit dem Fluoreszenzscanner ausgelesen. Aus dem Vergleich der Fluoreszenzsignale dieser Kalibrierspots mit Signalen von Nanopartikel-Microarrays nach Inkubation in konzentrierter Analytlösung wurde auf die Analytbindekapazität der Nanopartikelspots geschlossen.

Durchführung

Suspensionen aus Streptavidin-Partikeln in 5 %iger Trehaloselösung mit den Feststoffgehalten 10 mg mL^{-1}, 20 mg mL^{-1}, 40 mg mL^{-1}, 80 mg mL^{-1}, 160 mg mL^{-1}, 320 mg mL^{-1} und 500 mg mL^{-1}

wurden auf PAH-beschichtete Glasslides gedruckt. Nach dem Blockieren wurden die Biochip-Oberflächen eine Stunde mit einer 1,5 nM Lösung des biotinylierten, Alexa647-markierten Cytochrom C (bA647CytC) in PBS inkubiert, standardmäßig gewaschen, getrocknet und gescannt.

Als Kalibrierstandards zur quantitativen Bestimmung der Bindekapazität von Microspots aus Streptavidin-Nanopartikeln wurden bA647CytC-Konzentrationsreihen in Streptavidinpartikel-Suspensionen mit 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt hergestellt. Die Mischungen aus Partikeln und Analyt wurden 24 h in Suspension inkubiert. Anschließend wurden die Kalibrierstandards auf PAH-beschichtete Glasslides gedruckt. Die Analytkonzentrationen wurden so gewählt, dass in 250 pL (5 *hpd*) 0,028 fmol, 0,11 fmol, 0,44 fmol, 0,88 fmol und 1,75 fmol Analyt auf die Substratoberfläche übertragen wurden.

Die Signalintensitäten der Streptavidin-Partikel-Spots nach Inkubation in 5 nM bA647CytC-Lösung wurden mit den Signalen der Kalibrierspots verglichen, die mit der gleichen Belichtungszeit gescannt worden waren.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Inkubation von Microarrays aus Spots unterschiedlicher Partikeldichten mit fluoreszenzmarkiertem Analyt sind in Abbildung 5-12 zusammengefasst. Der Fluoreszenzscan eines Microarrays zeigt qualitativ, dass eine Steigerung der Partikeldichte in einer Steigerung der Signalintensität resultierte. Im Diagramm sind die mittleren Signalintensitäten der Microspots in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt der gedruckten Suspensionen aufgetragen. Kontrollmessungen an den Partikelspots *vor* der Inkubation mit Analytlösung zeigten, dass eine Eigenfluoreszenz der Partikelschichten bei den verwendeten Anregungs- und Detektionswellenlängen ausgeschlossen werden konnte. Die Signalintensität stieg proportional zum Feststoffgehalt der verwendeten Partikelsuspension an, bis ein Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} erreicht war. Durch Verwendung von Suspension mit 160 mg mL^{-1} Feststoffgehalt wurde eine weitere, aber schwächere Signalsteigerung erreicht. Der Einsatz von mehr als 160 mg mL^{-1} Feststoffgehalt erbrachte keine weitere Signalsteigerung.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Nanopartikel-Spots ergaben, dass sich beim Drucken von Partikelsuspension mit bis zu 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt keine geschlossenen Partikelschichten auf der Oberfläche ausbildeten, während sich bei Verwendung von 160 mg mL^{-1} Suspension eine dichte Partikelmehrfachlage ausbildete (Abbildung 5-12). Im ersten Fall war demnach die funktionelle Oberfläche zusätzlicher Partikel auf der Substratoberfläche frei zugänglich für Analytmoleküle und konnte zur Ausbildung des Gleichgewichts zwischen gebundenem und freiem Analyt beitragen. Im zweiten Fall waren im Wesentlichen nur die oberen

Partikelhemisphären zugänglich, so dass der Zuwachs an Partikeln auf der Oberfläche nicht dem Zuwachs an Affinitätsoberfläche entsprach. Über eine geschlossene Mehrfachlage hinaus aufgehäufte Partikel vergrößerten die verfügbare Oberfläche kaum. Wie die Ergebnisse in Kapitel 5.2.3 zeigten, waren hoch aufgehäufte Partikellagen außerdem nicht stabil und wurden während der Inkubation in wässrigen Lösungen teilweise von der Substrat-Oberfläche abgelöst. Die maximale Bindekapazität besaßen Microspots aus ebenen, dicht gepackten Nanopartikelschichten. Sie wurden durch Drucken von Suspension mit einem Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} erzeugt. Die geometrische Oberfläche dieser Spots war rechnerisch 54 fach größer als die belegte Spot-Grundfläche.

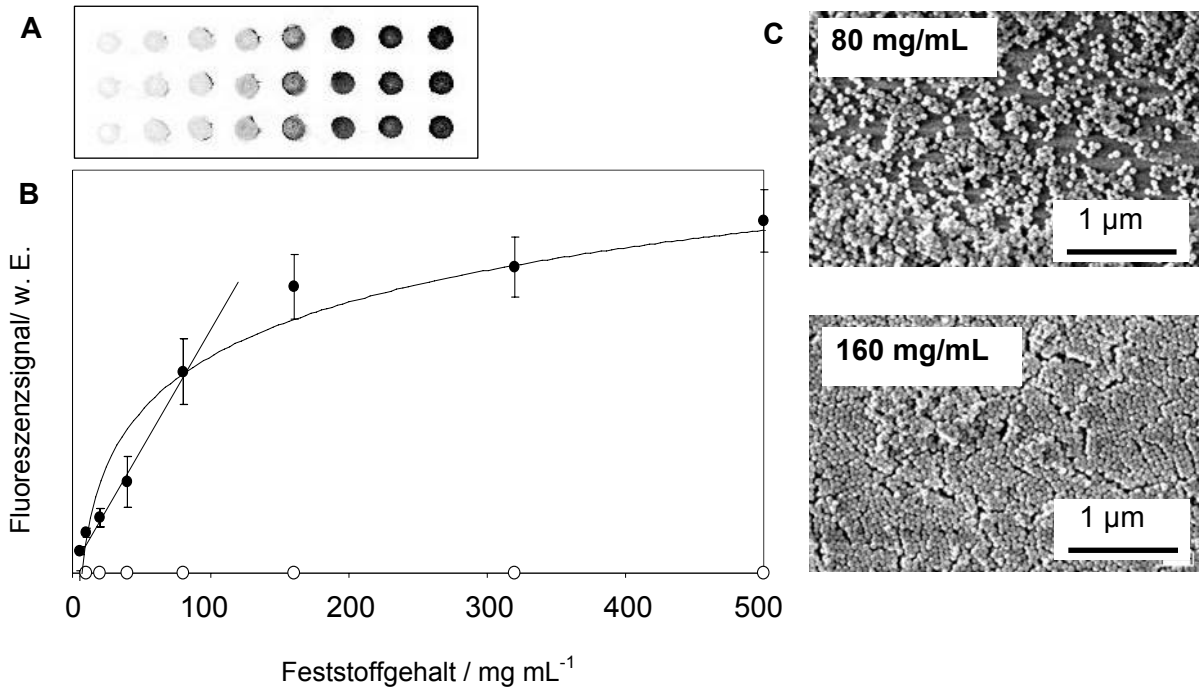

Abbildung 5-12

Analytbindung in Abhängigkeit von der Partikelmenge pro Spot. Es wurden Streptavidin-Partikel Suspensionen mit 10 mg mL^{-1}, 20 mg mL^{-1}, 40 mg mL^{-1}, 80 mg mL^{-1}, 160 mg mL^{-1}, 320 mg mL^{-1} und 500 mg mL^{-1} Feststoffgehalt gedruckt und mit bA647CytC inkubiert. **A** Fluoreszenzscan in Grauwert-Darstellung. **B** Fluoreszenzintensitäten der Microspots vor der Inkubation mit Analytlösung (○) und nach der Inkubation (●), aufgetragen in Abhängigkeit von der übertragenen Partikelmenge. **C** REM Aufnahmen der Partikel-Oberflächen von 80 mg mL^{-1} Spots und 160 mg mL^{-1} Spots.

Zur Bestimmung der Bindekapazität von Microspots aus Nanopartikeln mit Streptavidinhülle wurden die Fängerstellen auf den Nanopartikel-Oberflächen mit biotinyliertem, Alexa647-markiertem Cytochrom C (bA647CytC) abgesättigt. Der Vergleich der resultierenden

Signalintensitäten mit einem Kalibrierstandard ergab die in Tabelle 5-3 aufgeführten Bindekapazitäten für einzelne Streptavidin-Partikel Microspots. Die ermittelten Bindekapazitäten für bA647CytC betrugen $0{,}48 \pm 0{,}32$ fmol für Spots aus Suspension mit 20 mg mL^{-1} Feststoffgehalt, $2{,}23 \pm 0{,}4$ fmol für Spots aus Suspension mit 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt und $4{,}92 \pm 0{,}94$ fmol für Suspension mit 160 mg mL^{-1} Feststoffgehalt. Die Bindekapazität der Partikelspots vervielfachte sich im Rahmen der Messgenauigkeit proportional zum Feststoffgehalt der verwendeten Nanopartikelsuspensionen. Die Abweichungen lagen vermutlich in Schwankungen des Feststoffgehalts begründet, denn die Einstellung des Feststoffgehaltes in verschiedenen Ansätzen war aufgrund der wiederholten Inkubations- und Waschschritte während der Partikel-Funktionalisierung nicht exakt reproduzierbar. Die Ergebnisse bestätigten die Modellvorstellung, dass Fängerstellen auf den Partikel-Oberflächen in Schichten geringer bis mittlerer Partikeldichte für Analytmoleküle größtenteils frei zugänglich sind.

Tabelle 5-3

Bindekapazität von Microspots aus Streptavidin-modfizierten Nanopartikeln für biotinyliertes, fluoreszenzmarkiertes Cytochrom C. Die pro Spot gebundenen Mengen Analyt wurden bestimmt aus dem Vergleich der Fluoreszenzsignale der Streptavidin-Partikel Spots nach Inkubation mit Analytlösung und der Signael definierter Analytmengen, die in Nanopartikelsuspension gelöst und auf Chipoberflächen gespottet wurden.

	gebundener Analyt pro Spot
Streptavidin-Partikel Spots	
20 mg mL^{-1}	$0{,}48 \pm 0{,}32$ fmol
80 mg mL^{-1}	$2{,}23 \pm 0{,}40$ fmol
160 mg mL^{-1}	$4{,}92 \pm 0{,}94$ fmol

5.4 Modellierungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes

Um Nanopartikel-Microarrays anhand der ermittelten Bindekapazitäten bezüglich ihrer Eignung als massensensitive Tests einordnen zu können, wurden auf der Grundlage von Gleichung 4-11, Seite 42 Modellierungen angefertigt, die beschreiben, welchen Einfluss die Fängerkonzentration eines Assay auf die Menge der im Gleichgewicht gebundenen Analytmoleküle hat. Die Kurvenscharen in Abbildung 5-13 zeigen jeweils fünf fiktive Arrays mit unterschiedlichen Bindekapazitäten.

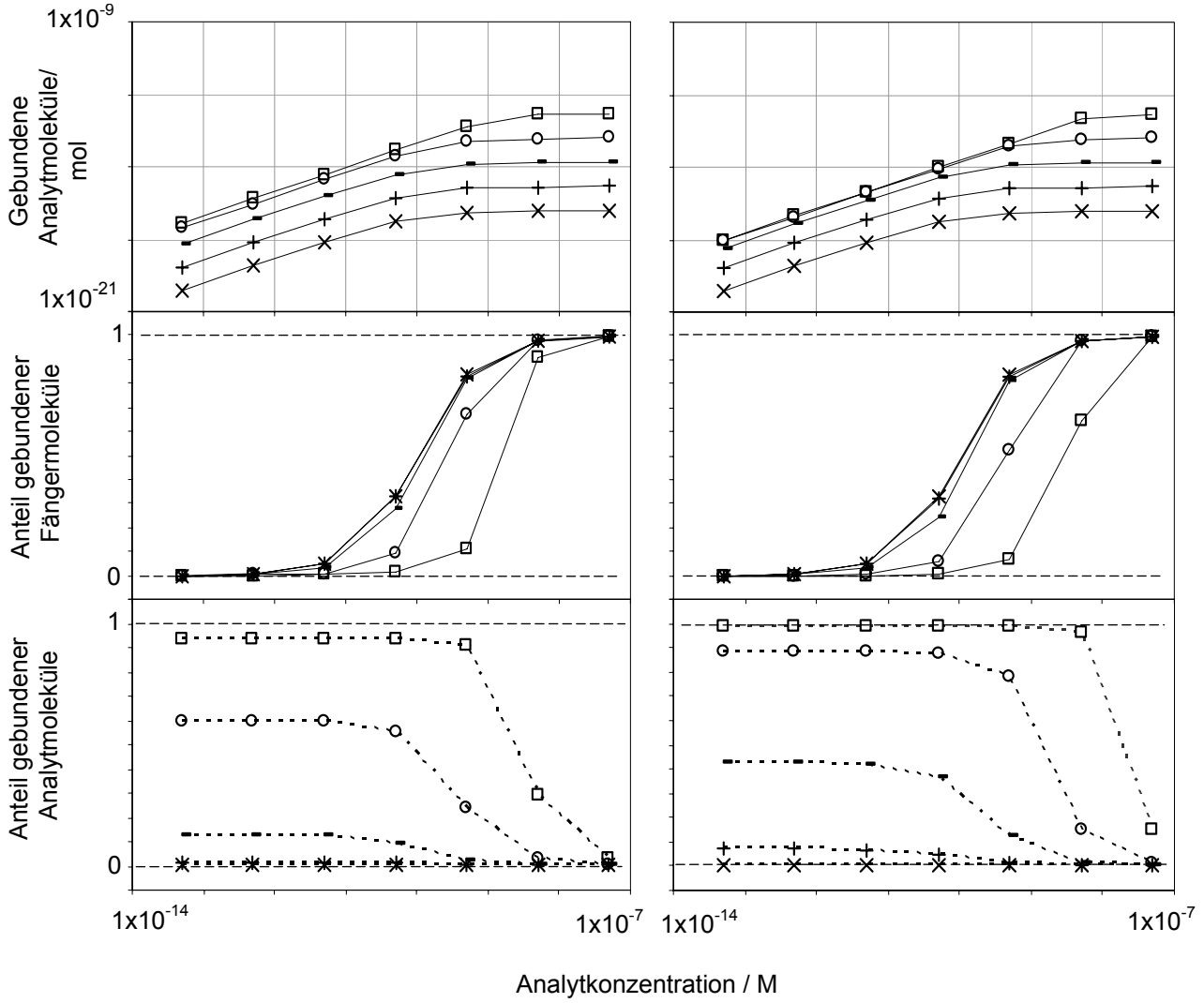

Abbildung 5-13

Modellierungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes unter Verwendung von Gleichung 4-11. In jedem Diagramm sind fünf Kurven dargestellt, die jeweils fünf Microarrays mit unterschiedlichen Bindekapazitäten repräsentieren. Für die Berechnungen wurden Analytbindekapazitäten von 0,005 fmol (×), 0,05 fmol (+), 0,5 fmol (-), 5 fmol (○) oder 50 fmol (□) pro Spot zugrunde gelegt und es wurde mit Arrays aus je drei Spots gerechnet. Daraus ergaben sich bei einem Probenvolumen von 100 µL Fängerkonzentrationen von 150 fM (×), 1,5 pM (+), 15 pM (-) und 150 pM (○)und 1,5 nM (□)(linke Spalte) und bei einem Probenvolumen von 20 µL Fängerkonzentrationen von 750 fM (×), 7,5 pM (+), 75 pM (-) und 750 pM (○)und 7,5 nM (□) (rechte Spalte). Für die Assoziationskonstante wurde $K_a = 10^{10}\ M^{-1}$ gewählt.Oben: Menge an gebundenem Analyt in Abhängigkeit von der Analytkonzentration für verschiedene Bindekapazitäten pro Spot, in doppeltlogarithmischem Maßstab aufgetragen. Mitte: Anteil der gebundenen Fänger bezogen auf die Gesamtkonzentration der Fängermoleküle in der Probe für verschiedene Bindekapazitäten pro Spot, aufgetragen in Abhängigkeit von der Analytkonzentration. Unten: Auf die Gesamtkonzentration der Analytmoleküle in der Probe bezogener Anteil der gebundenen Analytmoleküle für verschiedene Bindekapazitäten pro Spot, aufgetragen in Abhängigkeit von der Analytkonzentration.

In den sechs Diagrammen ist dargestellt welche Analytmenge die Arrays dem Massenwirkungsgesetz zufolge im Gleichgewicht immobilisieren können und welcher Anteil der vorhandenen Fänger- und Anlaytmoleküle dann gebunden vorliegt. Die Diagramme der linken

Spalte zeigen Berechnungen für 100 µL Probenvolumen, die Diagramme der rechten Spalte für 20 µL Probenvolumen. In den beiden oberen Diagrammen ist dargestellt, wie die Menge der im Gleichgewicht immobilisierten Analytmoleküle mit wachsender Bindekapazität der Microspots ansteigt. Für jede gegebene Analytkonzentration in der Probelösung verschiebt sich durch Erhöhen der Fängerkonzentration das Gleichgewicht zugunsten gebundener Analytmoleküle. Unter der Voraussetzung, dass die Steigerung der Fängerkonzentration durch Erhöhen der Fänger*dichte* erreicht wird, steigt mit der Fängerkonzentration also auch die zu erwartende Signaldichte bei gegebener Analytkonzentration. Dieser Effekt wurde an Nanopartikel-Spots beobachtet, wenn die Menge der pro Spot übertragenen Partikel erhöht wurde (Kapitel 5.3). Unter idealen Bedingungen lässt sich deshalb die Nachweisgrenze eines Assays zu kleineren Analytkonzentrationen hin absenken, wenn die Fängerkonzentration innerhalb der Microspots gesteigert wird. Gleichzeitig tritt die Sättigung der vorhandenen Fängerstellen bei umso höheren Analytkonzentrationen auf je größer die Bindekapazitäten der Microspots sind. Dies zeigt sich direkt in den Diagrammen der mittleren Reihe, wo für Arrays verschiedener Bindekapazitäten der Anteil besetzter Fängerstellen in Abhängigkeit von der Analytkonzentration aufgetragen ist. Auf der Grundlage dieser Modellierungen ist demnach zu erwarten, dass die Steigerung der Fängerkonzentration pro Spot sowohl die Absenkung der Nachweisgrenze bewirkt als auch insgesamt die Erweiterung des dynamischen Bereiches eines Messsystems.

Für die Modellierungen wurden Microspots mit den Bindekapazitäten 0,005 fmol, 0,05 fmol, 0,5 fmol, 5 fmol und 50 fmol gewählt, um den experimentell relevanten Bereich abzudecken [37, 40, 49]. Für Arrays aus drei Spots resultieren daraus bei einem Probenvolumen von 100 µL Fängerkonzentrationen von 150 fM bis 1,5 nM beziehungsweise von 750 fM bis 7,5 nM bei einem Probenvolumen von 20 µL. Bei einer Assoziationskonstanten $K_a = 10^{10}\ M^{-1}$ entspricht dies $\sim 0{,}0015 \cdot K_a^{-1}$ bis $15 \cdot K_a^{-1}$ beziehungsweise $\sim 0{,}0075 \cdot K_a^{-1}$ bis $75 \cdot K_a^{-1}$. Demnach erfüllt für beide Probenvolumina nur ein Array die in Kapitel 4.11.1 beschriebene *Ambient-Analyte* Bedingung einer Fängerkonzentration $< 0{,}01 K_a$. Dies lässt sich auch aus dem Vergleich der Kurvenverläufe in den unteren Diagrammen ablesen, wo nur ein Array unabhängig vom Probenvolumen keine Störung der Analytkonzentration hervorruft. Bei zehnfach größerer Bindekapazität liegt bei kleinen Analytkonzentrationen und einem Probenvolumen von 20 µL bereits mehr als 1 % der Analytmoleküle in Bindung vor, so dass die *Ambient-Analyte* Bedingung nicht mehr erfüllt ist.

Die Arrays mit den beiden höchsten Bindekapazitäten stellen so genannte massensensitive Assays dar. Mit einer Bindekapazität von 5 fmol bis 50 fmol pro Spot können bei ungehinderter Einstellung des Gleichgewichts aus einem Assayvolumen von 20 µL bei kleinen Analyt-konzentrationen nahezu 100 % der vorhandenen Analytmoleküle an die Affinitätsoberfläche gebunden werden. In den Diagrammen der oberen Reihe ist zu erkennen, dass bei kleinen

Probenvolumina und kleinen Analytkonzentrationen die absolute Menge Analytmoleküle in der Probe der limitierende Faktor bei der Einstellung des Gleichgewichts ist: Die Steigerung der Bindekapazität der Spots erbringt keine Steigerung der Menge gebundener Analytmoleküle, weil nahezu alle Analytmoleküle in Bindung vorliegen. Die Vergrößerung des Probenvolumens von 20 µL auf 100 µL hingegen vergrößert die verfügbare Menge Analytmoleküle und resultiert in einem Anstieg der im Gleichgewicht gebundenen Analytmoleküle. Ist die Analytkonzentration der limitierende Faktor bei der Signalerzeugung, so ist ein Test abhängig vom Probenvolumen und eine Vergrößerung des Volumens resultiert in einer Signalsteigerung – ein typisches Merkmal massensensitiver Microarrays.

Die Ergebnisse des vorigen Abschnitts haben gezeigt, dass Nanopartikel-Microarrays aus Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} bis 160 mg mL^{-1} mehr als 2 fmol Analyt pro Spot binden können. Aus dem Vergleich mit den obenstehenden Modellierungen geht hervor, dass Streptavidinpartikel-Microarrays bei Probenvolumina unterhalb 100 µL massensensitive Oberflächen darstellen könnten.

Die vorgestellten Modellierungen basieren auf dem Massenwirkungsgesetz und gelten explizit nur unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Gültigkeit von Vorhersagen auf der Grundlage dieser Annahme wird von Kusnezow *et al.* kritisch diskutiert [40]. Sie zeigten aufgrund von theoretischen Überlegungen zur Reaktionskinetik von Microspots wie auch experimentell, dass die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts in Microarray-Experimenten mit hochaffinen Fängerspezies bei Inkubationszeiten von ein bis zwei Stunden nicht erreicht wird. Es bedarf daher prinzipiell der Minimierung von Massentransport-Beschränkungen, um die theoretisch vorhergesagte Leistungsfähigkeit bei Microarray-Experimenten zu erreichen.

5.5 Erhalt der Protein-Funktion

Bei der funktionellen Wechselwirkung von Molekülen ist die Konformation der Moleküle von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere für Proteine, deren komplexe dreidimensionale Struktur Grundvoraussetzung für die Spezifität der Wechselwirkung mit anderen Molekülen ist. Bei der Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen können hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen mit der Oberfläche oder mechanische Spannungen bei Mehrfachkopplung einzelner Moleküle zu Konformationsänderungen der Proteine führen und damit zum Verlust der Proteinfunktion. In Versuchen mit Streptavidin, das auf Nanopartikel-Oberflächen immobilisiert war, behielt das Streptavidin seine Biotin-Bindefähigkeit, sofern die Partikel in wässriger Suspension eingesetzt wurden [115]. Bei der Herstellung von Microarrays unterliegt die Proteinstruktur zusätzlich einem Trockenstress. In natürlicher wässriger Umgebung wird die

native Proteinkonformation unter anderem durch die Ausbildung einer Hydrathülle stabilisiert, die polare Gruppen durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken abschirmt. Bei der Herstellung von Microarrays entstehen ultradünne Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln, aus welchen das Wasser in kurzer Zeit verdampft. Trockenstress führt häufig zur Denaturierung von Proteinen. Entsprechende Studien haben ergeben, dass Disaccharide - insbesondere das Disaccharid Trehalose - Proteinstrukturen im trockenen Zustand stabilisieren, indem sie an der Stelle von Wassermolekülen Wasserstoffbrücken mit dem Protein ausbilden [116],[11]. Diesen Untersuchungen zufolge erlangen Proteine bei Rehydrierung ihre Funktion wieder, wenn ihre native Struktur auch im Trockenzustand erhalten geblieben ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt Trehalose auf den Erhalt der Funktionalität partikelgebundener Proteine hat, wenn die Partikel in trockenen Schichten auf Oberflächen immobilisiert werden.

Durchführung

20 mg mL^{-1} Streptavidin-Partikel wurden in 0,1 %iger bis 10 % iger Trehalose-Lösung in Wasser, Phospat-Puffer, PBS und SSC-Puffer suspendiert und im Microarray-Format auf PAH-beschichtete Glassubstrate gedruckt. Die fertigen Chips wurden fünf Tage im Exsikkator gelagert und anschließend nach Standardprotokoll blockiert und in 280 pM bA647CytC in PBS inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-14 **A** zeigt einen Fluoreszenzscan sowie die mittleren Fluoreszenzintensitäten pro Spot für Streptavidin-Nanopartikel-Arrays, die in den angegebenen Suspensionsmedien gedruckt wurden. Die Fluoreszenzintesität diente als Maß für die spezifische Analytanbindung und damit für den Erhalt der nativen Struktur des partikelgebundenen Fängerproteins Streptavidin. Das Spottingmedium beeinflusste sowohl die Funktionalität des Proteins als auch die Verteilung der Partikel auf der Substratoberfläche. Die höchste Fluoreszenzintensintensität wurde mit Nanopartikelsuspension in 5 % igerTrehaloselösung in Wasser erzielt. Trehalosekonzentrationen in Wasser von weniger als 1 % resultierten in einer lokalen Stabilisierung der Proteinfunktion innerhalb der ringförmigen Partikelanhäufungen am Rand der Spots. Dies deutet darauf hin, dass außer den Partikeln auch die Trehalose im Randbereich der Spots aufkonzentriert worden war. Dieser Effekt ist erklärbar durch einen radialen, zum Spot-Rand hin gerichteten Wasserfluss während der Evaporation des Wassers [117]. REM Untersuchungen der Spotstruktur ergaben, dass die Ringbildung unterblieb, wenn Partikelsuspension mit hohem Trehalose Gehalt gespottet wurde (Abbildung 5-14 **B**, Mitte). Die Ursache hierfür kann die erhöhte Viskosität der konzentrierten Zuckerlösung sein, welche die Partikel- und die Molekülbeweglichkeit einschränkte und so die homogene Verteilung in der Suspension auf der Oberfläche konservierte. Die

Partikelschichten, die in 10 % iger Trehaloselösung auf die Substratoberfläche aufgebracht wurden, hafteten allerdings weniger stabil an der Oberfläche und neigten dazu auszuwaschen. Dieser Effekt zeigte sich am auffälligsten, wenn die Partikel in rein wässriger Trehaloselösung gespottet wurden.

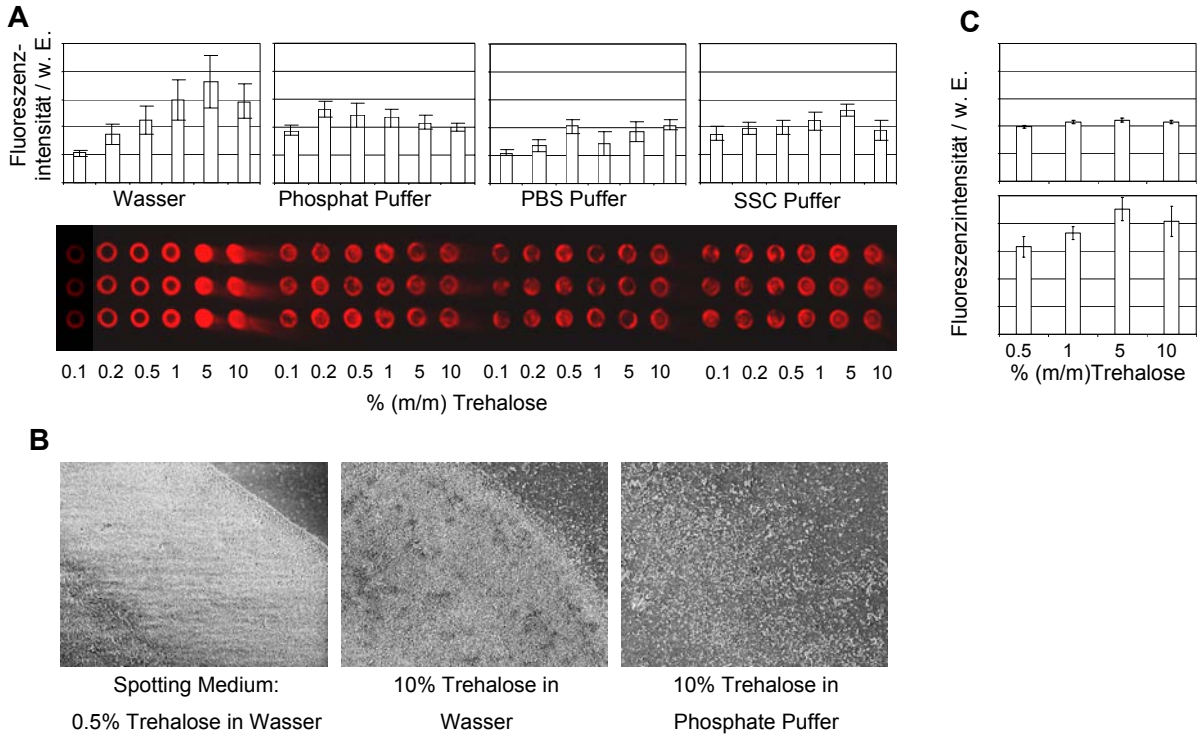

Abbildung 5-14

Einfluss von Trehalose auf die Bindefähigkeit von partikelgebundenen Proteinen in Microspots. **A** Streptavidinpartikel-Spots, die in den angegebenen Medien verdruckt wurden, nach Inkubation in 280 pM bA647CytC. Unten: Typischer Fluoreszenzscan in Falschfarbendarstellung. Oben: Diagramme, die die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Nanopartikelspots angeben. Die Höhe jeder Säule stellt den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten von insgesamt neun Spots von drei Chips-Oberflächen dar (N=9/3). **B** REM Aufnahmen (10 000x) von Nanopartikel Spots nach den standardmäßigen Inkubations-, Wasch- und Trockenschritten. **C** Einfluss von Trehalose auf die IgG-Bindefähigkeit von partikelgebundenem Protein G (oben) und auf die Anti-Ziege Antikörperbindung an Ziege-IgG-Partikel (unten) in Microspots.

Wenn Puffer und Salinen als Suspensions-Medium verwendet wurden, war die Haftung der Partikel auf den Oberflächen insgesamt reduziert. Dies zeigte sich sowohl in der verminderten Signalstärke als auch in der Analyse der Oberflächen mittels REM, die anschließend an die Inkubation durchgeführt wurde: Die Aufnahme der Partikelspots, die in 10 % iger Trehalose-lösung in Phosphatpuffer auf die Oberfläche aufgebracht wurden, zeigt deutlich eine stark ausgedünnte Schicht (Abbildung 5-14 **B**, rechts). Die vergrößerte Ionenstärke könnte durch die Ausbildung von elektrischen Doppelschichten für eine weitgehende Neutralisierung der auf den Partikeln und auf den Polyelektrolyt-beschichteten Oberflächen vorhandenen Ladungen sorgen. Damit würde der elektrostatische Anteil der Wechselwirkung zwischen Substratoberfläche und

Partikeln deutlich vermindert [76]. Unabhängig vom Trehalosegehalt der Partikelsuspensionen ist die Anziehung zwischen Substrat- und Nanopartikel-Oberfläche daher in Puffern möglicherweise geringer als in Wasser, sodass die Partikel während der Inkubation in Puffer von der Oberfläche resuspendiert würden.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Streptavidin-modifizierten Nanopartikeln wurden durch Versuche mit partikelgebundenem Protein G und partikelgebundenen IgG-Antikörpern bestätigt. Die Abhängigkeit der Proteinfunktion vom Trehalosegehalt des Suspensionsmediums war jedoch bei diesen Proteinen weniger stark ausgeprägt (Abbildung 5-14 **C**). Alle in dieser Arbeit beschriebenen Microarray-Oberflächen aus Nanopartikelschichten wurden unter Verwendung von 5 % iger Trehaloselösung in Wasser hergestellt, sofern nichts anderes vermerkt ist.

5.6 Langzeitstabilität von Nanopartikel-basierten Protein-Microarrays

Zur Beurteilung der Lagerfähigkeit von Microarrays aus proteinbeschichteten Nanopartikeln wurden Langzeitversuche durchgeführt. Fertig gedruckte Microarrays aus Streptavidin- und IgG-funktionalisierten Nanopartikeln wurden im Exsikkator gelagert und nach den in Abbildung 5-15 angegebenen Zeitspannen nach einem Standardprotokoll inkubiert. Der Versuch deckte einen Zeitraum von 15 Monaten ab.

Durchführung

Streptavidin- und IgG-beschichtete Nanopartikel wurden in 5 % iger Trehalose-Lösung und in Wasser suspendiert und standardmäßig auf PAH-beschichtete Glassubstrate gespottet. Nach den angegebenen Lagerzeiten im Exsikkator wurden je zwei Chips standardmäßig blockiert und in einer Mischung aus 570 pM bA647CytC und 40 pM Cy3-markiertem Anti-Kaninchen-IgG in PBS inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Microarrays aus biofunktionalisierten Nanopartikeln reproduzierten im Rahmen der Experimentiergenauigkeit über 15 Monate die Signalintensitäten, die mit frisch gedruckten Microarrays erzielt wurden. Partikelgebundenes Streptavidin musste mit Trehalose stabilisiert werden, um seine Biotin-Bindefunktion zu erhalten. Kaninchen-IgG war unter den gegebenen Trockenstressbedingungen weniger anfällig gegen Konformationsverlust. Es wurde erst nach 15 Monaten Lagerzeit nicht mehr signifikant vom sekundären Antikörper erkannt.

Der Unterschied könnte darin begründet sein, dass die Biotin-Bindetaschen des Streptavidin durch die Tertiärstruktur des Moleküls definiert sind, während die polyklonalen Anti-Kaninchen-

Antikörper, die als „Analyt“ für die partikelgebundenen Kaninchen-IgG-Antikörper eingesetzt wurden, mehrere und auch sequentielle Epitope erkannten. Ein Verlust der Tertiärstruktur ist im Fall des Strepavidin folglich gleichbedeutend mit dem Verlust der Biotin-Bindefähigkeit. Bei der Antikörper-Antikörper-Wechselwirkung entfällt im Gegensatz dazu bei Konformationsverlust immer nur ein Teil der Erkennungsstellen.

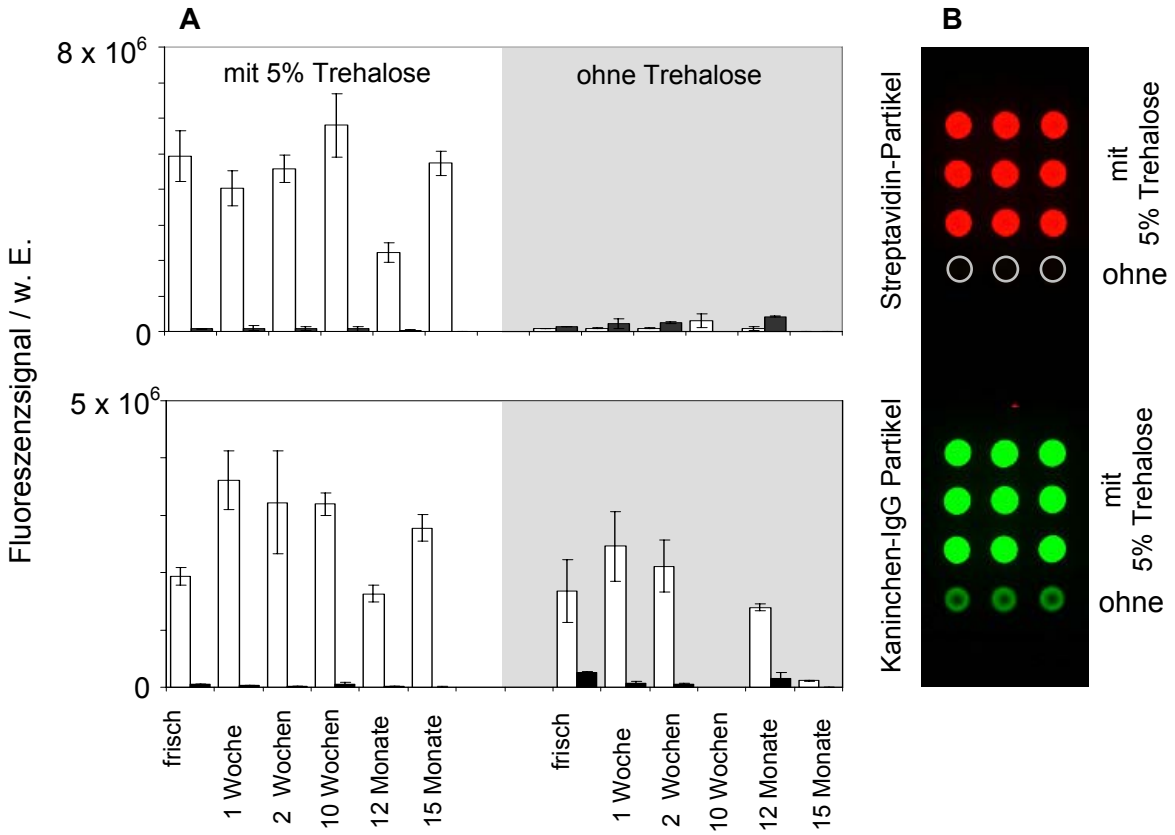

Abbildung 5-15

Fluoreszenzsignale von Nanopartikel-Microarrays aus Streptavidin-Partikeln und Kaninchen-IgG Partikeln, die in einem Langzeitversuch über die angegebenen Zeitspannen gelagert und anschließend nach einem Standardprotokoll inkubiert wurden. Links: Signalintensitäten der gebundenen Analytmoleküle nach Inkubation der Microarrays in 570 pM bA647CytC und 40 pM Cy3-Anti-Kaninchen-IgG in PBS. **A** Oben: Signale der Streptavidin-Partikel, unten: Signale der IgG-Partikel. Die weißen Balken repräsentieren die Signalintensitäten der spezifisch gebundenen Wechselwirkungspartner, die schwarzen Balken zeigen die Signalintensitäten der kreuzweise unspezifisch adsorbierten Analyten. Die grau hinterlegten Balken sind die Signale von Spots, die ohne Trehalose auf die Oberfläche aufgedruckt wurden. **B** Fluoreszenzscan in Falschfarbendarstellung. Rot: Signal des bA647CytC, grün: Signal des Cy3-markierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG. Um die schwachen Cy3-Signale auf den ungeschützten Kaninchen-IgG Partikeln sichtbar zu machen wurden die Signale im Scan aufgehellt. Die übrigen Signale überstrahlen deshalb. (Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus 18 Spots auf 2 Chips für Spots mit Trehalose (N = 18/2) und den Mittelwert aus 6 Spots auf 2 Chips für Spots ohne Trehalose (N = 6/2)).

Der Langzeitversuch bestätigte, dass partikelgebundene Proteine in ultradünnen Nanopartikelschichten durch Zugabe von Trehalose stabilisiert werden und ihre native Struktur über einen langen Zeitraum behalten. So hergestellte mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln eignen sich somit für die Erzeugung von dreidimensionalen Protein-Microarray-Oberflächen.

5.7 Spezifität der Bindungsaktivität

Neben der Sensitivität für die Erkennung der Zielmoleküle ist die Spezifität von Affinitäts-Oberflächen wichtig, das heißt ihre Fähigkeit zwischen den spezifischen Wechselwirkungspartner der Fängermoleküle und anderen Molekülen zu unterscheiden. Diese Eigenschaft ist von grundlegender Bedeutung bei allen markierungsfreien Analysemethoden oder wenn direkt markierte Proben untersucht werden sollen, weil jedes unspezifisch gebundene Molekül dort ein falschpositives Signal liefert. Die Sandwichtechnik sichert die Detektion spezifischer Bindeereignisse durch den zweiten Erkennungsschritt des Detektionsantikörpers stärker ab, dennoch soll die unspezifische Adsorption von Molekülen an die Affinitätsoberflächen minimiert werden. Es wurde daher untersucht wie spezifisch die Wechselwirkungen zwischen den nanoskopischen, dreidimensionalen Affinitätsoberflächen und ihren Zielmolekülen waren.

Durchführung

Streptavidin-Partikel wurden in Trehaloselösungen der angegebenen Konzentrationen gespottet und fünf Tage trocken gelagert. Anschließend wurden die Chips standardmäßig blockiert, in einer Mischung aus bACytC (280 pM) und Cy3-markiertem *E. coli* Zelllysat (0,6 µg mL^{-1}) in PBS inkubiert, gewaschen, getrocknet und ausgelesen.

Außerdem wurden Kaninchen-IgG-Partikel und Ziege-IgG-Partikel in 5 % iger Trehaloselösung gemeinsam auf PAH-beschichtete Glasobjekträger gedruckt. Die Chips wurden standardmäßig blockiert und anschließend zwei Stunden in einer Mischung aus 0,4 nM Cy3-Anti-Kaninchen-IgG und 0,4 nM Cy5-Anti-Ziege-IgG in PBS inkubiert. Daran anschließend wurden sie standardmäßig gewaschen, getrocknet und ausgelesen.

Ergebnisse und Diskussion

Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln detektierten sehr selektiv die spezifischen Wechselwirkungspartner der immobilisierten Fängerproteine, sofern die Funktion der Fängerproteine in den Affinitätsschichten erhalten war. In Abbildung 5-16 **A** ist dargestellt, wie die unspezifische Adsorption von Zelllysat-Bestandteilen an die Streptavidinpartikel-Spots mit steigendem Trehalosegehalt in der Spottingsuspension abnahm. Gleichzeitig nahm die Menge an

gebundenem bA647Cyt C zu. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse des vorigen Abschnittes: diese hatten gezeigt, dass Streptavidin auf den Chipoberflächen ohne Stabilisator seine spezifische Biotin-Bindefähigkeit verlor, was auf eine Denaturierung des Proteins hinwies. Möglicherweise waren die unspezifischen Wechselwirkungen des denaturierten Proteins mit anderen Molekülen stärker als die des intakten Streptavidins. Dies könnte die vermehrte Adsorption von Zelllysat-Bestandteilen bei Spots mit geringem Trehalosegehalt erklären. Bei Verwendung von 5 % iger Trehaloselösung betrug der Anteil des spezifischen Signals der Streptatvidin-modifizierten Nanopartikel 83 % des detektierten Gesamtsignals.

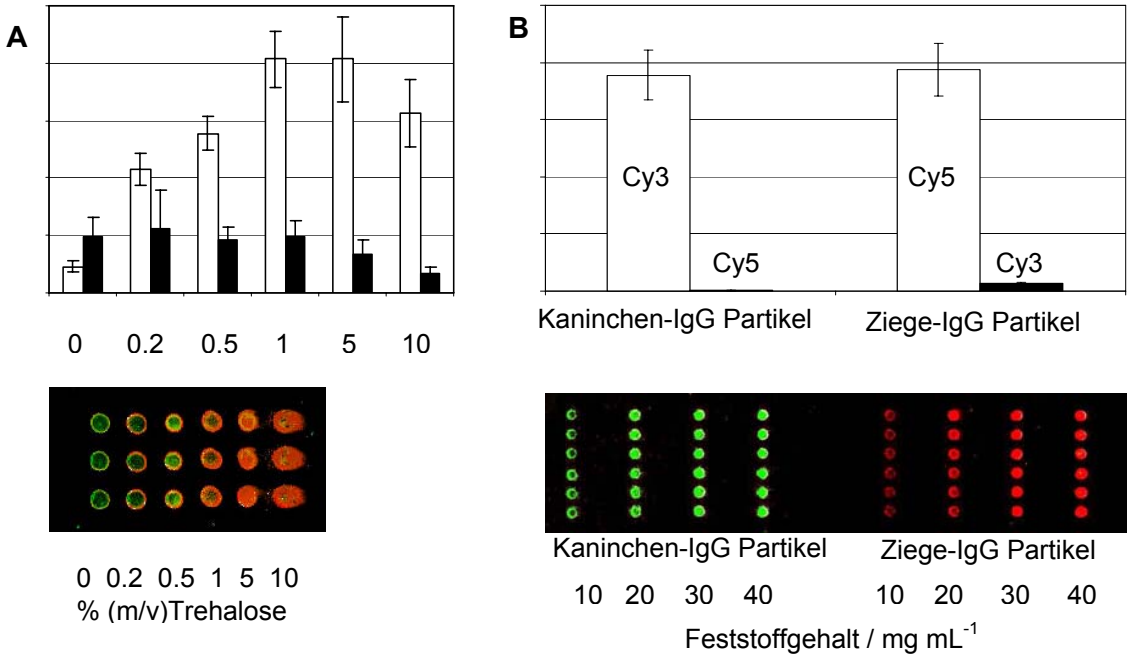

Abbildung 5-16

Spezifische Bindungseigenschaften mikrostrukturierter Schichten aus proteinfunktionalisierten Nanopartikeln. **A** Microarray aus Streptavidin-Partikeln, die in unterschiedlich konzentrierten Trehalose-lösungen gedruckt wurden, nach Inkubation mit bACytC und Alexa Fluor®546-markiertem *E. coli* Zelllysat: Fluoreszenzscan in Falschfarbendarstellung und Fluoreszenzintensitäten des spezifisch an Streptavidin-Partikel gebundenem bA647CytC (rot) und von unspezifisch adsorbiertem Zelllysat (grün). **B** Microarray aus Ziege-IgG und Kaninchen-IgG-Partikeln: Fluoreszenzscan nach Inkubation mit Cy3-Anti-Kaninchen-IgG (grün) und Cy5-Anti-Ziege-IgG (rot) in PBS (400 pM) in Falschfarbendarstellung und Intensitäten der spezifischen und unspezifischen Fluoreszenz-Signale der 20 mg mL^{-1} Spots.

Die Steigerung der Trehalose-Konzentration auf 10 % bewirkte eine Verminderung des unspezifischen wie auch des spezifischen Signals. Auf der Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 5.5 war dies auf eine Destabilisierung der Partikelschichten zurückzuführen.

IgG-funktionalisierte Nanopartikel, die in 5 % iger Trehalose-Lösung abgeschieden worden waren, detektierten ihre spezifischen Wechselwirkungspartner sehr selektiv (Abbildung 5-16 **B**).

Das spezifische Signal der Kaninchen-IgG-Partikel lag unter den beschriebenen Versuchsbedingungen bei 99 % des Gesamtsignals, das spezifische Signal der Ziege-IgG-Partikel bei 96 % des Gesamtsignals.

Die dargestellten Ergebnisse hoher Spezifität wurden nur erzielt, wenn die Chip-Oberflächen vor der Inkubation mit den Probelösungen mit 3 % iger BSA-Lösung blockiert wurden. Dieser Blockierschritt oder ein ähnliches Protokoll wird bei Ligandenbindungstests generell durchgeführt und wurde aus der Literatur übernommen [11].

5.8 Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Chipqualität

Mehrere Messungen einer Messgröße an derselben Probe liefern im Allgemeinen nicht dasselbe Messergebnis. Dies kann an der Inhomogenität der Probe liegen oder an der Instabilität des Messprozesses, in den meisten Fällen spielen beide Faktoren eine Rolle. Bei einer Messung geht man im Allgemeinen davon aus, dass es einen „wahren Wert“ der untersuchten Größe gibt, der mit der verwendeten Messapparatur im Rahmen einer gewissen Messgenauigkeit bestimmt werden kann. Wie in Abschnitt 4.11 beschrieben, reagieren Ligandenbindungstests empfindlich auf Schwankungen in der Dichte der Fänger-Moleküle. Der systematische Fehler bei der Verwendung von Protein-Microarrays als Werkzeug zur Proben-Analyse kann demnach verringert werden, indem Unregelmäßigkeiten bei der Herstellung der Microarrays minimiert werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, welche Faktoren im Herstellungsprozess der Chips zur Vergrößerung eines systematischen Fehlers beitrugen. Dazu wurde zunächst untersucht, ob die Homogenität der Spots prinzipiell davon abhängig war, welchen Feststoffgehalt die zum Drucken verwendete Suspension hatte. Um mögliche Unregelmäßigkeiten im Druckprozess oder Inhomogenitäten der Substrat-Oberflächen identifizieren zu können, wurden außerdem unabhängig vom Feststoffgehalt die mittleren Standardabweichungen der Spots innerhalb verschiedener Spot-Gruppen betrachtet: Zum einen wurde die mittlere Standardabweichung der Spots innerhalb der Spot-Triplette ermittelt, welche der Arrayer für die Mehrfachbestimmung jedes Messwerts druckte. Zum anderen wurde die mittlere Standardabweichung aller Spots auf einem Chip ermittelt und schließlich die mittlere Standardabweichung der Spots, welche in einem Druck-Durchlauf auf alle acht Chips einer Charge gedruckt wurden. Für diese Untersuchungen wurden jeweils Nanopartikelsuspensionen aus einem einzigen Ansatz verdruckt. Um zu überprüfen, in welchem Maße Schwankungen bei der Einstellung des Feststoffgehalts die Reproduzierbarkeit bei der Chipherstellung beeinflusste, wurden weiterhin Untersuchungen an Arrays gemacht, welche aus mehreren Suspensionen mit demselben nominellen Feststoffgehalt gedruckt waren, wobei der Feststoffgehalt jedoch in mehreren Einzelansätzen eingestellt worden war.

Wie im Methodenteil in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, wurden die Glas-Substrate standardmäßig in Chargen aus je acht Slides präpariert. Für die Untersuchungen am Herstellungsprozess wurden drei Chargen aus acht Chips verwendet. Alle Chips wurden identisch behandelt und daher sollten im Idealfall nach Inkubation mit Analytlösung alle Spots innerhalb der einzelnen Spotgruppen dasselbe Signal liefern. Die Schwankungen der Signalintensität, die unter realen Bedingungen auftraten, wurden ausschließlich auf Schwankungen in der Chip- beziehungsweise Spot-Qualität zurückgeführt. Um den Einfluss von Massentransport-Effekten während der Inkubation zu minimieren und vernachlässigbar zu machen wurde die Inkubation in großem Probenvolumen und unter ständiger Durchmischung der Probe durchgeführt. Ein möglicher Messfehler des Fluoreszenzscanners wurde nicht berücksichtigt.

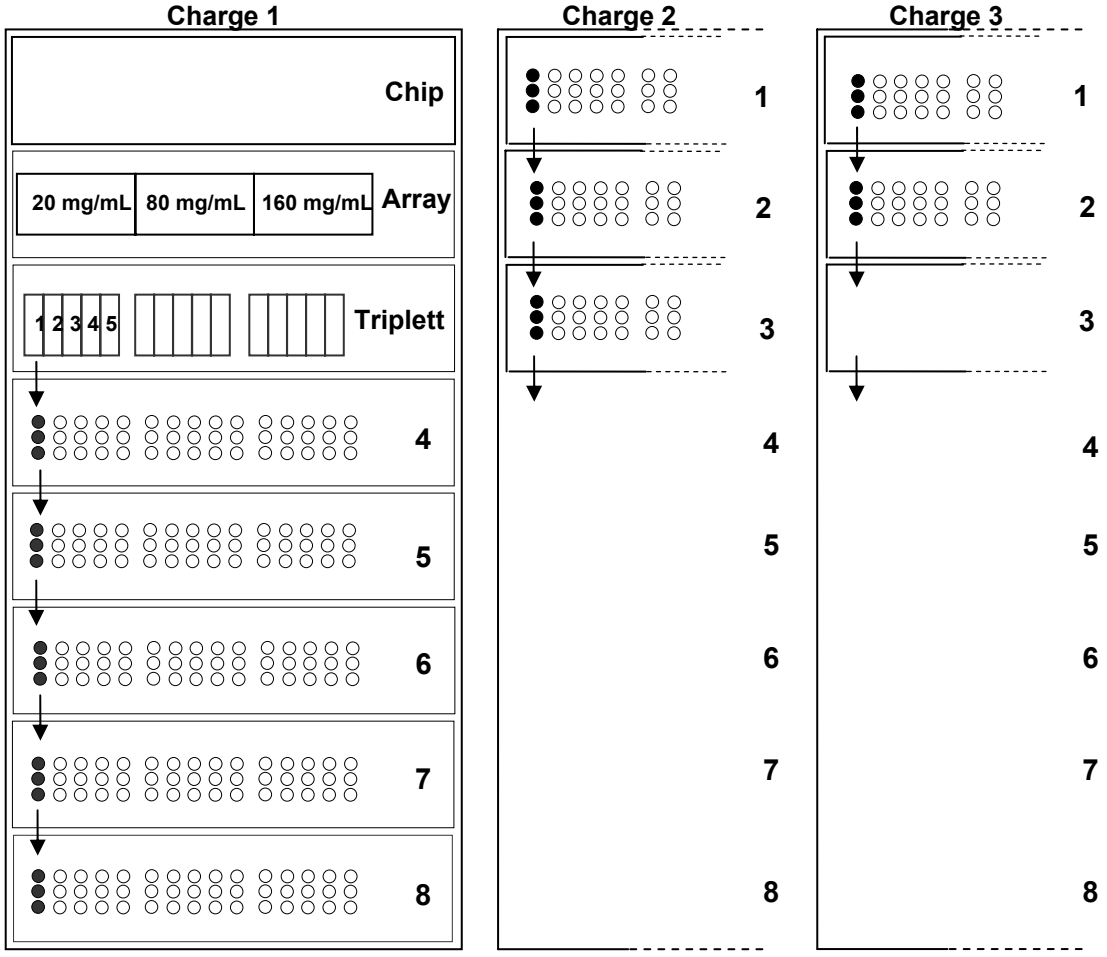

Abbildung 5-17

Schema zur Veranschaulichung der Chipherstellung: Drei Chargen aus acht beschichteten Glas-Objektträgern wurden mit Partikel-Suspensionen unterschiedlichen Feststoffgehalts bedruckt. In einem Drucklauf wurden auf jeden Chip drei Spots gedruckt. Jede Partikelsuspension wurde in fünf Druckläufen wiederholt auf alle Chips gedruckt, so dass für jeden Feststoffgehalt Microarrays aus 5 x 3 Spots erzeugt wurden.

Durchführung

In drei Ansätzen wurden je acht Glasobjektträger standardmäßig gereinigt und mit PAH beschichtet. Streptavidin-Partikel wurden in 5 % iger Trehalose-Lösung suspendiert, dabei wurde ein Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} eingestellt. In einer Verdünnungsreihe wurden weiterhin Partikelsuspensionen mit Feststoffgehalt 80 mg mL^{-1} und 20 mg mL^{-1} hergestellt. Jede Suspension wurde auf fünf Wells einer Mikrotiterplatte verteilt. Je acht Objektträger wurden nacheinander in einem Druckprozess mit den Suspensionen bedruckt. Der Ablauf des Druckprozesses ist in Abbildung 5-17 skizziert. Der Arrayer nahm jeweils Suspension aus einem Well auf und druckte sie in einem Durchgang in jeweils dreifacher Ausführung auf alle acht Substrate. Dieser Vorgang wurde für jede Suspension fünf Mal wiederholt, so dass mit jedem Feststoffgehalt ein 3 x 5 Array auf die Chips gedruckt wurde.

Die fertigen Chips wurden standardmäßig mit BSA-Lösung blockiert und eine Stunde in 1 nM bA647CytC in PBS inkubiert. Nach den Standardwaschschritten wurden sie getrocknet und die Fluoreszenzsignale der angebundenen Analytmoleküle wurden ausgelesen.

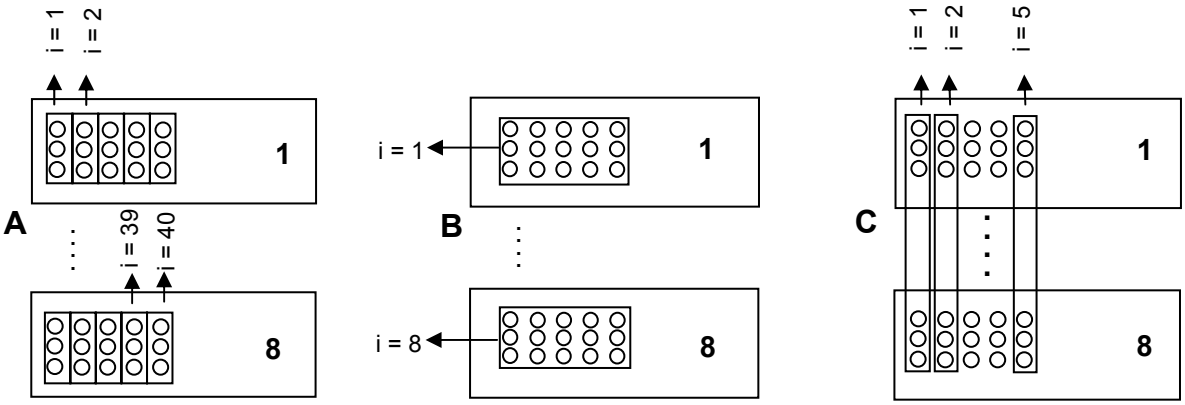

Abbildung 5-18

Schema zur Veranschaulichung der Spot-Gruppen, die zur Identifizierung der Quelle von systematischen Fehlern verglichen wurden. Gezeigt ist die Gruppenbildung am Beispiel von einem Feststoffgehalt. Die Arrays aus Suspensionen mit den zwei anderen Feststoffgehalten wurden in dieselben Gruppen aufgeteilt: **A** Bestimmung der mittleren Standardabweichung innerhalb der Spot-Triplette, **B** Bestimmung der mittleren Standardabweichung der Spots auf einem Chip, **C** Bestimmung der mittleren Standardabweichung der Spots aus einem Spotting-Durchgang.

Auswertung

Zur Auslese von Protein-Microarrays wird üblicherweise die Fluoreszenzintensität der Spots bestimmt. Sie ist ein Maß für die pro Spot gebundene Analytmenge und reflektiert die Analytkonzentration in der Probe. Hier wurde die Fluoreszenzintensität herangezogen, um bei konstanter Analytkonzentration auf Unterschiede in der Fängerkonzentration pro Spot zu schließen und die Prozesse bei der Herstellung bezüglich ihrer Stabilität zu beurteilen. Die

Auswertung erfolgte getrennt nach Feststoffgehalten der verwendeten Partikel-Suspensionen. Zur Quantifizierung der materialbedingten systematischen Fehler wurden jeweils Standardabweichungen der gemessenen Signalintensitäten innerhalb unterschiedlicher Spot-Gruppen berechnet (Gleichung 4-5, Gleichung 4-6):

Zur Quantifizierung des gesamten systematischen Fehlers, der aufgrund von Qualitätsschwankungen innerhalb einer Chip-Charge auftrat, wurden für jede Charge die Standardabweichungen aller Einzelspots vom jeweiligen Mittelwert berechnet.

Zur Quantifizierung der Schwankungen, die innerhalb der Spot-Triplette entstanden, wurde die mittlere Standardabweichung der drei Einzelspots $x_{i,1-3}$ der Tripletts i $(1 \le i \le 40)$ berechnet (Abbildung 5-18 **A**).

Zur Quantifizierung von Unterschieden zwischen mehreren Druckdurchläufen, für die der Spotter jeweils erneut Suspension aus einem MTP-Well aufnahm, wurde die mittlere Standardabweichung der Spots $x_{i,1-15}$ innerhalb der Arrays i auf einem Chip $(1 \le i \le 8)$ berechnet (Abbildung 5-18 **B**).

Zur Quantifizierung von Unregelmäßigkeiten, die im Verlauf eines Druckdurchlaufs auftraten, wurde die mittlere Standardabweichung der Spots $x_{i,1-24}$ berechnet, die in einem Druckdurchgang i $(1 \le i \le 5)$ auf eine Chip-Charge gedruckt wurden (Abbildung 5-18 **C**).

Alle Auswertungen wurden getrennt für Spots aus 20 mg mL^{-1}, 80 mg mL^{-1} und 160 mg mL^{-1} Suspensionen vorgenommen und die Ergebnisse wurden untereinander verglichen.

Weil in einer Charge ein Array beschädigt war, die Anzahl der ausgewerteten Messwerte für die Berechnung der Standardabweichungen jedoch vergleichbar gehalten werden musste (siehe Kapitel 4.7), wurden insgesamt pro Charge nur sieben Chips in die Auswertung einbezogen. Einzelspots mit negativer Signalintensität (Hintergrund > Signal) wurden nicht ausgewertet, alle anderen Messwerte wurden berücksichtigt, es wurde keine Ausreißeranalyse durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Standardabweichung der Signalintensitäten wurde unter den beschriebenen Versuchsbedingungen als Maß für einen systematischen Fehler betrachtet, der bei der Analyse von Proben mittels Nanopartikel-Microarrays aufgrund von Qualitätsschwankungen des Chipmaterials auftrat. In Tabelle 5-4 sind die Standardabweichungen der Signalintensitäten aufgeführt, die im Herstellungsprozess der Chip-Chargen entstanden. Die Gesamt-Standardabweichung (σ total) gibt jeweils die Standardabweichung aller 120 Spots an, die im 5 x 3 Arrayformat auf die 8 Chips einer Charge gedruckt wurden. Wenn Nanopartikel-Suspension mit einem Feststoffgehalt von

20 mg mL^{-1} gedruckt wurde, betrug die Gesamt-Standardabweichung bis zu 34 % vom Mittelwert der detektierten Fluoreszenzintensität. Wenn Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von mindestens 80 mg mL^{-1} verwendet wurde, lag die Standardabweichung zwischen 10 % und 15 %.

Tabelle 5-4

Durch den Herstellungsprozess bedingte, relative Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale von Nanopartikel-Microarrays auf drei Chip-Chargen in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt der verwendeten Partikelsuspensionen. Alle Chips wurden in derselben Probelösung mit einer Analytkonzentration von 1 nM inkubiert. Die Mittelwerte der Signalintensitäten waren den unterschiedlichen Fängerdichten der Spots entsprechend in den drei Messsystemen unterschiedlich hoch. Um die Größe der Messfehler vergleichbar zu machen sind alle Werte in Prozent von der mittleren Signalintensität angegeben. Die Standardabweichungen über alle Spots einer Charge sind fett gedruckt (N = 8 x 5 x 3 Spots = 120 Spots). Rechts davon stehen die mittleren Standardabweichungen verschiedener Spot-Untergruppen. Von links nach rechts: mittlere Standardabweichung der Spots innerhalb der Tripletts einer Charge, innerhalb der Chips einer Charge und innerhalb der Druckläufe einer Charge.

Charge	1				2				3			
	σ total	Mittlere Standardabweichung			**σ total**	Mittlere Standardabweichung			**σ total**	Mittlere Standardabweichung		
Feststoff		Tripl	Chip	Druck lauf		Tripl	Chip	Druck lauf		Tripl	Chip s	Druck lauf
20 mg mL^{-1}	**34%**	12%	24%	32%	**24%**	10%	19%	21%	**26%**	9%	22%	20%
80 mg mL^{-1}	**12%**	10%	10%	12%	**10%**	6%	9%	9%	**13%**	8%	9%	13%
160 mg mL^{-1}	**13%**	11%	11%	13%	**11%**	6%	10%	9%	**14%**	7%	10%	14%

Die absoluten Werte der Standardabweichungen der Spots einer Charge waren, wie beispielsweise für Charge 3 mit 1241710 Einheiten (20 mg mL^{-1}), 1110037 Einheiten (80 mg mL^{-1}) und 1341339 Einheiten (160 mg mL^{-1}) ähnlich groß. Die Standardabweichung der Spots aus Suspension mit einem Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} war allgemein am niedrigsten. Aufgrund der unterschiedlich großen Signalstärken (zum Beispiel 4752004 Einheiten (20 mg mL^{-1}), 8963443 Einheiten (80 mg mL^{-1}), 9442352 Einheiten (160 mg mL^{-1}) in Charge 3), welche die drei Messsysteme bei der Detektion einer bestimmten Analytkonzentration erreichten, war das Verhältnis von Signalstärke und systematischem Messfehler für Spots aus Suspension mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} jedoch deutlich ungünstiger.

Der systematische Fehler kann demzufolge über einen möglichst großen Konzentrationsbereich konstant gehalten werden, wenn die Anzahl der Fängerstellen pro Spot möglichst groß ist. Dazu muss der Partikelübertrag so optimiert wird, dass die spezifische Bindekapazität maximal wird.

In Tabelle 5-4 sind zusätzlich zu den Gesamt-Standardabweichungen die mittleren Standardabweichungen innerhalb definierter, mehrfach vorkommender Spot-Untergruppen aufgeführt. Die Streuung der Messwerte war zu einem Teil auf Streuungen innerhalb der Spot-Tripletts zurückzuführen. Zu diesen Unregelmäßigkeiten kamen Schwankungen zwischen verschiedenen Druckläufen, also innerhalb jedes Arrays auf einem Chip, und innerhalb der Druckläufe. Die Streuungen innerhalb der Tripletts waren in den größeren Spot-Gruppen jeweils auch enthalten, dementsprechend waren die mittleren Standardabweichungen innerhalb der Arrays auf einem Chip und innerhalb der Druckläufe immer höher als innerhalb der Tripletts. Die Standardabweichungen innerhalb eines Drucklaufs, waren fast durchgehend größer als die Standardabweichungen innerhalb der Arrays. Die Schwankungen waren demnach größer, wenn während des Drucklaufs auf mehrere Substrate gedruckt wurde als bei wiederholtem Drucken auf ein Substrat. Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Objektglas-Stärken und Unterschiede der Substrat-Oberflächen die Reproduzierbarkeit des Partikelübertrags stärker beeinträchtigten als der Druckprozess.

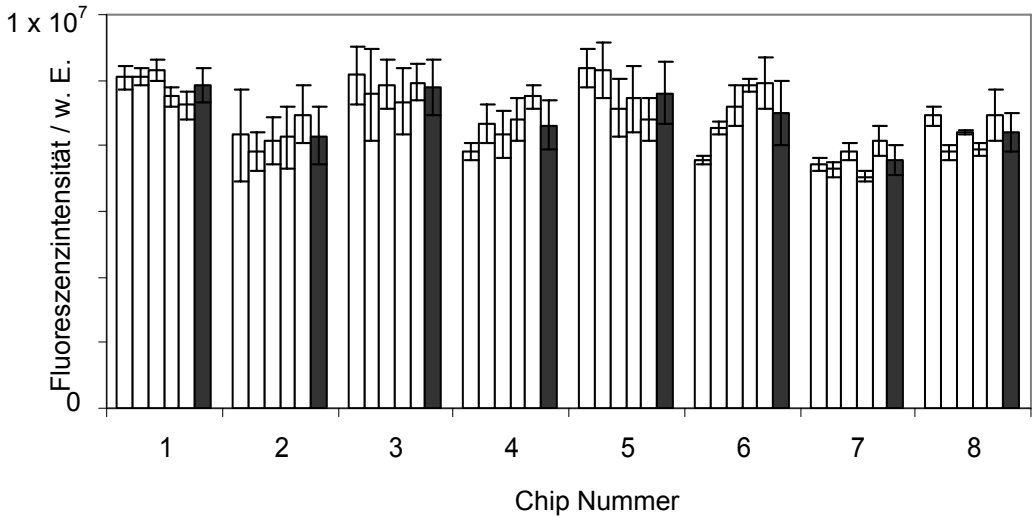

Abbildung 5-19

Mittlere Fluoreszenzintensitäten der 80 mg mL^{-1} Spots einer typischen Chip-Charge aus 8 Chips. Die Balken sind chipweise gruppiert. Die weißen Balken stellen die mittleren Fluoreszenzintensitäten der fünf Tripletts pro Array dar (N=3), die schwarzen Balken jeweils den Mittelwert des ganzen 5 x 3 Arrays eines Chips (N=15).

Das Säulendiagramm in Abbildung 5-19 zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der acht Arrays aus Suspension mit 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt aus einer typischen Chip-Charge. Die Säulen sind chipweise gruppiert. Die weißen Balken stellen jeweils die mittleren

Fluoreszenzintensitäten der fünf Tripletts pro Array dar, die schwarzen Balken jeweils den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller Spots eines Arrays. Es war zu beobachten, dass die Abweichungen zwischen den Tripletts zufällig verteilt waren. Das heißt, die Fluoreszenzintensität keines der Tripletts war auf allen Chips systematisch stärker als die der anderen. Folglich gingen die Unterschiede in der Bindekapazität nicht auf systematische Fehler bei der Beladung der Mikrotiterplatte oder des Druckkopfes zurück, sondern entstanden zufällig beim Druckprozess oder waren abhängig von der lokalen Oberflächenbeschaffenheit des Substrats. Die unterschiedlichen Mittelwerte der Arrays zeigten jedoch, dass die Signale auf manchen Substraten systematisch höher oder niedriger waren, als auf anderen. Dieses Ergebnis bestätigt die Einschätzung, dass Qualitätsschwankungen zwischen verschiedenen Chips berücksichtigt werden müssen. Die Auswahl sehr homogener Substrate wäre demnach eine Maßnahme zur Verbesserung der Chipqualität.

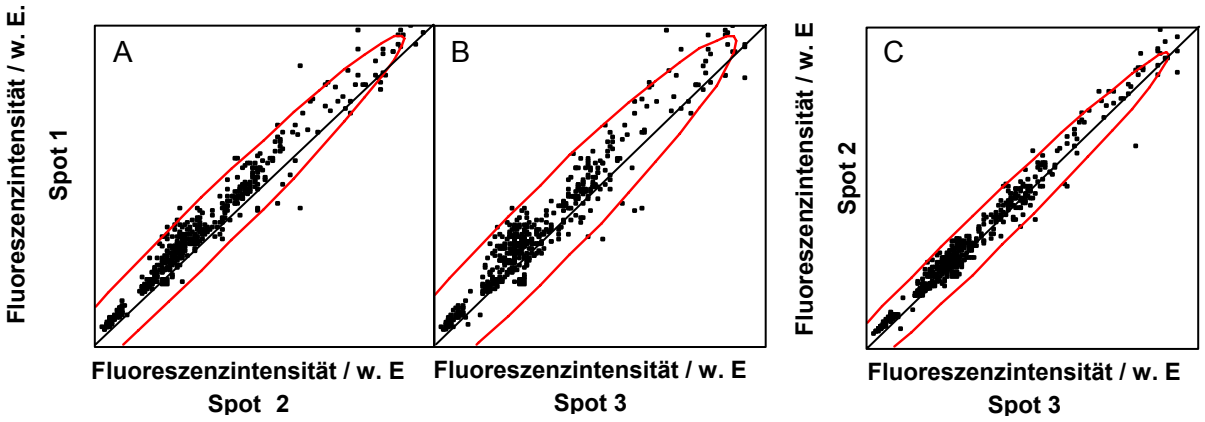

Abbildung 5-20

Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation der in dreifacher Ausführung gedruckten Spots. In den Diagrammen A und B sind die Fluoreszenzintensitäten der zuerst gedruckten Spots gegen die Fluoreszenzintensitäten der zweiten und dritten Spots aufgetragen, in Diagramm C die Fluoreszenzintensitäten der zweiten gegen die der dritten Spots. Die Skalierung der Achsen ist in allen Diagrammen gleich, die durchgezogene Linie ist die Identitätsgerade. Insgesamt sind 500 Tripletts dargestellt, die mit 80 mg mL^{-1} Partikelsuspensionen gedruckt wurden. Die eingezeichneten Ellipsen umfassen jeweils 99 % der Punkte. Die asymmetrische Orientierung der Ellipsen in den Diagrammen A und B zeigt an, dass das Fluoreszenzsignal der ersten Spots gegenüber den anderen Spots eines Tripletts im Mittel systematisch erhöht ist. Die Streuung der Punkte ist ein Maß für die paarweise Korrelation der Spots.

Die Ursache der Schwankungen innerhalb eines Substrats wurde anhand der Standardabweichungen innerhalb der Spot-Tripletts untersucht. In Abbildung 5-20 zeigen drei Streudiagramme die Korrelation von je zwei Spots der Tripletts. Die eingezeichneten Ellipsen umfassen jeweils 99 % der Punkte. In den Diagrammen A und B zeigt die von der Winkelhalbierenden abweichende Lage der Ellipsen an, dass das Fluoreszenzsignal des zuerst

gedruckten Spots gegenüber den anderen Spots eines Tripletts systematisch erhöht war. Die unterschiedlich starke Streuung der Punkte in den Diagrammen A und C zeigt an, dass die Korrelation der ersten zwei Spots kleiner war, als die Korrelation des zweiten und dritten Spots. Sowohl die systematisch erhöhte Signalintensität des zuerst gedruckten Spots als auch der systematische Unterschied in der Korrelation nebeneinander liegender Spots sind Hinweise darauf, dass die Inhomogenität innerhalb der Spot Tripletts nicht auf Inhomogenitäten der Substratoberfläche zurückzuführen sind, sondern auf Unregelmäßigkeiten im Druckprozess. Da die Korrelation des ersten Spots eines Tripletts mit den beiden anderen systematisch schlechter war als die Übereinstimmung von zweitem und drittem Spot könnte eine Verkleinerung der Standardabweichung erreicht werden, indem der erste Spot jedes Tripletts verworfen wird. Diese Möglichkeit ist allerdings nicht effizient im Hinblick auf den Materialverbrauch und die Prozesszeit. Da die Korrelation der ersten beiden Spots aber höher war als die von erstem Spot und drittem Spot, könnte die Standardabweichung verringert und gleichzeitig der Druckprozess verkürzt werden, indem die Spots in Duplikaten anstatt in dreifacher Ausfertigung gedruckt würden.

Um beurteilen zu können, welche zusätzliche Fehlerquelle die Einstellung des Feststoffgehalts der Suspensionen bei der Chipherstellung darstellt, wurden auch Arrays im 5 x 3 Format gedruckt, für die Partikelsuspensionen in fünf Einzelansätzen auf den gewünschten Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} eingestellt worden waren. Im Vergleich zu den aus einem Suspensions-Pool gedruckten Arrays der oben beschriebenen Versuchsreihe, welche innerhalb der Arrays eine mittlere Standardabweichung von 9,2 % aufwiesen, betrug die Standardabweichung innerhalb von Arrays aus fünf einzeln eingestellten Suspensionen 16,5 %.

Diesen gezeigten Ergebnissen zufolge könnte der systematische Fehler bei der Herstellung von Affinitätsoberflächen aus gespotteten Nanopartikel-Mikrostrukturen verbessert werden, indem Mehrfachbestimmungen auf Duplikate beschränkt würden, indem sehr homogene Substrate verwendet würden und indem konzentrierte Nanopartikelsuspension für die Herstellung großer Chip-Chargen in großen Ansätzen hergestellt würde.

5.9 Auflösungsvermögen

Ein Messsystem kann unter anderem anhand seines Auflösungsvermögens klassifiziert werden. Das Auflösungsvermögen gibt an, in welchem Maße ein System zwischen unterschiedlichen Werten der Messgröße unterscheiden kann. Das Auflösungsvermögen hängt einerseits von der Empfindlichkeit des Messsystems ab, das heißt von der Steigung der Kalibrierkurve, andererseits von der Standardabweichung, mit der das System bei Wiederholungsmessungen einen Messwert

bestimmen kann [101]. Zum Vergleich von Messsystemen aus Spots unterschiedlicher Partikeldichte wurden Microarrays aus Nanopartikelsuspensionen mit den Feststoffgehalten 20 mg mL^{-1}, 80 mg mL^{-1} und 160 mg mL^{-1} gedruckt und deren Empfindlichkeit und Messgenauigkeit für verschiedene Konzentrationsbereiche bestimmt.

Durchführung

Streptavidin-Partikel wurden mit einem Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} in 5 % iger Trehalose-lösung suspendiert. In einer Verdünnungsreihe wurden weiterhin Partikelsuspensionen mit Feststoffgehalt 80 mg mL^{-1} und 20 mg mL^{-1} hergestellt. Mit diesen Suspensionen wurden 48 PAH-beschichtete Glasobjektträger bedruckt. Alle Chips wurden standardmäßig blockiert und je acht Chips wurden eine Stunde in 10 pM, 100 pM, 500 pM, 1 000 pM, 5 000 pM und 10 000 pM bA647CytC-Lösung in PBS inkubiert. Nach den standardmäßigen Waschschritten wurden die Chips getrocknet und alle mit einer Belichtungszeit von $t_{\lambda 635}$ = 1s ausgelesen.

Die mittlere Signalintensität von jeweils 15 Spots auf 8 Slides (N = 120/8) wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Analytkonzentration aufgetragen. Die Konzentration-Signal-Kurve wurde abschnittsweise linear genähert. Der erste Abschnitt umfasste den Konzentrationsbereich 10 pM $\leq$ c $\leq$ 500 pM, der zweite Abschnitt den Konzentrationsbereich 500 pM < c $\leq$1 000 pM, der dritte Abschnitt den Konzentrationsbereich 1 000 pM < c $\leq$ 6 000 pM und der vierte Abschnitt den Konzentrationsbereich 5 000 pM < c $\leq$ 11 000 pM. Die Steigungen S der Kurvenabschnitte dienten als Maß für die Empfindlichkeit der Messsysteme in den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Dabei wurde für die Steigung in einem Messpunkt jeweils die Steigung der linearen Näherung unterhalb des Messpunktes angenommen. Als Maß für die Messfehler der verschiedenen Messsysteme wurde der zweifache Wert der Standardabweichungen σ der gemessenen Signalintensitäten bei den angegebenen Analytkonzentrationen berechnet. Sie sind in Abbildung 5-21 als Fehlerbalken in y-Richtung eingezeichnet. Die Quotienten aus den doppelten Standardabweichungen und den Empfindlichkeiten der Messsysteme ergaben die Unsicherheiten ΔC der Systeme bei der Bestimmung der Analytkonzentration. Diese sind in Abbildung 5-21 als Fehlerbalken in x-Richtung eingezeichnet. Das Auflösungsvermögen R wurde als Verhältnis von der gemessenen Konzentration und der Messunsicherheit ΔC bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-21 zeigt für drei Messsysteme unterschiedlicher Partikeldichte die gemessenen Signalintensitäten in Abhängigkeit von den eingesetzten Analytkonzentrationen. Microarrays aus 160 mg mL^{-1} Nanopartikel-Suspension erbrachten für alle untersuchten Analytkonzentrationen die größten Signalstärken und zeigten die höchste Empfindlichkeit. Bei Verwendung von

Suspensionen mit 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt wurden kleinere Signalstärken erzielt und die Empfindlichkeit des Systems war geringer. Die schwächsten Signale und die geringste Empfindlichkeit zeigten Microarrays aus 20 mg mL^{-1}.

Die Empfindlichkeit aller Arrays nahm ab, wenn die Affinitätsoberflächen sich der Sättigung näherten. Die Sättigung der Arrayoberflächen aus Suspensionen mit Feststoffgehalten von 80 mg mL^{-1} und 160 mg mL^{-1} stellte sich im Kontakt mit Probenkonzentrationen zwischen 1 nM und 10 nM ein. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Vorhersagen gemäß dem Massenwirkungsgesetz (siehe Abschnitt 4.11). Microspots mit der schwächsten Fängerbelegung konnten Konzentrationen oberhalb 500 pM nicht mehr auflösen.

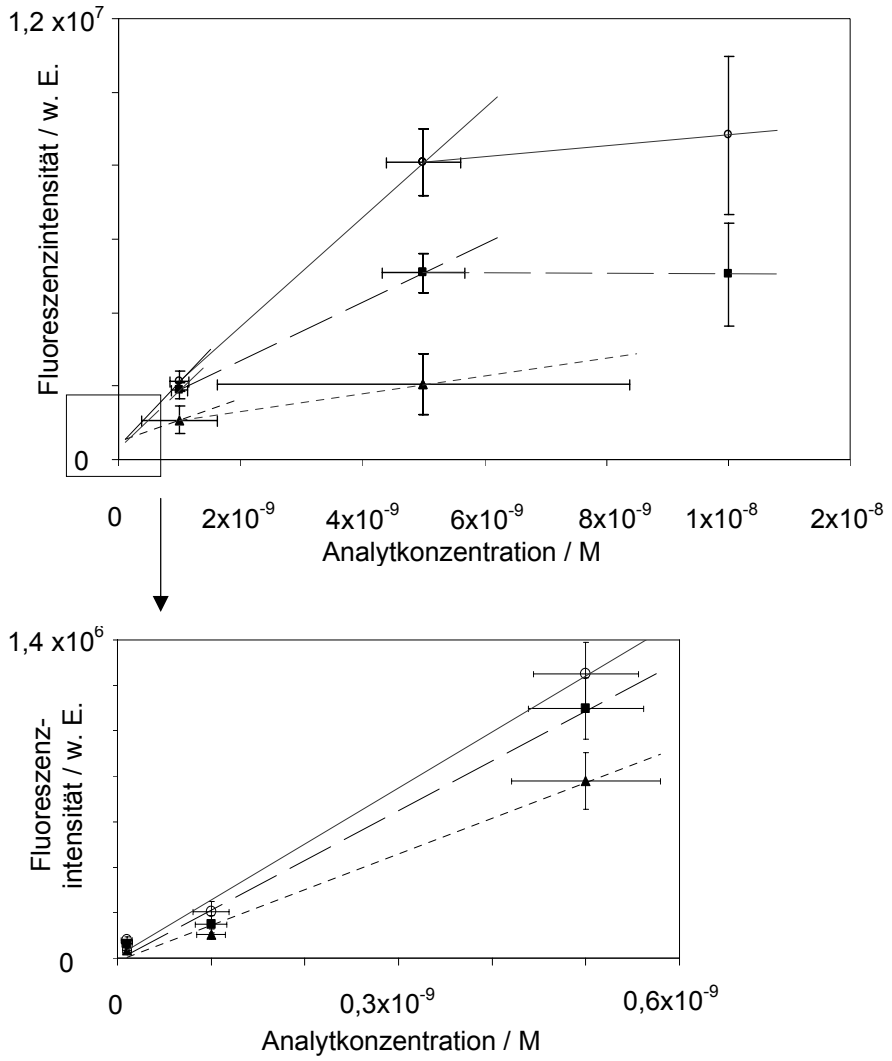

Abbildung 5-21

Fluoreszenzsignale von Microarrays aus Streptavidin-modifizierten Nanopartikelspots. Die Signalintensitäten für Microarrays mit verschiedenen Fängerdichten pro Spot wurden in Abhängigkeit von der Analytkonzentration aufgetragen. ▲: Signalintensität von Arrays aus 20 mg mL^{-1} Nanopartikel-Suspension, ■: 80 mg mL^{-1}, ○: 160 mg mL^{-1}. Die Steigungen der Konzentration-Signal Kurven wurden abschnittsweise linear genähert. Das kleine Diagramm zeigt den unteren Konzentrationsbereich in vergrößertem Maßstab.

In Tabelle 5-5 sind die Auflösungsvermögen der verschiedenen Messsysteme für einzelne Konzentrationsbereiche aufgelistet. Der Vergleich der Auflösungsvermögen der Arrays ergab, dass die erhöhte Bindekapazität von Spots mit höherer Partikeldichte zu einer höheren Empfindlichkeit und damit zu einem weiteren dynamsichen Bereich des Messsystems führt. Weil das Auflösungsvermögen jedoch sowohl von der Systemempfindlichkeit als auch vom systematischen, materialbedingten Fehler abhängt, wurde bezüglich des dynamischen Bereichs kein systematischer Vorteil erreicht, wenn anstatt Suspensionen mit 80 mg mL^{-1} Feststoffgehalt Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von 160 mg mL^{-1} eingesetzt wurden.

Tabelle 5-5

Auflösungsvermögen von Nanopartikel-Microarrays mit unterschiedlichen Partikeldichten pro Spot. Die Konzentrationsbereiche außerhalb der grau unterlegten Fläche liegen außerhalb des dynamischen Bereichs der Messsysteme.

Analyt-konzentration		10 pM	100 pM	500 pM	1000 pM	5000 pM	10000 pM
20 mg mL^{-1}	Δ**C**/pM	9,6	30	158	1253	6771	-
	R	**1**	**3,3**	**3,2**	**0,8**	-	-
80 mg mL^{-1}	Δ**C**/pM	11	34	124	272	1343	-
	R	**0,9**	**2,9**	**4,1**	**3,7**	**3,7**	-
160 mg mL^{-1}	Δ**C**/pM	12	38	112	308	1234	28648
	R	**0,9**	**2,6**	**4,5**	**3,3**	**4,1**	-

5.10 Dynamischer Messbereich Nanopartikel-basierter Protein-Microarrays

Der dynamische Bereich für Messungen mit Microarrays aus biofunktionalisierten Nanopartikelschichten wurde ermittelt, indem Nanopartikelarrays mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen inkubiert wurden und die untere Nachweisgrenze des Systems sowie die Sättigungskonzentration bestimmt wurden.

Durchführung

Kaninchen-IgG-modifizierte Nanopartikel wurden in 5 % iger Trehaloselösung suspendiert und ein Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} eingestellt. Auf 22 PAH-beschichtete Glasobjektträger wurden Arrays aus je neun Spots gedruckt. Aufgrund der großen notwendigen Anzahl von Einzelansätzen wurden die Arrays unter Verwendung von Geneframes® mit einem Volumen von 125 µL inkubiert. Die Geneframes® wurden auf die Chips aufgeklebt und jeweils mit 250 µL BSA-

Lösung in PBS befüllt. Die Geneframes® wurden nicht einzeln abgedeckt, sondern in einer feuchten Kammer eine Stunde blockiert. Anschließend wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die Geneframes® wurden mit je 125 µL Analytlösung befüllt. Als Analyt diente Cy5-markiertes-Anti-Kaninchen-IgG, das in den Konzentrationen 4 fM, 20 fM, 200 fM, 400 fM, 1 pM, 2 pM, 4 pM, 400 pM, 2 nM, 4 nM und 40 nM in PBS gelöst war. Die Chips wurden wiederum in einer feuchten Kammer eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Analytlösung abgesaugt, die Geneframes® wurden entfernt und alle Chips wurden standardmäßig gewaschen und getrocknet. Die Auslese musste aufgrund des beschränkten Messbereichs des Fluoreszenzscanners mit unterschiedlich langen Anregungszeiten erfolgen. Die Signal-Konzentration Kurve setzt sich deshalb aus Abschnitten unterschiedlicher Signalstärken zusammen. Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens des Systems bei einer Analytkonzentration von 40 nM wurde die Konzentration-Signal Kurve im Bereich zwischen 4 nM und 40 nM linear genähert und ΔC anhand der Steigung dieses Kurvenabschnitts berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Diagramme in Abbildung 5-22 zeigen die Fluoreszenzintensität der gebundenen Analytmoleküle in Abhängigkeit von der eingesetzten Analytkonzentration. Die Linien, die den Datenpunkten unterlegt wurden, sind lineare Kurvenanpassungen an die Daten. Das Übersichtsdiagramm deckt den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ab und zeigt die obere Grenze des dynamischen Bereichs. In der Detaildarstellung des unteren Konzentrationsbereichs ist die Nachweisgrenze des Systems zu erkennen.

Probenkonzentrationen oberhalb 5 nM resultierten in einer Sättigung der Affinitätsoberfläche. Die obere Grenze des *linearen* dynamischen Bereichs des Systems lag bei 5 nM. Für Konzentrationen bis 50 nM verfügte das System über eine ausreichend große Empfindlichkeit um Analytkonzentrationen mit einer Auflösung von 2,1 zu bestimmen. Im unteren Konzentrationsbereich konnten Konzentrationen unterhalb 400 fM nicht mehr aufgelöst werden. Der gesamte dynamische Bereich des Systems überspannte somit fünf Größenordnungen. Der Bereich, in dem Konzentration und Signal in linearem Zusammenhang standen, umfasste vier Größenordnungen.

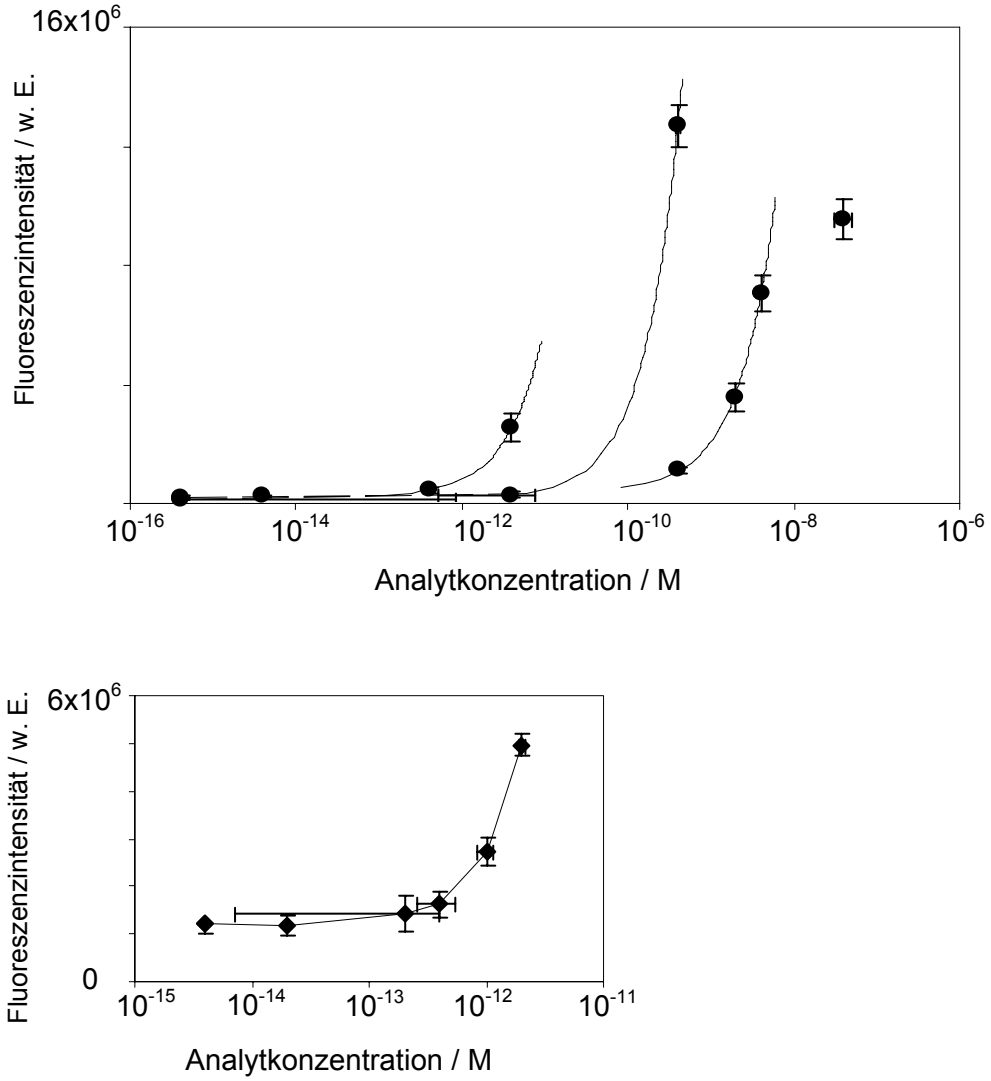

Abbildung 5-22

Fluoreszenzintensität gebundener bA647CytC Moleküle in Abhängigkeit von der eingesetzten Analytkonzentration (halblogarithmische Darstellung). Die Linien, die den Datenpunkten unterlegt wurden, sind lineare Kurvenanpassungen an die Daten. Die Kurve setzt sich aus Abschnitten unterschiedlicher Signalstärken zusammen, weil die Signale aufgrund des beschränkten dynamischen Bereichs des Fluoreszenzcanners mit verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommen werden mussten. Das Übersichtsdiagramm deckt den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ab und zeigt die obere Grenze des dynamischen Bereichs. In der Detaildarstellung des unteren Konzentrationsbereichs ist die Nachweisgrenze des Systems zu erkennen.

5.11 Simultaner Nachweis von Antigenen und Antikörpern: modulare Oberflächen aus Nanopartikelschichten bieten flexible Kopplungschemie zum Aufbau optimierter Multichips für diagnostische Zwecke

Affinitätsoberflächen aus mikrostrukturierten Nanopartikelschichten bieten die Möglichkeit, unterschiedliche Rezeptormoleküle auf einer Chipoberfläche zu kombinieren. Die Abtrennung der Oberflächenchemie vom Mikrostruktuierungsprozess ermöglicht es dabei, den Kopplungsmechanismus, mit dem die Rezeptoren auf der Festkörperoberfläche verankert werden, individuell an die Beschaffenheit der Moleküle anzupassen. Aufgrund dieser Flexibilität können Chipoberflächen so gestaltet werden, dass zum Beispiel für diagnostisch relevante Krankheitsmarker sowohl Antikörper als auch Antigene als spezifische Fängermoleküle optimal immobilisiert werden können.

Die Notwendigkeit zur Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten ist unter anderem für die Erkennung von systemischen Pilzinfektionen belegt. Die Mortalitätsrate bei Candidiasis, einer systemischen Infektion mit dem Hefepilz *Candida*, liegt zwischen 40 % und 60 %. Der Grund für eine derart hohe Sterblichkeit liegt unter anderem darin, dass bis heute keine schnellen und zuverlässigen diagnostischen Testverfahren zur Verfügung stehen [118]. *Candida albicans* ist ein kommensalisch im Menschen vorkommender Pilz. Er kann jedoch in eine virulente Form übergehen und schwere Erkrankungen verursachen. Eine lebensbedrohliche systemische Candidiasis tritt meist bei Menschen auf, deren Immunsystem geschädigt ist. Die Identifizierung einer Candidiasis mittels bioptisch-histologischer Methoden ist aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der betroffenen Patienten oft nicht möglich. Andererseits dauert es jedoch häufig zu lange, das Ergebnis einer Kultivierung der Erreger abzuwarten. Als Alternative werden immunologische Blutuntersuchungen durchgeführt, um Antigene des Pilzes oder Antikörper gegen Pilz-Antigene im Blut der Patienten nachzuweisen. Die Aussagekraft von Antikörper-Nachweisen ist allerdings umstritten: Antikörper können nach einer Infektion lange im Blut erhalten bleiben, während sie bei immunsupprimierten Patienten gar nicht gebildet werden. Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse sind deshalb bei diesen Tests häufig. Sendid *et al.* haben außerdem anhand von Tests im ELISA-Format gezeigt, dass beispielsweise der Titer für das C*andida*-spezifische Antigen Mannan und der Titer für den Anti-Mannan Antikörper im Serum von Patienten mit Blut- oder Organ-Candidosis starken, gegenläufigen Schwankungen unterliegen. Sie schlagen deshalb vor, bei der routinemäßigen *Candida*-Diagnostik immer sowohl den Antigen- als auch den Antikörper-Titer zu testen [118]. Mitsutake *et al.* haben verschiedene immunologische Tests untersucht, die *Candida*-Antigene beispielsweise durch Agglutination von antikörperbeschichten Latexpartikeln nachweisen, und haben diese hinsichtlich ihrer Sensitivät

und Spezifität verglichen [119]. Auf der Grundlage ihrer Ergebnisse empfehlen die Autoren die Kombination verschiedener Tests, um eine verlässliche Diagnose bezüglich einer Candidiasis-Erkrankung zu gewährleisten.

Eine Verbesserung der diagnostischen Situation könnte diesen Studien zufolge erreicht werden, wenn in einem Test eine Vielzahl relevanter Krankheitsmarker abgefragt würde und wenn jeweils sowohl nach dem Antigen als auch nach zugehörigen Antikörpern gesucht würde.

Das Microarray-Format besitzt prinzipiell das Potenzial, Nachweise für verschiedene Krankheitsmarker in einen einzigen Test zu integrieren. Eine Testoberfläche zur Erkennung von Antigenen und Antikörpern erfordert die Immobilisierung der komplementären Antikörper und Antigene als spezifische Fängermoleküle. Die Verwendung von Nanopartikelsuspensionen ermöglicht es, die Kopplungschemie zunächst individuell auf die Immobilisierung der verschiedenen Molekülspezies zuzuschneiden und die biofunktionalisierten Partikel anschließend in einem einheitlichen Druckprozess auf ein Trägermaterial aufzudrucken.

Dieses Konzept zum modularen Aufbau eines Multifunktionstests wurde anhand von bi-funktionellen Nanopartikel-Microarrays erprobt. Nanopartikel, die mit einem *Candida*-Protein funktionalisiert waren und Nanopartikel, die mit dem Antikörper gegen dieses Protein funktionalisiert waren, wurden gemeinsam auf Glassubstrate gedruckt und zum spezifischen Einzelnachweis des Antigens und des Antikörpers sowie zum simultanen Nachweis beider Proteine verwendet. Als Modellsystem dienten das *Candida* Antigen *thiol-specific antioxidant-like protein 1* (Tsa1p) und ein polyklonaler Anti-Tsa1p Antikörper. Tsa1p ist ein differentiell exprimiertes Protein in *Candida albicans Z*ellen. In der Hyphenform des Pilzes ist es in großer Menge vorhanden [120] und konnte in der Zellwand nachgewiesen werden, während es in den kugeligen Hefezellen ausschließlich im Zellkern vorkommt [121]. Tsa1p könnte daher ein potentieller Kandidat für den Nachweis von Hyphenwachstum im menschlichen Organismus sein [121]. Das verwendete Tsa1p wurde rekombinant hergestellt und als Konjugat mit Maltose-bindendem Protein exprimiert (Tsa1p-MBP). Der polyklonale Anti-Tsa1p Antikörper wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit zwei c-terminalen Peptidsequenzen von Tsa1p erzeugt [122]. Beide Proteine wurden mir freundlicherweise von der Abteilung „Molekulare Biotechnologie“ von Herrn Dr. Steffen Rupp am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart zur Verfügung gestellt.

5.11.1 Gerichtete Immobilisierung von Anti-Tsa1p-Antikörpern über Protein G

Zur Erarbeitung der Kopplungsstrategie für den Anti-Tsa1p Antikörper wurden zwei verschiedene Anti-Tsa1p-funktionalisierte Partikelvarianten verglichen. Zum einen wurden die Antikörper gerichtet auf Protein G modifizierten Nanopartikel-Oberflächen immobilisiert, zum anderen

wurden Antikörper kovalent, in zufälliger Orientierung an Partikel angebunden. Die Antigen-Bindekapazität der Partikel-Oberflächen wurde in einem Microarray-Experiment verglichen.

Durchführung

Um Ergebnisse zu erhalten, die bezüglich der verbrauchten Antikörpermengen vergleichbar sind, wurden carboxy-modifizierte Partikel sowie Protein G-modifizierte Partikel jeweils mit derselben Menge Anti-Tsa1p umgesetzt. Für die kovalente, ungerichtete Anbindung wurde 1 mg carboxy-modifizierte Partikel mit 260 pmol Anti-Tsa1p und 480 pmol EDC in MES 45 umgesetzt. Für die gerichtete Anbindung wurde 1 mg Protein G-Partikel mit 260 pmol Anti-Tsa1 in MES 50 umgesetzt. Die Partikel wurden in PBS/Tr und PBS gewaschen und mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} in 5 % iger Trehaloselösung resuspendiert. Als Kontrollpartikel wurden Protein G-Partikel mit einer IgG-Fraktion aus Ziege umgesetzt.

Alle Partikel wurden auf PAH-beschichtete Glasobjektträger gedruckt. Die Arrays wurden in einer feuchten Kammer auf einem Wippschüttler zunächst eine Stunde mit 100 µL BSA-Lösung blockiert, die als Tropfen auf jeden Array aufgegeben wurde. Anschließend wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die Oberflächen wurden in derselben Weise 1 h mit 100 µL Analytlösung inkubiert. Die Analytlösungen waren 1 nM, 5 nM und 10 nM Alexa647-markiertes Tsa1p-MBP-Konjugat in Kälberserum. Die Waschschritte erfolgten standardmäßig in 80 mL PBS/Tr, PBS und Wasser.

Ergebnisse und Diskussion

Durch die gerichtete Anbindung des Anti-Tsa1p-Antikörpers auf Protein G-modifizierten Nanopartikel-Oberflächen konnte die Antigen-Bindekapazität der Partikel verbessert werden. Abbildung 5-23 zeigt die Fluoreszenzsignale von fluoreszenzmarkiertem Tsa1p-MBP, das an die Microspots aus Anti-Tsa1p modifizierten Nanopartikeln angebunden hat. Die Fluoreszenz-intensität diente als Maß für die Menge an gebundenem Tsa1p-MBP. Partikel, auf denen das Anti-Tsa1p über Protein G immobilisiert war, konnten zwischen 1,2- und 1,6-mal mehr Tsa1p-MBP binden als Partikel, die ungerichtet mit Anti-Tsa1p modifiziert worden waren. Die Signalsteigerung erreichte damit näherungsweise den Faktor 1,8, der auf der Grundlage der unterschiedlichen Bindekapazitäten der Partikel abgeschätzt wurde (Abschnitt 5.1.3). Der etwas niedrigere Wert ist möglicherweise dadurch bedingt, dass an die gerichtet immobilisierten IgG-Moleküle nicht, wie für die Abschätzung angenommen, je zwei Antigen-Moleküle anbinden, sondern dass auch hier sterische Behinderungen auftreten. Die gerichtete Immobilisierung erhöhte bei gleichem Antikörperverbrauch und bei gegebener Analytkonzentration die Menge an gebundenem Analyt, das heisst die Signalstärke, um 20 % bis 60 %.

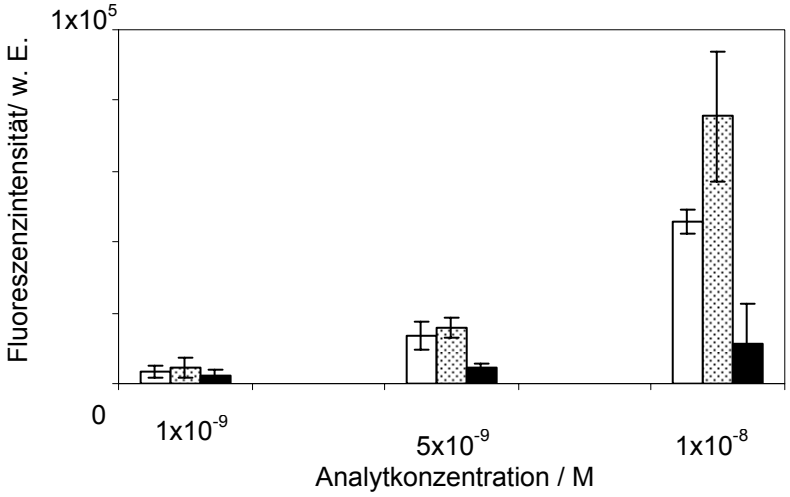

Abbildung 5-23

Fluoreszenzintensität von Alexa647-markiertem Tsa1p, das an Microspots aus Anti-Tsa1p Partikeln (□) beziehungsweise an Spots aus Protein G / Anti-Tsa1p Partikeln (▒) angebunden hat. Als Negativkontrolle dienten Spots aus Protein G /Ziege-IgG Partikeln (■).

5.11.2 Bindekapazität von Microspots aus Anti-Tsa1p-Antikörper-Partikeln

Zur Bestimmung der absoluten Bindekapazitäten von Microspots aus Anti-Tsa1p modifizierten Protein G Partikeln wurden die Signalintensitäten von Anti-Tsa1p Partikeln nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Tsa1p-MBP mit den Signalen von Kalibrierspots verglichen.

Um anhand der Bindekapazität der Anti-Tsa1p-Partikel-Spots auch die Fraktion aktiver Antikörper auf den Nanopartikel-Oberflächen abschätzen zu können, wurde außerdem die pro Spot verfügbare Antikörpermenge bestimmt. Hierfür wurden Protein G-Partikel gespottet und mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Tsa1p-Antikörper inkubiert, die somit nur den aus der Lösung zugänglichen Teil der Nanopartikel-Oberfläche belegten. Die Menge gebundener Antikörper wurde wiederum durch Vergleich der resultierenden Signale mit den Signalen von Kalibrierspots ermittelt.

Durchführung

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden wie in Abschnitt 5.3 beschrieben definierte Mengen von fluoreszenzmarkiertem Tsa1p-MBP beziehungsweise fluoreszenzmarkiertem Anti-Tsa1p-Antikörper mit Partikelsuspension (80 mg ml^{-1}) gemischt. Die Analytmengen wurden so gewählt, dass in 250 pL Suspension (5 hpd) 0,016 fmol, 0,049 fmol, 0,149 fmol, 0,44 fmol, 1,33 fmol und 4,0 fmol Tsa1p-MBP beziehungsweise 0,004 fmol, 0,02 fmol, 0,1 fmol und 0,5 fmol Anti-Tsa1p-Antikörper auf die Chip-Oberfläche übertragen wurden.

Protein G-Partikel und Anti-Tsa1p-modifizierte Protein G-Partikel wurden den Standard-protokollen entsprechend hergestellt und in Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von 80 mg mL^{-1} auf Glassubstrate gedruckt. Protein G-Partikel Arrays wurden 24 h in 2 nM Lösung des fluoreszenzmarkierten Anti-Tsa1p in 1 % iger BSA-Lösung in PBS inkubiert. Durch Vergleich der resultierenden Signale mit den Anti-Tsa1p Kalibrierstandards wurde auf die gebundene Antikörpermenge pro Microspot geschlossen. Die Anti-Tsa1p-Spots wurden in 2 nM Lösung des fluoreszenzmarkierten Tsa1p-MBP in 1 % BSA in PBS inkubiert und durch den Vergleich der resultierenden Signale mit den Tsa1p-MBP-Kalibrierstandards wurde die Analytbindekapazität der Nanopartikelspots bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich der Fluoreszenzsignale ergab, dass pro Microspot 0,25 ± 0,035 fmol Antikörpermoleküle auf der Spot-Oberfläche angebunden waren. Die an der Oberfläche der Nanopartikelspots zugängliche Antikörpermenge war damit zehn fach geringer als die 3,7 fmol, welche unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Abschnitt 5.1.3 rechnerisch auf der *Gesamt*oberfläche von 20 ng Partikeln (250 pL Suspension pro Spot, Feststoffgehalt 80 mg/mL) angebunden werden können.

Die Antikörper-modifizierten Nanopartikel-Oberflächen konnten dem Vergleich mit dem Kalibrierstandard zufolge pro Microspot 0,05 ± 0,008 fmol Tsa1p binden. Das Verhältnis von gebundenen Antigenmolekülen zu immobilisierten Fänger-Antikörpern war folglich 0,22.

Bei kovalenter gerichteter Immobilisierung von Antikörpern über oxidierte Zuckerreste wurden im Vergleich dazu Antigen-Antikörper-Verhältnisse von 0,6 bis 1,6 publiziert [105].

Bei der Entwicklung der Nanopartikel-basierten Protein-Biochips wurde die Stabilisierung der Proteine auf der Partikel-Oberfläche mit Hilfe von Trehalose optimiert. Außerdem konnte die Bindekapazität der Antikörper-Partikel durch den Wechsel von der ungerichteten Anbindung zur gerichteten Anbindung über Protein G auf das 1,6 fache gesteigert werden. Dennoch war die Antigen-Menge, die auf den Partikeln nachgewiesen wurde, im Verhältnis zu den vorhandenen Antikörpern gering. Aufgrund der genannten Ergebnisse wird in Betracht gezogen, dass während der Inkubations- und Waschschritte Antikörper oder Antikörper-Antigen-Komplexe von der Protein G-Oberfläche abgelöst wurden. Eine kovalente Quervernetzung zwischen Protein G und Antikörpern könnte die Antikörperfunktionalisierung der Partikel-Oberfläche stabilisieren.

5.11.3 Nachweisgrenze für Tsa1p und Anti-Tsa1p

Zur Erprobung der Bindeeigenschaften einer bifunktionellen Microarray-Oberfläche aus Protein G-Anti-Tsa1p-modifizierten Nanopartikeln und Tsa1p-MBP-modifizierten Nanopartikeln wurden Chips mit beiden Funktionalitäten gedruckt. Die Chip-Oberfläche wurde zunächst separat mit fluoreszenzmarkiertem Tsa1p-MBP und fluoreszenzmarkiertem Anti-Tsa1p in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert, um in einfachen Testsystemen mit direkt markierten Analytsubstanzen die Nachweisgrenze der Microarrays zu bestimmen. Um eine reale Probenzusammensetzung zu simulieren, wurden die Analytsubstanzen in Kälberserum appliziert [123].

Durchführung

Ein Milligramm Protein G-Partikel wurde mit 260 pmol Anti-Tsa1 in MES 50 umgesetzt. Als Kontrollpartikel wurden in der gleichen Weise Protein G-Partikel mit Ziege-IgG modifiziert. Außerdem wurde ein Milligramm COOH-Partikel mit 270 pmol Tsa1p-MBP und 480 pmol EDC in MES 45 umgesetzt. Als Kontrollpartikel wurden in der gleichen Weise COOH-Partikel mit MBP modifiziert. Die Partikel wurden mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} in 5 % iger Trehaloselösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden im Microarray-Format auf PAH-beschichtete Glasobjektträger gedruckt. Die Chips wurden wie in Abschnitt 5.11.1 beschrieben blockiert, inkubiert und gewaschen. Die verwendeten Analytlösungen waren 100 pM, 500 pM, 1 nM, 5 nM und 10 nM Alexa647-markiertes Tsa1p-MBP oder Alexa647-markiertes Anti-Tsa1p in Kälberserum.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-24 zeigt die Fluoreszenzsignale der Anti-Tsa1p- und Tsa1p-MBP-modifizierten Microspots nach Inkubation mit den Analytlösungen. Zum Vergleich sind die Signale von Ziege-IgG- und MBP-modifizierten Kontrollpartikeln eingefügt. Der fluoreszenzmarkierte Anti-Tsa1p Antikörper konnte auf den Tsa1p-MBP-modifizierten Partikelspots nachgewiesen werden, sofern die Antikörperkonzentration in der Probe 5 nM oder höher war. Das fluoreszenzmarkierte Tsa1p-MBP Konjugat konnte auf Anti-Tsa1p Partikeln ebenfalls ab einer Konzentration von 5 nM detektiert werden. Die Nachweisgrenze für Tsa1p sowie für Anti-Tsa1p lag damit um etwa vier Größenordnungen höher als bei dem in Kapitel 5.10 beschriebenen Streptavidin-Biotin-Modellsystem, für das eine Nachweisgrenze von 400 fM bestimmt wurde. Dieser Unterschied lässt sich auf die unterschiedlichen Assoziationskonstanten der beiden Affinitätssysteme und auf die unterschiedlichen Bindekapazitäten der Spots zurückführen. Nach Gleichung 4-12 lässt sich abschätzen, dass mit dem eingesetzten Probenvolumen von 250 µL, einer Assoziationskonstanten des Antigen-Antikörper Systems von $K_{a\ IgG\text{-}Antigen} = 10^{10}$ und der

Bindekapazität von 0,025 fmol Antigen pro Microspot bei einer Analytkonzentration von 5 nM im thermodynamischen Gleichgewicht pro Spot etwa 1×10^{-13} mol Analytmoleküle gebunden vorlagen. Diese Menge markiert demnach theoretisch die Nachweisgrenze des Detektionssystems. Das Streptavidin-Biotin-System weist eine fünffach größere Assoziationskonstante $K_{a\ Sav\text{-}Biotin} = 10^{15}$ auf und für die Streptavidinpartikel-Spots wurde eine 100 fach größere Bindekapazität bestimmt. Mit diesen Annahmen lässt sich voraussagen, dass die Menge von 1×10^{-13} mol Analytmolekülen pro Spot bei einer vier Größenordnungen kleineren Analytkonzentration gebunden vorliegt.

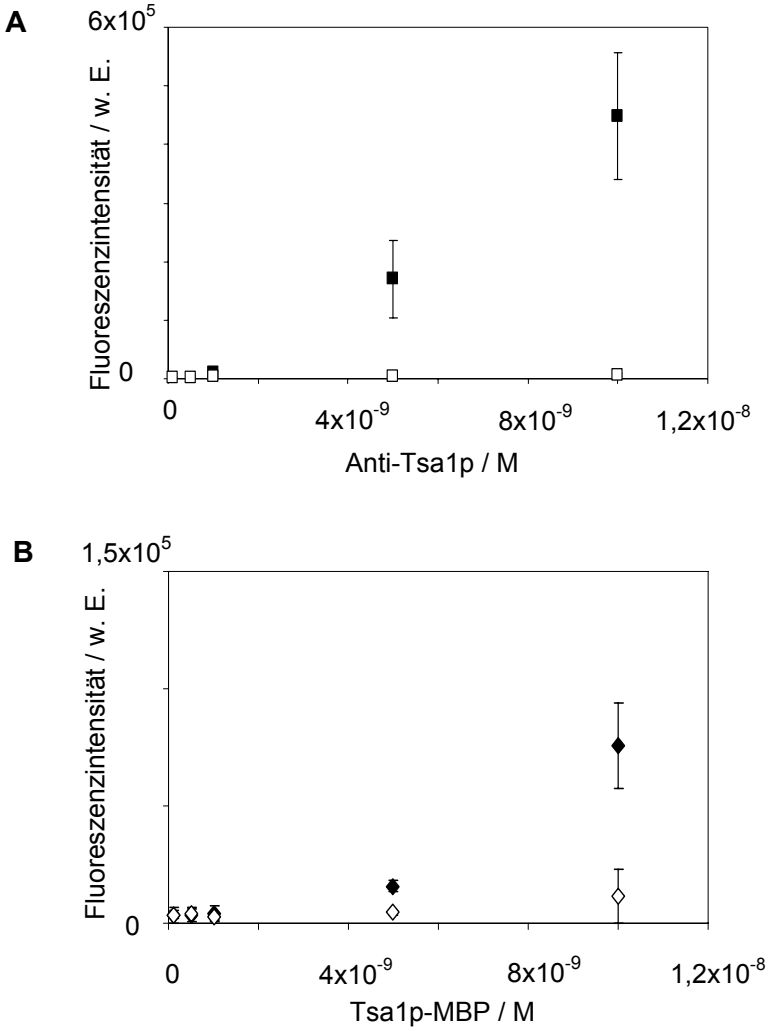

Abbildung 5-24

A Anti-Tsa1p Signale von Microspots aus Tsa1p-MBP-modifizierten Partikeln (■) und MBP-modifizierten Kontrollpartikeln (□) in Abhängigkeit von der Anti-Tsa1p Konzentration in der Probe. **B** Tsa1p-MBP Signale auf Anti-Tsa1p Partikeln (♦) und auf Ziege-IgG Kontrollpartikeln (◊) in Abhängigkeit von der Tsa1p-MBP Konzentration in der Probe. Die Ordinaten der Schaubilder sind unterschiedlich skaliert.

Eine Absenkung der Nachweisgrenze zu niedrigeren Analytkonzentrationen kann durch höhere Assoziationskonstanten, also durch Verwendung von hochaffinen Antikörpern erreicht werden, oder über eine Verbesserung der Partikelbelegung mit nativen und gut zugänglichen Antikörpern. Wie die Ergebnisse in Abschnitt 5.1.3 ergaben, lässt sich die Antikörperdichte auf den Protein G-Partikeloberflächen durch Erhöhung der zur Funktionalisierung eingesetzten Antikörpermenge steigern. Die kovalente Vernetzung von Fänger-Antikörper und Protein G mit einem Crosslinker könnte verhindern, dass Antikörper oder Antigen-Antikörper-Komplexe während der Wasch- und Inkubationsprozesse von den Partikeloberflächen abdiffundieren.

5.11.4 Simultaner Nachweis von Tsa1p und Anti-Tsa1p-Antikörpern

Zur Erprobung eines Testsystems für den simultanen oder alternativen Nachweis von Tsa1p und Anti-Tsa1p-Antikörpern wurden Microarrays aus Anti-Tsa1p-modifizierten und Tsa1p-modifizierten Nanopartikeln gedruckt. Die bi-funktionellen Chips wurden mit fluoreszenzmarkiertem Tsa1p-MBP oder fluoreszenzmarkiertem Anti-Tsa1p sowie mit einer Mischung aus beiden Analyten inkubiert [123].

Durchführung

Ein Milligramm Protein G-Partikel wurde mit 260 pmol Anti-Tsa1 in MES 50 umgesetzt. Als Kontrollpartikel wurden in der gleichen Weise Protein G-Partikel mit Ziege-IgG modifiziert. Außerdem wurde ein Milligramm COOH Partikel mit 270 pmol Tsa1p-MBP und 480 pmol EDC in MES 45 umgesetzt. Als Kontrollpartikel wurden in der gleichen Weise COOH-Partikel mit MBP modifiziert. Die Partikel wurden in PBS/Tr und PBS gewaschen und mit einem Feststoffgehalt von 20 mg mL^{-1} in 5 % iger Trehaloselösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden im Microarray-Format auf PAH-beschichtete Glasobjektträger gedruckt. Die Chips wurden in 100 pM Alexa 647-markiertem Anti-Tsa1p oder in 600 pM Alexa647-markiertem Tsa1p-MBP beziehungsweise in 100 pM Alexa647-markiertem Anti-Tsa1p mit 600 pM, 120 pM, 24 pM oder 4,8 pM Alexa647-markiertem Tsa1p-MBP in PBS inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 5-25 **A** sind Fluoreszenzscans der Chip-Oberflächen nach Inkubation mit markiertem Anti-Tsa1p (oben), nach Inkubation mit markiertem Tsa1p-MBP (Mitte) und nach Inkubation mit einer Mischung aus beiden Analyten (unten) zu sehen. Anti-Tsa1p konnte nur auf Tsa1p-MBP modifizierten Partikel-Oberflächen nachgewiesen werden, während Tsa1p-MBP spezifisch an Anti-Tsa1p modifizierte Partikel-Oberflächen angebunden hat. Tsa1p-MBP

adsorbierte außerdem unspezifisch an die beschichtete Glasoberfläche, nicht jedoch an die biofunktionalisierten Nanopartikelschichten. Daraus resultierten für alle Spots, die keine spezifische Tsa1p Affinität aufwiesen, zahlenmäßig negative Signalintensitäten.

Bei der Inkubation mit unterschiedlichen Tsa1p-MBP Konzentrationen und konstanter Anti-Tsa1p Konzentration spiegelte sich die Antigen-Antikörper-Komplexbildung in Lösung in den Signalintensitäten auf der Chipoberfläche. Abbildung 5-25 **B** zeigt ein hohes Signal der Antikörper-Spots bei hoher Antigen-Konzentration in der Probe. Die Antikörpermoleküle in der Probe komplexierten jedoch offenbar in Lösung mit den im Überschuss vorhandenen Antigenmolekülen und standen für die Anbindung an die Tsa1p-MBP-modifizierten Microspot-Oberflächen nicht zur Verfügung, es resultierte ein negatives Signal der Tsa1p-MBP-modifizierten Partikel. Negative Signalintensitäten ergaben sich, weil Tsa1p-MBP unspezifisch an das Substrat adsorbierte und eine Hintergrundfluoreszenz verursachte. Mit abnehmender Tsa1p-MBP Konzentration in der Probe nahmen auch die Komplexbildung in Lösung und die unspezifische Adsorption ab. Anti-Tsa1p war daher zunehmend auf den Tsa1p-MBP-modifizierten Partikeln nachzuweisen, während das Tsa1p-MBP-Signal auf den Anti-Tsa1p Partikeln schwächer wurde. Unterhalb einer Konzentration von 120 pM Tsa1p-MBP in der Probe war das Tsa1p-Signal nicht mehr von Rauschen zu unterscheiden. Die Abnahme des Hintergrundsignals wurde durch die betragsmäßige Signalverminderung der Kontrollspots angezeigt.

An dem Tsa1p / Anti-Tsa1p System wurde in miniaturisiertem Testformat simultan sowohl das Vorhandensein eines Antigens als auch das Vorhandensein des komplementären Antikörpers in einer Probe abgefragt. In dem verwendeten Testsystem, in dem der Molekül-Nachweis in Pufferlösung und anhand von direkt markierten Analytmolekülen durchgeführt wurde, konnten Antikörper und Antigene gleichzeitig auf der Chipoberfläche nachgewiesen werden, wenn bei einer Antikörper-Konzentration von 100 pM das Antigen ein- bis fünffach stärker konzentriert war. Noch höhere Antigen-Konzentrationen resultierten ausschließlich in Antigen-Signal, kleinere Antigen-Konzentrationen dagegen ausschließlich in Antikörper-Signal. Bei einer Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses von Antigenen und Antikörpern im Blut von Patienten, könnte ein derart bifunktionell angelegter Test demnach eine Infektion flexibel anhand des Antigen- *oder* Antikörpervorkommens detektieren. Mehrere, zeitversetzte Untersuchungen könnten außerdem darüber Aufschluss geben, ob das Immunsystem eines Patienten gegen den Erreger aktiv wird.

Tsa1p ist ein stark exprimiertes Protein in *Candida albicans* [120] und könnte daher in Proben von Patienten mit systemischer Candidose nachweisbar sein. Obwohl es Bestandteil der Zellwände der Pilzhyphen ist, gehört es einer Studie von Pitarch *et al.* zufolge jedoch nicht zu den explizit immunogenen Faktoren bei einer Pilzinfektion [124]. Es ist deshalb für einen realen

diagnostischen Test zur Detektion von Anti-*Candida* Antikörpern vermutlich nicht unmittelbar geeignet. Eine Anpassung an medizinisch relevante Analytsubstanzen sowie eine Erweiterung auf ein relevantes Set an spezifischen Markern für Pilzinfektionen könnte jedoch die Grundlage für einen multiplen Nachweis-Chip darstellen, der die geforderten Mehrfachabsicherungen bei der *Candida*-Diagnostik in einen Test integriert.

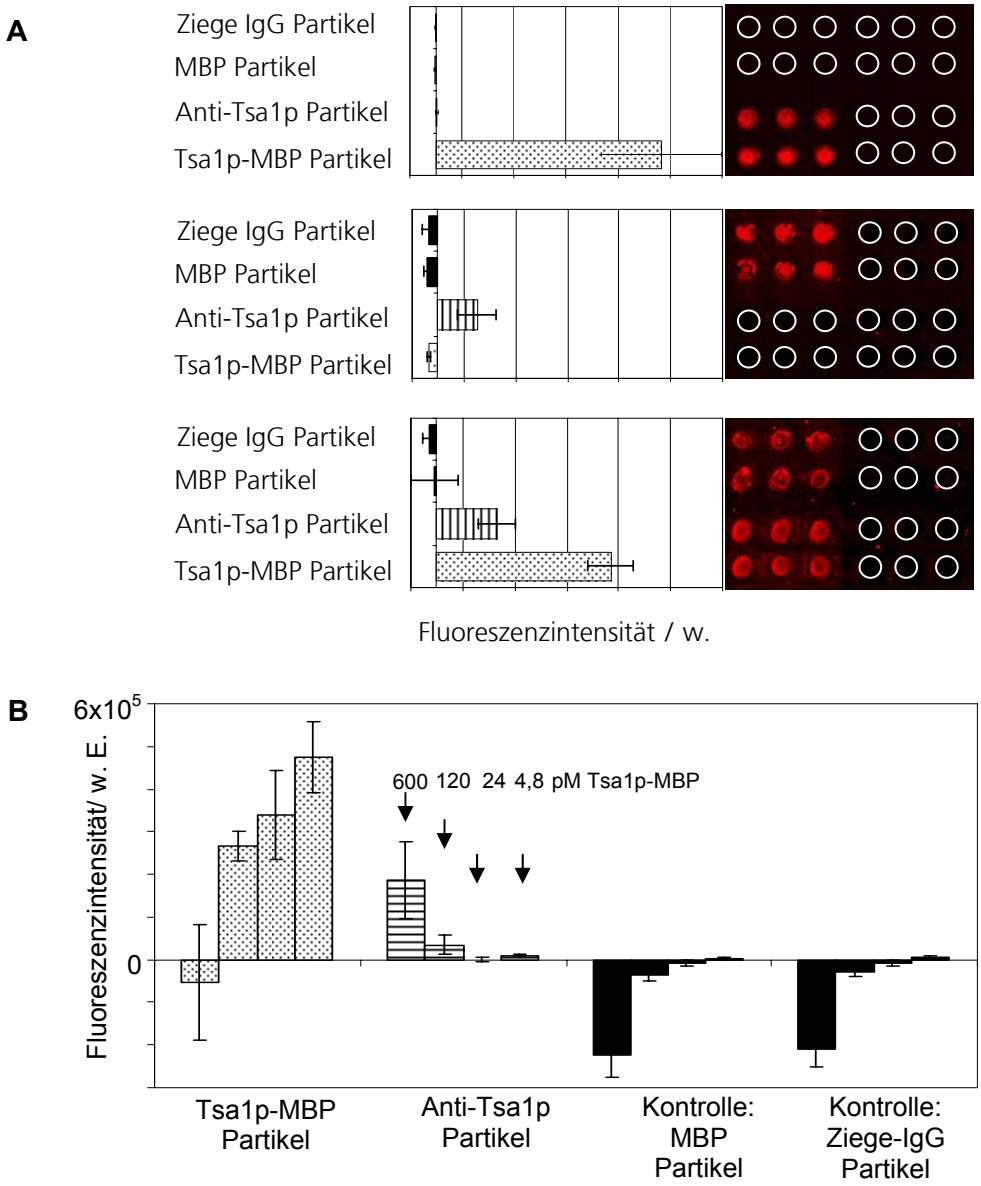

Abbildung 5-25

A Signalintensitäten von Nanopartikelspots der angegebenen Modifizierungen nach Inkubation mit 100 pM Alexa 647-markiertem Anti-Tsa1p (oben), mit 600 pM Alexa 647-markiertem Tsa1p-MBP (Mitte) oder mit einer Mischung aus markiertem Anti-Tsa1p (50 pM) und markiertem Tsa1p-MBP (100 pM) (unten). Die Abbildungen der Fluoreszenzscans in Falschfarbendarstellung (rechts) wurden verschieden stark aufgehellt, die Helligkeit der Spots entspricht daher nicht den tatsächlichen Fluoreszenzintensitäten. Diese sind in den Balkendiagrammen dargestellt. **B** Signalintensitäten der Nanopartikel-Mikrospots nach Inkubation mit 100 pM Alexa 647-markiertem Anti-Tsa1p und Alexa 647-markiertem Tsa1p-MBP in den angegebenen Konzentrationen. Jede Säule stellt den Mittelwert des Signals von 27 Spots auf 3 Chips dar (N 27/3).

5.12 Analytdetektion an Nanopartikelschichten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen oder Protein-Fragmenten liefert im Idealfall Massenspektren mit einer Auflösung, die verschiedene Isotopen einer Analytsubstanzen in einzelne Signale aufzutrennen vermag. Die genaue Kenntnis der Masse kann die Identifizierung einer Substanz ermöglichen. Insbesondere in der Proteinanalytik kann sie beispielsweise auch Auskunft über posttranslationale Modifikationen an Proteinen geben, die unter anderem den Aktivitätsstatus eines Proteins bestimmen. Um hochaufgelöste Massenspektren zu erhalten, muss die Komplexität einer Probe soweit wie möglich reduziert werden. Eine Fraktionierung von komplexen Proteinproben geschieht heute standardmäßig über Auftrennung mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese oder mittels chromatographischer Verfahren. Microarrays, die Analytmoleküle auf Affinitätsoberflächen mit spezifischen Fängermolekülen aufkonzentrieren, bieten eine neue Plattform, um eine Probe gezielt vorzufraktionieren und möglicherweise direkt mit Massenspektrometrie zu analysieren. Für eine massenspektrometrische Auslese von Microarray-Oberflächen sind auf gerätetechnischer Seite Spektrometer mit hoher lateraler Auflösung notwendig. Geeignete Biochip-Oberflächen müssen andererseits eine große Bindekapazität besitzen, um eine für massenspektrometrische Messungen ausreichende Analytmenge zu immobilisieren. Mit modernen MALDI-TOF Massenspektrometern gelingen auf planaren Standard-Probenträgern Nachweise von Analytmengen oberhalb 500 amol [125]. Microarrays aus Streptavidin-Partikeln erreichten Bindekapazitäten von ~4 fmol pro Spot (Abschnitt 5.3). Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln besitzen demnach das Potenzial als miniaturisierte Affinitäts-Oberflächen die Präparation von MALDI-Proben zu vereinfachen und zu parallelisieren [126]. Zur Vereinfachung der Probenpräparation wurden auch in der Vergangenheit bereits in mehreren Arbeiten MALDI-TOF Messungen direkt an Trägermaterialien mit spezifischer Affinität für die Analytmoleküle vorgenommen [127-129]. Bei Messungen an Agarose-Beads aus Chromatographie-Säulen erwies sich die Inhomogenität der Proben-Oberfläche als problematisch. Die Unebenheiten riefen Differenzen in den Flugzeiten hervor und beeinträchtigten dadurch die Auflösung und die Massengenauigkeit der Messungen. Papac *et al.* stellten bei Messungen an Agarose-Beads mit einem Durchmesser von ~100 µm eine Massenungenauigkeit von weniger als 0,3 % fest. Barbacci *et al.* haben anhand eines von ihnen erarbeiteten mathematischen Modells zur Simulation des Ionen-Flugs in MALDI-TOF Geräten berechnet, welchen Einfluss Positionsunterschiede der Analytmoleküle zum Zeitpunkt der Desorption auf die Auflösung der Massenspektren haben. Ihrer Abschätzung zufolge resultieren Höhenunterschieden in der Probenverteilung von bis zu 100 µm in einer 30 fach verringerten Auflösung, wenn in Massenspektrometern mit linearer Flugrohrgeometrie das

Beschleunigungsfeld zeitgleich mit dem Laserpuls eingeschaltet wird [130]. Zur Vereinheitlichung der kinetischen Energien und zur Fokussierung der räumlichen Verteilung von Ionen identischer Masse wird in modernen Geräten das Beschleunigungsfeld mit einer kurzen zeitlichen Verzögerung nach dem Laserpuls eingeschaltet (*Time-Lag Focusing TLF, Delayed Extraction DE, Pulsed Ion Extraction PIE*) [131, 132] und die Ionen werden im Flugrohr an einem entgegengesetzt gepolten Feld reflektiert. Unter diesen Bedingungen verschlechtert sich die Auflösung durch Unebenheiten in der Größenordnung 100 µm theoretisch um den Faktor 10. Zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten wurden bisher Techniken entwickelt, um die Analytmoleküle direkt vor der Messung in kleinen Volumina der lichtabsorbierenden Matrix von den Beads zu eluieren [133, 134]. Flad *et al.* haben gezeigt, dass MHC-Peptide, die in Suspension auf biofunktionalisierten Silica-Nanopartikeln immobilisiert worden waren, auch direkt auf der Partikel-Oberfläche mit MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten [115]. Die Partikel waren kompatibel mit der MALDI-MS Methode und eine Abtrennung der Analytmoleküle von den Nanopartikel-Oberflächen vor der Messung war nicht notwendig. Weber *et al.* haben gezeigt, dass standardmäßiges Blockieren der nanopartikulären Affinitätsoberflächen mittels BSA-Lösung die unspezifische Adsorption von Proteinen während der Proben-Inkubation minimiert [135].

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an Nanopartikel-Microspots haben ergeben, dass die Dicke der gedruckten Nanopartikelschichten kleiner als 1 µm waren (Abschnitt 5.2.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln als Affinitätsoberfläche für den Proteinnachweis mittels MALDI Massenspektrometrie geeignet sind.

5.12.1 Massenspektrometrischer Protein-Nachweis an biofunktionalisierten Nanopartikel-schichten

Zunächst wurde untersucht, ob Stoffgemische mit Hilfe von Affinitätsoberflächen aus biofunktionalisierten Nanopartikeln aufgetrennt werden können und ob die immobilisierten Moleküle anschließend mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf den Nanopartikel-Schichten nachzuweisen sind. Dazu wurden Probenträger mit Streptavidin-Nanopartikeln beschichtet und mit einer Mischung aus biotinylierten und nicht-biotinylierten Insulinfraktionen inkubiert. Anschließend wurden Moleküle, die an die nanopartikulären Affinitätsschichten gebunden waren, mittels MALDI-Massenspektrometrie detektiert.

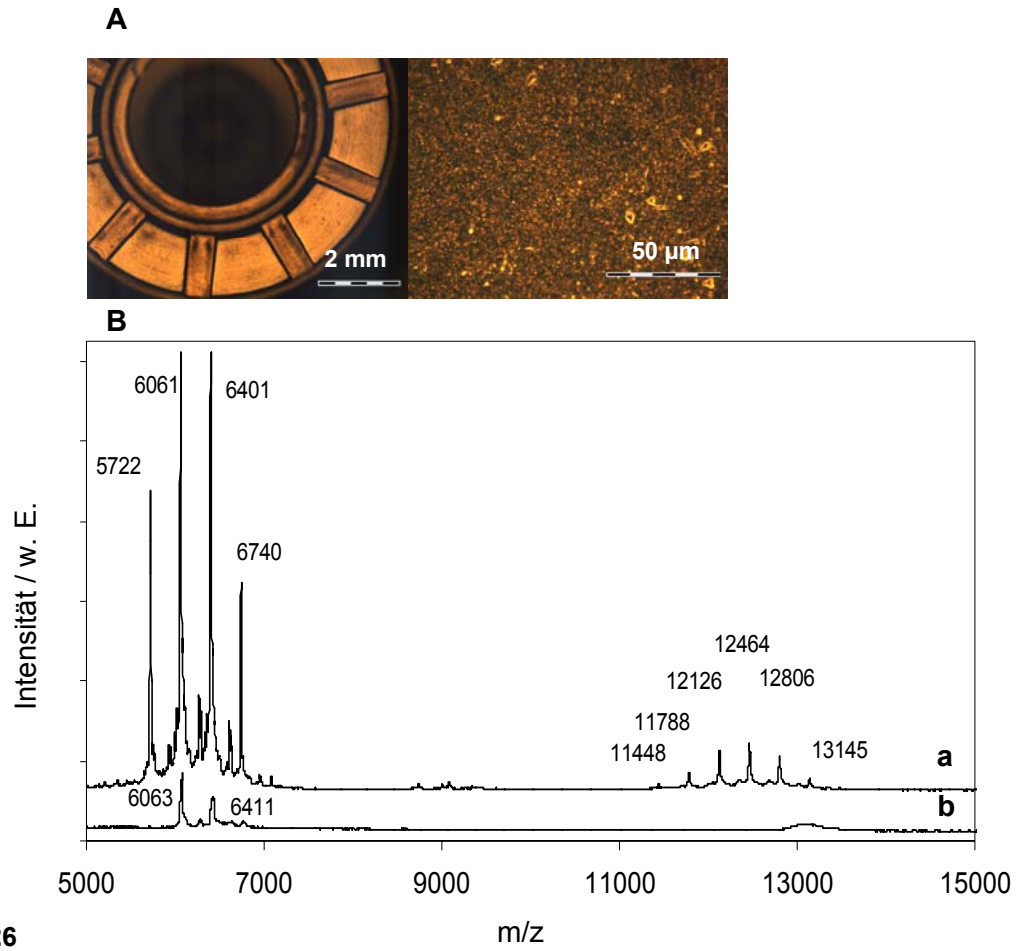

Abbildung 5-26

A Lichtmikroskopische Aufnahmen des MALDI Probenträgers (links) und einer partikelbeschichteten Targetfläche vor Matrixaufgabe (rechts). **B** Massenspektren der Analytlösung (Spektrum **a**) und der Moleküle, die auf der Streptavidin-Partikelschicht angebunden haben (Spektrum **b**). Die Beschriftungen sind die Massen der protonierten Moleküle in Dalton. Die Grundlinie von Spektrum A wurde der Übersichtlichkeit wegen nach oben versetzt. In Spektrum **a** sind die Signale von unbiotinylierem Biotin (theoretische Masse 5734,6 Da) und von einfach, zweifach und dreifach biotinylierten Insulinfraktionen zu sehen. Jede Biotin-Einheit vergrößerte die Molekülmasse des Biotin-Insulin-Konjugats um 340 Da. Die zweite Peak-Schar in Spektrum 1 zeigt an, dass auch Dimere der Biotin-Insulin-Konjugate in der Lösung vorkamen. In Spektrum **b** sind nach Inkubation und Waschschritten nur biotinylierte Insulin Fraktionen zu erkennen und ein breites Signal bei 13 000 Da, der von Streptavidin-Monomeren herrührt.

Durchführung

Für die flächige Belegung eines goldbeschichteten Probenträgers des HP 2025A Massenspektrometers mit Streptavidin-modifizierten Nanopartikeln wurde der Träger zunächst mit einer Polyelektrolyt-Dreifachschicht aus PAH und PAA funktionalisiert. Anschließend wurden 2 µL einer 20 mg mL^{-1} Streptavidin-Nanopartikel Suspension in 5 % iger Trehaloselösung auf jedes Target pipettiert. Nachdem der Tropfen eingetrocknet war, wurden noch zwei Mal je 2 µL Suspension auf jedes Target aufgegeben. Die Partikelschichten wurden durch Immersion des Probenträgers in 3 % iger BSA-Lösung in PBS blockiert und anschließend 2 h in 260 pM Biotin-Insulin Lösung

inkubiert, wobei die Analytlösung leicht gerührt wurde. Nach der Inkubation wurde der Probenträger je 30 min in PBS/Tr, PBS und Wasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Vor der Messung wurden die Partikelschichten mit 0,5 µL gesättigter Sinapinsäurelösung in Acetonitril / 0,1 - TFA (40:60, Volumen/Volumen) überschichtet. Die Spektren wurden mit dem HP 2520A MALDI-TOF-Massenspektrometer aufgenommen. Mit diesem Gerät werden Auflösungen von maximal 2000 erreicht.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-26 **A** zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen des partikelbeschichteten MALDI Probenträgers. Bei 1 000 facher Vergrößerung war die Partikelbeschichtung anhand des inhomogenen Streulichts von der Targetoberfläche erkennbar.

Spektrum **a** in Abbildung 5-26 **B** wurde an der Probelösung aufgenommen, in welcher der Streptavidinpartikel-beschichtete Probenträger inkubiert wurde. Spektrum **b** wurde nach Inkubation mit der Probelösung und anschließenden Wachschritten direkt an der Partikel-Oberfläche aufgenommen. Im Spektrum der Probelösung war zu erkennen, dass die Probe unbiotinyliertes Insulin (theoretische Masse des protonierten Moleküls $[M+H]^+$ = 5734,6 Da) sowie einfach, zweifach und dreifach biotinyliertes Insulin enthielt. Insulin besitzt drei primäre Aminogruppen, zwei α-Aminogruppen und eine Lysin-Seitenkette, die für die Biotinylierung mit einem elektrophilen Reagenz verfügbar sind. Jede Biotin-Einheit erhöhte das Molekulargewicht des Insulin-Biotin Konjugats um 340 Da. Die Peak-Schar in Spektrum **a** oberhalb 11 442 Da zeigt an, dass auch Insulin-Insulin-Biotin Konjugate in der Lösung vorlagen.

Messungen an der Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikel-Schicht nach Inkubation in der Probelösung wiesen ausschließlich biotinyliertes Insulin an der Oberfläche nach. Die Partikelschicht fungierte demnach als spezifische Affinitätsoberfläche, die die Zielmoleküle aus der Probemischung abtrennte. Der MALDI-Prozess eluierte den biotinylierten Analyten von den Streptavidin-Partikeln. Das breite Signal bei 13 000 Da weist darauf hin, dass das Streptavidin-Tetramer, dessen vier Untereinheiten nicht kovalent miteinander verknüpft sind, während des MALDI Prozesses denaturiert wurde und dass Streptavidin-Monomere von der Partikel-oberfläche desorbierten. Die Verschiebung des Masse-zu-Ladung Signals von biotinyliertem Insulin bei Messungen auf den Nanopartikel-Schichten betrug im Vergleich zu Messungen an gelöstem Insulin 0,3 ‰ und war damit um eine Größenordnung kleiner als bei Messungen an Microbeads [127]. Wie im nächsten Abschnitt deutlich wird, war eine Verschlechterung der Auflösung aufgrund der nanoskopischen Unebenheiten der Probenoberfläche durch die Nanopartikelbeschichtung vernachlässigbar. Die Signalverschiebung kann jedoch auf die geringe

Signalintensität zurückzuführen sein, die eine akurate Bestimmung der Molekülmasse erschwerte.

5.12.2 Nachweis von einem Femtomol Neurotensin in Nanopartikel-Microspots

Eine Miniaturisierung der Affinitätsoberflächen für die Adsorption von Analytmoleküle bedingt, dass insgesamt weniger Analyt für die Messung zur Verfügung steht als auf makroskopischen Probenträgern. Um abzuschätzen, wie viel Analyt pro Microspot vorliegen muss, damit eine massenspektrometrische Untersuchung möglich ist, wurde eine definierte Analytmenge in Nanopartikel-Spots mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Durchführung

Das Peptid Neurotensin (theoretische Masse $[M+H]^+$ = 1672,92 Da) wurde als Modell-Analyt in einer Konzentration von 4 µM in einer Nanopartikel-Suspension mit 20 mg mL^{-1} Feststoffgehalt gelöst. Die Nanopartikel besaßen carboxylfunktionalisierte Oberflächen. Mit Hilfe eines Nadel-Ring Druckers wurden vier Spots á 250 pL auf die Oberfläche von PAH-beschichteten Siliziumwafern gedruckt. In jedem Nanopartikel-Spot war dementsprechend 1 fmol Neurotensin enthalten. Abbildung 5-27 **A** zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der Chipoberfläche. Da das hauseigene HP 2025 A Massenspektrometer nicht mit einer Kamera in der Ionenquelle ausgestattet ist, konnten gezielte ortsaufgelöste Messungen nicht durchgeführt werden. Die mikrostrukturierten Nanopartikelschichten wurden freundlicherweise bei der Firma Bruker Daltonik GmbH in Bremen analysiert. Die bedruckten Silizium-Oberflächen wurden mit fein vernebelter Lösung aus 5 mg mL^{-1} α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in Methanol / Aceton (50/50, v/v) besprüht und mit einem Ultraflex II Massenspektrometer analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Messungen an den Nanopartikelspots auf Siliziumoberflächen lieferten bei allen Spots Neurotensin-Signale in Isotopenauflösung. Die Spektren, die auf den Spotflächen aufgenommen wurden, sind in Abbildung 5-27 **B** dargestellt. In den Bereichen zwischen den Spots wurde kein Neurotensin nachgewiesen. Der Analyt diffundierte folglich nicht nachweisbar aus den Mikrostrukturen heraus. Die anhand von externer Kalibrierung ermittelte Masse von 1673,41 Da für protoniertes Neurotensin stimmte sehr gut mit der theoretischen Masse von 1672,92 Da überein. Eine Molekülmenge von 1 fmol pro Spot war ausreichend um massenspektrometrische Untersuchungen an Analytmolekülen vorzunehmen, die integriert in die dreidimensionale Mikrostruktur einer Nanopartikelschicht vorlagen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bindekapazität von Nanopartikelspots (Abschnitt 5.3) haben gezeigt, dass pro Spot 2 - 4 fmol

Analyt gebunden werden konnten. Die große spezifische Affinitätsoberfläche der mikrostrukturierten Nanopartikelschichten kann bei ausreichender Analytmenge in der Probe massenspektrometrische Analysen an Microarray-Oberflächen ermöglichen.

Nanopartikelschichten waren demnach mit MALDI-TOF Massenspektrometrie kompatibel und kleine Analytmengen von 1 fmol konnten mit hoher Massengenauigkeit und in Isotopenauflösung nachgewiesen werden.

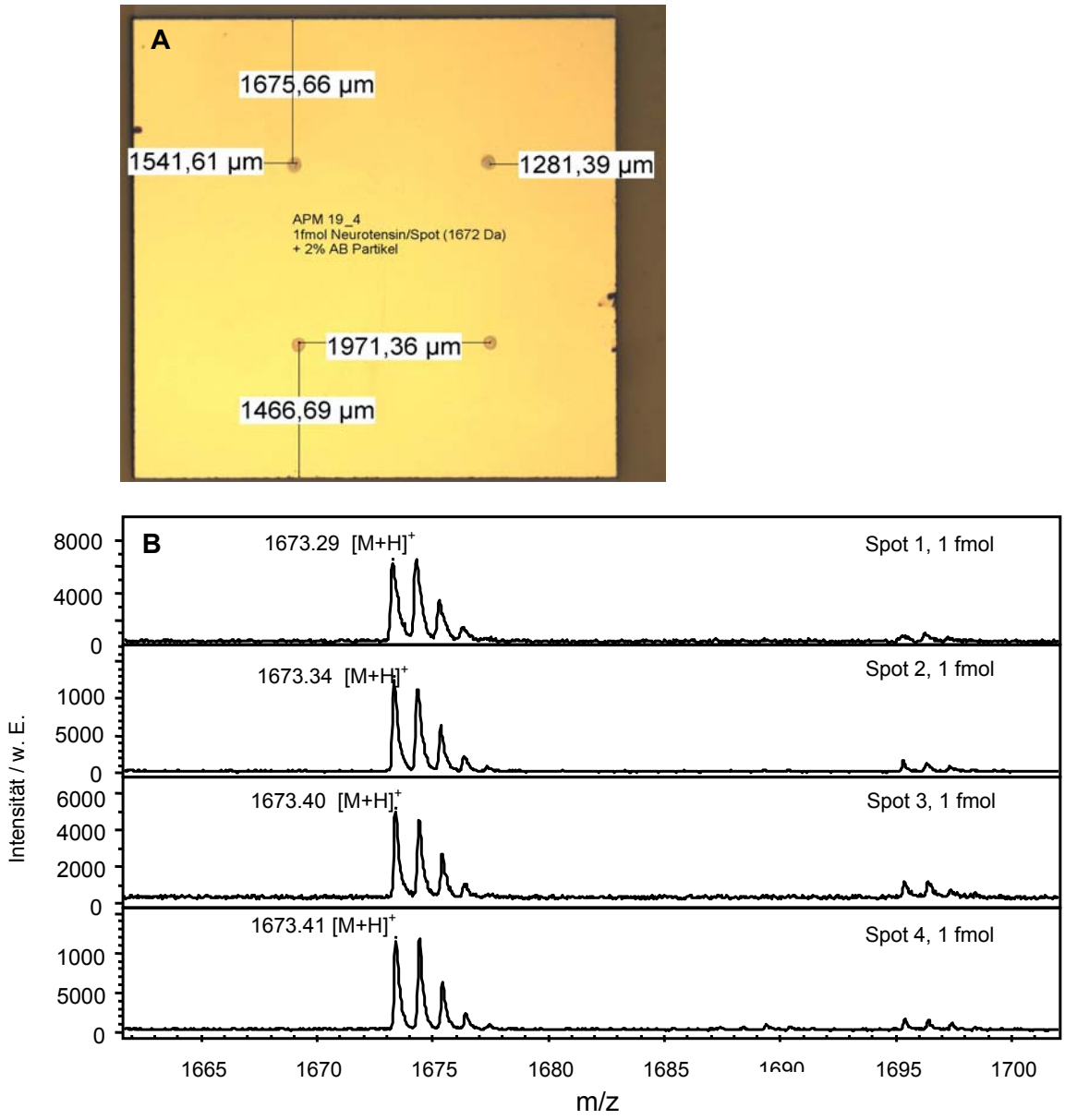

Abbildung 5-27

A Lichtmikroskopische Aufnahme (25x) von vier Microspots aus Nanopartikelsuspension mit definiertem Analytgehalt: 250 µL carboxylfunktionalisierte Partikel in wässriger Suspension mit 20 mg mL^{-1} Feststoffgehalt und 4 µM Neurotensin wurden auf PAH-beschichtetes Silizium gedruckt. Die resultierenden Microspots enthielten demnach je 1 fmol Neurotensin. **B** Vier Massenspektren, von denen jedes auf der Fläche eines Microspots aufgenommen wurde. Aufgetragen ist die Signalintensität über dem Masse / Ladung-Verhältnis der gemessenen Ionen. Das Signal des Neurotensin ist in Isotopenauflösung zu erkennen.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Microarray-Oberflächen aus biofunktionalisierten Nanopartikeln entwickelt und für den Nachweis von Proteinen mittels Fluoreszenzdetektion und MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt. Die Oberflächenfunktionalisierung der verwendeten Kern-Schale Nanopartikel kann prinzipiell für verschiedenste Kopplungsmechanismen angepasst werden, so dass außer Proteinen auch DNA, organische Polymere mit unterschiedlichsten Eigenschaften, biologische Partikel wie Phagen oder andere Fängerelementen maßgeschneidert auf den Oberflächen immobilisiert werden könnten. Für den Einsatz in komplexen Proben wie Blutserum könnten die Fängerelemente über Linker aus Polyethylenglycol-Ketten auf den Nanopartikel-Oberflächen verankert werden, um die unspezifische Adsorption von Proteinen zu minimieren. Um die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung von Nanopatikel-Microarrays zu erhöhen, erscheint es sinnvoll, weitere Drucktechniken auszuprobieren, vorzugsweise Verfahren, die Nanopartikel-Suspension kontaktfrei auf das Substrat übertragen. Wie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, haften biofunktionalisierte Nanopartikel in Form von stabilen Mehrfach-lagen aufgrund von unterschiedlichen Wechselwirkungen auf den Substratoberflächen. Ein kritischer Prozess bei der Herstellung von Biochip-Oberflächen mit konstanter Partikelmenge pro Spot ist neben der Kontrolle des Feststoffgehalts der Partikel-Suspensionen jedoch der Übertrag einer konstanten Partikelmenge auf das Substrat. Beim Nadel-Ring Druckverfahren bestimmen sowohl Wechselwirkungen zwischen Suspension und Nadel als auch Wechselwirkungen zwischen Suspension und Substrat-Oberfläche über das Volumen, das pro Kontakt auf das Substrat übertragen wird. Der Einfluss der lokalen Substratbeschaffenheit auf den Druckprozess würde durch kontaktfreies Drucken vermindert und so könnten möglicherweise noch homogenere Mikrostrukturen erzeugt werden. Gleichzeitig könnte das übertragene Volumen und damit auch die Spot-Größe kontrolliert werden.

Die selektive Abscheidung von Nanopartikeln auf funktionalisierte Oberflächen kann prinzipiell auf Substrate unterschiedlichster Geometrie angewendet werden. Die Aktivierung der Oberflächen kann durch die Abscheidung verschiedener funktioneller Polyelektrolyte für die Anbindung von Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionen maßgeschneidert werden. Durch den Einsatz funktioneller Silane oder Thiole könnten Oberflächen auch kovalent modifiziert werden. Nanopartikel-Beschichtungen können die Oberfläche eines Materials hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften wie Benetzbarkeit, Rauigkeit etc. beeinflussen und je nach Funktionalisierung der Nanopartikel auch hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften. Biokompatible oder bioabbaubare Nanopartikel können durch Einschluss eines Wirkstoffes außerdem mit einer bioaktiven Funktion ausgestattet werden und Oberflächen beispielsweise gezielt für den Bewuchs mit Zellen attraktiv machen oder die Ausbildung von bakteriellen

Biofilmen auf Oberflächen verhindern. Eine denkbare Anwendung von Beschichtungen aus funktionellen Nanopartikeln in der Medizintechnik ist die Funktionalisierung von Implantat-Oberflächen.

Nanopartikel-Microarrays sind interessant für alle Anwendungen, die es zum Ziel haben, ein überschaubares Set an Analytmolekülen in einer Probe nachzuweisen und dafür einen möglichst großen Anteil der vorhandenen Moleküle aus der Probe auf spezifischen Affnitätsoberflächen immobilisieren wollen. Im Hinblick auf die Entwicklung eines diagnostischen Tests für systemische Pilzinfektionen könnten gezielt Antikörper auf Partikel-Oberflächen immobilisiert werden, die für den Nachweis von pathogenen Pilzen im Organismus relevant sind. Dafür könnte beispielsweise auf eine Kombination aus Antikörpern zurückgegriffen werden, die in kommerziell erhältlichen Latex-Agglutinationstests gegen einzelne *Candida*-Antigene verwendet werden [119, 136]. Eine Auswahl möglicher Antigene mit großem immunogenem Potenzial haben Pitarch *et al.* identifiziert [124], sie könnten zum Zweck des Nachweises von Anti-*Candida* Antikörpern in Patientenproben auf Partikel-Oberflächen verankert werden.

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass sowohl die Bereitstellung der nanopartikulären Affinitätsoberflächen einen hohen materiellen wie arbeitstechnischen Aufwand erfordert als auch der Nachweis der gebundenen Analyten mittels fluoreszenzmarkierten Detektionsmolekülen. Es bleibt daher prinzipiell zu prüfen, ob chipbasierte Diagnostik oder Therapiekontrolle eine realisierbare Möglichkeit darstellt.

7 Literatur

[1] **B. Kersten, E. E. Wanker, J. D. Hoheisel and P. Angenendt**, *Multiplex approaches in protein microarray technology*, Experte Reviews in Proteomics, 2, (4) 499-510 (2005)

[2] **P. Angenendt**, *Progress in protein and antibody microarray technology*, Drug Discovery Today, 10, (7) 503-511 (2005)

[3] **U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger**, *Multiplexed sandwich assays in microarray format*, Journal of Immunological Methods, 290, 107-120 (2004)

[4] **M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer and T. O. Joos**, *Protein microarray technology*, TRENDS in Biotechnology, 20, (4) 160-166 (2002)

[5] **R. P. Ekins**, *Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays*, Clinical Chemistry, 44, (9) 2015-2030 (1998)

[6] **R. P. Ekins**, *Multispot, multianalyte, immunoassay*, Annales de Biologie Clinique, 48, 655-666 (1990)

[7] **E. Engvall and P. Perlmann**, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*, Immunochemistry, 8, (9) 871-874 (1971)

[8] **R. P. Ekins and F. W. Chu**, *Multianalyte Microspot Immunoassay-Microanalytical "Compact Disk" of the Future*, Clinical Chemistry, 37, (11) 1955-1967 (1991)

[9] **P. Angenendt, J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach and D. J. Cahill**, *Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials*, Analytical Biochemistry 309, 253-260 (2002)

[10] **P. Angenendt, J. Glokler, J. Sobek, H. Lehrach and D. J. Cahill**, *Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications*, Journal of Chromatography A, 1009, 97–104 (2003)

[11] **W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl and J. D. Hoheisel**, *Antibody microarrays: An evaluation of production parameters*, Proteomics, 3, 1-11 (2003)

[12] **S. Pathak, A. K. Singh, J. R. McElhanon and P. M. Dentinger**, *Dendrimer-Activated Surfaces for High Density and High Activity Protein Chip Applications*, Langmuir, 20 (15) 6075-6079 (2004)

[13] **M. Schaeferling, S. Schiller, H. Paul, M. Kruschina, P. Pavlickova, M. Meerkamp, C. Giammasi and D. K. Kambhampati**, *Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces*, Electrophoresis, 23, 3097-3105 (2002)

[14] **C. Hoffmann**, *Selbstorganisierende Organosilansysteme zur Funktionalisierung oxidischer Siliziumoberflächen für die gerichtete Peptid- und Proteinimmobilisierung*, Dissertationsschrift, Universität Stuttgart, 2002

[15] **A. Y. Rubina, E. I. Dementieva, A. A. Stomakhin, E. L. Darii, S. V. Pankov, V. E. Barsky, S. M. Ivanov, E. V. Konovalova and A. D. Mirzabekov**, *Hydrogel-Based Protein Microchips: Manufacturing, Properties and Applications*, Biotechniques, 34, (5) 1008-1022 (2003)

[16] **B. A. Stillman and J. L. Tonkinson**, *FAST Slides: a novel surface for microarrays*, Biotechniques, 29, (4) 630-635 (2000)

[17] **V. Afanassiev, V. Hanemann and S. Wölfl**, *Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film*, Nucleic Acids Research, 28, (12) e66 (2000)

[18] **J. Piehler, A. Brecht, K. Hehl and G. Gauglitz**, *Protein interactions in covalently attached dextran layers*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 13, 325-336 (1999)

[19] **P. Peluso, D. S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L. S. Jung, P. Wagner and S. Nock**, *Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays*, Analytical Biochemistry, 312, 113-124 (2003)

[20] **H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, R. J. Ning Lan, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein and M. Snyder**, *Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips*, Science, 293, 2101-2105 (2001)

[21] **R. Wacker, H. Schröder and C. M. Niemeyer**, *Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin–biotin attachment: a comparative study*, Analytical Biochemistry, 330, (2) 281-287 (2004)

[22] **A. Skerra**, *Bacterial expression of immunoglobulin fragments*, Current Opinion in Immunology, 5, (2) 256-262 (1993)

[23] **J. L. Casey, P. A. Keep, K. A. Chester, L. Robson, R. E. Hawkins and R. H. J. Begent**, *Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography*, Journal of Immunological Methods, 197, 105-116 (1995)

[24] **B. Krebs, R. Rauchenberger, S. Reiffert, C. Rothe, M. Tesar, E. Thomassen, M. Cao, T. Dreier, D. Fischer, A. Höß, L. Inge, A. Knappik, M. Marget, P. Pack, X.-Q. Meng, R. Schier, P. Söhlemann, J. Winter, J. Wölle and T. Kretzschmar**, *High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies*, Journal of Immunological Methods, 254, 67-84 (2001)

[25] **M. He and M. J. Taussig**, *Antibody–ribosome–mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites*, Nucleic Acids Research, 25, (24) 5132-5034 (1997)

[26] **J. Hanes, C. Schaffitzel, A. Knappik and A. Plückthun**, *Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display*, Nature Biotechnology, 18, (12) 1287-1292 (2000)

[27] **A. Koide, C. W. Bailey, X. Huang and S. Koide**, *The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins*, Journal of Molecular Biology, 284, (4) 1141-1151 (1998)

[28] **G. Beste, F. S. Schmidt, T. Stibora and A. Skerra**, *Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold*, Proceedings of the National Academy of Science USA, 96, 1898-1903 (1999)

[29] **K. Nord, E. Gunneriusson, J. Ringdahl, S. Ståhl, M. Uhlén and P.-Å. Nygren**, *Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain*, Nature Biotechnology 15, 772-777 (1997)

[30] **D. Schneider, L. Gold and T. Platt**, *Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor*, FASEB Journal, 7, 201-207 (1993)

[31] **B. B. Haab, M. J. Dunham and P. O. Brown**, *Protein microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions*, Genome Biology, 2, (2) 0004_1-0004_13 (2001)

[32] **L.-Y. Luo and E. P. Diamandis**, *Preliminary examination of time-resolved fluorometry for protein array applications*, Luminescence, 15, (6) 409-413 (2000)

[33] **J. C. Miller, E. B. Butler, B. S. Teh and B. B. Haab**, *The application of protein microarrays to serum diagnostics: Prostate cancer as a test case*, Disease Markers 17, 225-234 (2001)

[34] **J. C. Miller, H. Zhou, J. Kwekel, R. Cavallo, J. Burke, E. B. Butler, B. S. Teh and B. B. Haab**, *Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: Antibody screening and identification of potential biomarkers*, Proteomics, 3, 56-63 (2003)

[35] **X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez**, *Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots*, Nature Biotechnology, 21, (1) 41-46 (2003)

[36] **C. A. Rowe, S. B. Scruggs, M. J. Feldstein, J. P. Golden and F. S. Ligler**, *An Array Immunosensor for Simultaneous Detection of Clinical Analytes*, Analytical Chemistry, 71, (2) 433-439 (1999)

[37] **P. Saviranta, R. Okon, A. Brinker, M. Warashina, J. Eppingerand and B. H. Geierstanger**, *Evaluating Sandwich Immunoassays in Microarray Format in Terms of the Ambient Analyte Regime*, Clinical Chemistry, 50, 1907-1920 (2004)

[38] **B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca and S. Kingsmore**, *Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling circle amplification*, Nature Biotechnology, 20, 359-365 (2002)

[39] **S. Varnum, R. Woodbury and R. Zangar**, *Protein Arrays*, Humana Press, *Basel*, 2004, 161-172

[40] **W. Kusnezow, Y. V. Syagailo, I. Goychuk, J. D. Hoheisel and D. G. Wild**, *Antibody microarrays: the crucial impact of mass transport on assay kinetics and sensitivity*, Expert Rev. Mol. Diagn. , 6, (1) 111-124 (2006)

[41] **M. Pawlak, E. Schick, M. A. Bopp, M. J. Schneider, P. Oroszlan and M. Ehrat**, *Zeptosens' protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis*, Proteomics, 2, (4) 383-393 (2002)

[42] **M. R. Flory, T. J. Griffin, D. Martin and R. Aebersold**, *Advances in quantitative proteomics using stable isotope tags*, Trends in Biotechnology, 20, (12) s23-s29 (2002)

[43] **B. P. Nelson, M. R. Liles, K. B. Frederick, R. M. Corn and R. M. Goodman**, *Label-free detection of 16S ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging*, Environmental Microbiology, 4, 735-743 (2002)

[44] **E. Scrivener, R. Barry, A. Platt, R. Calvert, G. Masih, P. Hextall, M. Soloviev and J. Terrett**, *Peptidomics: A new approach to affinity protein microarrays.*, Proteomics, 3, 122-128 (2003)

[45] **W. Cho, T. Yip, C. Yip, V. Yip, V. Thulasiraman, R. Ngan, T.-T. Yip, W.-H. Lau, J. Au, S. Law, W.-W. Cheng, V. Ma and C. Lim**, *Identification of Serum Amyloid A Protein As a Potentially Useful Biomarker to Monitor Relapse of nasopharyngeal Cancer by Serum Proteomic Profiling*, Clinical Cancer Research, 10, 43-52 (2004)

[46] **L. G. Mendoza, P. McQuary, A. Mongan, R. Gangadharan, S. Brignac and M. Eggers**, *High-throughput microarray-based enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)*, BioTechniques, 27, 778-788 (1999)

[47] **G. MacBeath and S. L. Schreiber**, *Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination*, Science, 289, 1760-1763 (2000)

[48] **L. W. Turtinen, D. N. Prall, L. A. Bremer, R. E. Nauss and S. C. Hartsel**, *Antibody Array-Generated Profiles of Cytokine Release from THP-1 Leukemic Monocytes Exposed to Different Amphotericin B Formulations*, 48, (4) 396-403 (2004)

[49] **J. W. Silzel, B. Cercek, C. Dodson, T. Tsay and R. J. Obremsk**, *Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection*, Clinical Chemistry, 44, (9) 2036-2043 (1998)

[50] **F. J. Quintana, P. H. Hagedorn, G. Elizur, Y. Merbl, E. Domany and I. R. Cohen**, *Functional immunomics: Microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes*, PNAS, 101 (Suppl. 2), 14615-14621 (2004)

[51] **Z. Sun, X. Fu, L. Zhang, X. Yang, F. Liu and G. Hu**, *A protein chip system for parallel analysis of multi-tumor markers and its application in cancer detection*, Anticancer research 24, (2C) 1159-1165 (2004)

[52] **C. P. Paweletz, L. Charboneau, V. E. Bichsel, N. L. Simone, T. Chen, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, E. F. Petricoin and L. A. Liotta**, *Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front*, Oncogene, 20, (16) 1981-1989 (2001)

[53] **J. L. Harry, M. R. Wilkins, B. R. Herbert, N. H. Packer, A. A. Gooley and K. L. Williams**, *Proteomics: Capacity versus utility*, Electrophoresis, 21, (6) 1071-1081 (2000)

[54] **G. L. Miklos and R. Maleszka**, *Protein functions and biological contexts*, Proteomics, 1, 169-178 (2001)

[55] **C. Wingren, C. Steinhauer, J. Ingvarsson, E. Persson, K. Larsson and C. A. K. Borrebaeck**, *Microarrays based on affinity-tagged single-chain Fv antibodies: Sensitive detection of analyte in complex proteomes*, Proteomics, 5, (5) 1281-1291 (2005)

[56] **G. MacBeath**, *Protein microarrays and proteomics*, Nature Genetics, 32 (Suppl.), 526-532 (2002)

[57] **I. Brigger, C. Dubernet and P. Couvreur**, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 631 (2002)

[58] **S. Bryde, I. Grunwald, A. Hammer, A. Krippner-Heidenreich, T. Schiestel, H. Brunner, G. E. M. Tovar, K. Pfizenmaier and P. Scheurich**, *Tumor Necrosis Factor (TNF)-Functionalized Nanostructured Particles for the Stimulation of Membrane TNF-Specific Cell Responses*, Bioconjugate Chemistry, 16, 1459-1467 (2005)

[59] **J. M. Nam, C. S. Thaxton and C. A. Mirkin**, *Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins*, Science, 301, 1884 (2003)

[60] **G. C. Schatz and R. P. V. Duyne**, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, *Chichester*, 2002,

[61] **S. A. Maier, M. L. Brongersma, P. G. Kik, S. Meltzer, A. A. G. Requicha and H. A. Atwater**, *Plasmonics - A Route to Nanoscale Optical Devices*, Advanced Materials, 13, 1501-1502 (2001)

[62] **N. Nath and A. Chilkoti**, *An immobilized gold nanoparticle sensor for labelfree optical detection of biomolecular interaction*, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering (Biomedical Nanotechnology Architectures and Applications) (2002), 441-448

[63] **R. P. v. Duyne, A. J. Haes and A. D. McFarland**, *Nanoparticle optics: sensing with nanoparticle arrays and single nanoparticles*, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering (Physical Chemistry of Interfaces and Nanomaterials II) (2003), 197-207

[64] **P. W. Stevens, C. H. J. Wang and D. M. Kelso**, *Immobilized Particle Arrays: Coalescence of Planar- and Suspension-Array Technologies*, Analytical Chemistry, 75, 1141-1146 (2003)

[65] **P. W. Stevens and D. M. Kelso**, *Imaging and Analysis of Immobilized Particle Arrays*, Analytical Chemistry, 75, 1147-1154 (2003)

[66] **E. Györvary, A. Schroedter, D. V. Talapin, H. Weller, D. Pum and U. B. Sleytr**, *Formation of Nanoparticle Arrays on S-Layer Protein Lattices*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 4, (1/2) 115 (2004)

[67] **M. Andersson, K. Elihn, K. Formell and K. D. Caldwell**, *Surface Attachement of Nanoparticles Using Oligonucleotides*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 34, 165-171 (2004)

[68] **U. Jonas and C. Krüger**, *The Effect of Polar, Nonpolar, and Electrostatic Interactions and Wetting Behavior on the Particle Assembly at Patterned Surfaces*, Journal of Supramolecular Chemistry, 2, 255-270 (2002)

[69] **Y. Yin, Y. Lu, B. Gates and Y. Xia**, *Template-Assisted Self-Assembly: A Practical Route to Complex Aggregates of Monodispersed Colloids with Well-Defined Sizes, Shapes, and Structures*, Journal of the American Chemical Society, 123, (36) 8718-8729 (2001)

[70] **K. M. Chen, X. Jiang, L. C. Kimerling and P. T. Hammond**, *Selective Self-Organization of Colloids on Patterned Polyelectrolyte Templates*, Langmuir, 16, (20) 7825-7834 (2000)

[71] **F. Hua, T. Cui and Y. Lvov**, *Lithographic Approach to Pattern Self-Assembled Nanoparticle Multilayers*, Langmuir, 18, (17) 6712-6715 (2002)

[72] **T. Schiestel, H. Brunner and G. E. M. Tovar**, *Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 4, 504-511 (2004)

[73] **W. Stöber, A. Fink and E. Bohn**, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*, Journal of Colloid and Interface Science, 26, (1) 62-69 (1968)

[74] **K.-F. Arndt and G. Müller**, *Polymercharakterisierung*, Hanser, *München*, 1996

[75] **R. Nietsche**, *Malvern Partikelcharakterisierung*, *Herrenberg*, 1999

[76] **H.-D. Dörfler**, *Grenzflächen- und Kolloidchemie*, VCH, *Weinheim*, 1994

[77] **A. P. Legrand**, *The Surface Properties of Silicas*, John Wiley & Sons, *Chichester*, 1998

[78] **G. T. Hermanson**, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, *San Diego*, 1995

[79] **C. J. Moody**, *Synthesis: carbon with two attached heteroatoms with at least one carbon-to-heteroatom multiple link*, Elsevier, 1995

[80] **D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen and E. Conclin**, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company,

[81] **H. J. Gruber, G. Kada, M. Marek and K. Karl**, *Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids*, Biochimica et Biophysica Acta, 1381, 203-212 (1998)

[82] **A. F. Holleman, E. Wiberg and N. Wiberg**, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, de Gruyter, *Berlin, New York*, 1985

[83] **E. Nicke**, *Präparation und Charakterisierung ultradünner Funktionsschichten auf Siliziumoberflächen für die Entwicklung Nanopartikel-basierter Proteinchips*, Studienarbeit, Universität Stuttgart, 2004

[84] **H. F. Okorn-Schmidt**, *Characterization of silicon surface preparation processes for advanced gate dielectrics*, IBM Journal of Research and Development, 43, (3) 351 (1999)

[85] **G. Decher and J. B. Schlenoff**, *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH, *Weinheim*, 2003

[86] **G. Decher**, *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*, Science, 277, (5330) 1232-1237 (1997)

[87] **P. Bertrand, A. Jonas, A. Laschewsky and R. Legras**, *Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties*, Macromolecular Rapid Communications, 21, (7) 319-348 (2000)

[88] **S. S. Shiratori and M. F. Rubner**, *pH-Dependent Thickness Behaviour of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes*, Macromolecules, 33, 4213-4219 (2000)

[89] **D. Yoo, S. S. Shiratori and M. F. Rubner**, *Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes*, Macromolecules, 31, (13) 4309-4318 (1998)

[90] **M. Harke, R. Teppner, O. Schulz, H. Orendi and H. Motschmann**, *Description of a single modular optical setup for ellipsometry, surface plasmons, waveguide modes, and their corresponding imaging techniques including Brewster angle microscopy*, Review of Scientific Instruments, 68, (8) 1-5 (1997)

[91] **H. Brunner, T. Vallant, U. Mayer and H. Hoffmann**, *Stepwise Growth of Ultrathin SiO_x Films on Si(100) Surfaces through Sequential Adsorption/Oxidation Cycles of Alkylsiloxane Monolayers*, Langmuir, 12, (20) 4614-4617 (1996)

[92] **E. D. Palik**, *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, *Orlando*, 1985

[93] **S. L. Clark and P. T. Hammond**, *The Role of Secondary Interactions in Selective Electrostatic Multilayer Deposition*, Langmuir, 16, (26) 10206-10214 (2000)

[94] **S. Knecht**, *Mikrostrukturierte Anlagerung biofunktionalisierter Nanopartikel mittels Photolithographie, Mikrokontaktstempeln und Mikroarrayer auf Glas-, Silizium- und Goldoberflächen*, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 2002

[95] **M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh and F. Hillenkamp**, *Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000 Dalton*, Angewandte Chemie, 101, (6) 805-806 (1989)

[96] **L. R. H. Cohen, K. Strupat and F. Hillenkamp**, *Analysis of Quaternary Protein Ensembles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, Journal of the American Society of Mass Spectrometry, 8, 1046-1052 (1997)

[97] **M. Bantscheff and M. O. Glocker**, *MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung*, Biospektrum, 3, 250-252 (2001)

[98] **G. E. M. Tovar, T. Schiestel, C. Hoffmann and J. Schmucker**, *Protein biochips for affinity-MALDI-TOF-mass spectrometry*, Bioforum International, 5, 235-237 (2001)

[99] **J. Bland and D. Altman**, *Measurement error*, British Medical Journal, 312, 1654 (1996)

[100] **R. Ekins and P. Edwards**, *Point On the meaning of "sensitivity"*, Clinical Chemistry 43, (10) 1824-1831 (1997)

[101] **H. L. Pardue**, *Counterpoint The inseparable triad: analytical sensiivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution*, Clinical Chemistry, 43, (10) 1831-1837 (1997)

[102] **R. Ekins, F. Chu and E. Biggart**, *Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies*, Analytica Chimica Acta, 227, 73-96 (1989)

[103] **B. Akerstrom and L. Bjorck**, *A Physicochemical Study of Protein G, a Molecule with Unique Immunoglobulin G-binding Properties*, Journal of Biological Chemistry, 261, (22) 10240-10247 (1986)

[104] **R. Polzius, E. Diessel, F. F. Bier and U. Bilitewski**, *Real-Time Observation of Affinity Reactions Using Grating Couplers: Determination of the Detection Limit and Calculation of Kinetic Rate Constants*, Analytical Biochemistry, 248, 269 (1997)

[105] **B. Lu, M. R. Smyth and R. O'Kennedy**, *Oriented Immobilization of Antibodies and Its Applications in Immunoassays and Immunosensors*, The Analyst, 121, 29R (1996)

[106] **Amersham**, Produktinformation,

[107] **L. Fieser and M. Fieser**, *Organische Chemie*, Verlag Chemie, *Weinheim*, 1968

[108] **C. M. Chan**, *Polymer Surface Modification and Characterization*, Carl Hanser Verlag, *München*, 1994

[109] **G. Beamsom and D. Briggs**, *High Resolution XPS of Organic Polymers*, John Wiley, *Chichester*, 1992

[110] **J. Feder**, *Random sequential adsorption*, Journal of Theoretical Biology, 87, 237-254 (1980)

[111] **S. Maenosono, C. D. Dushkin, S. Saita and Y. Yamaguchi**, *Growth of a Semiconductor Nanoparticle Ring During the Drying of a Suspension Droplet*, Langmuir, 15, (4) 957-965 (1999)

[112] **K. Borchers, A. Weber, H. Brunner and G. E. M. Tovar**, *Microstructured layers of spherical biofunctional core-shell nanoparticles provide enlarged reactive surfaces for protein microarrays*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 738-746 (2005)

[113] **B. J. Fischer**, *Particle Convection in am Evaporating Colloidal Droplet*, Langmuir, 18, (1) 60-67 (2002)

[114] **J. N. Israelachvili**, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, *London*, 1992

[115] **T. Flad, T. Schiestel, H. Brunner, J. Tolson, Q. Ouyang, G. Pawelec, G. A. Müller, C. A. Müller, G. E. M. Tovar and H. Beck**, *Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle technology and MALDI mass spectrometry*, Journal of Immunological Methods, 283, 205-213 (2003)

[116] **T. Arakawa, S. J. Prestrelski, W. C. Kenney and J. F. Carpenter**, *Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins*, Advanced Drug Delivery Reviews, 10, (1) 1-28 (1993)

[117] **N. D. Denkov, O. D. Velvev, P. A. Kralchevsky, I. B. Ivanov, H. Yoshimura and K. Nagayama**, *Two-dimensional crystallization*, Nature, 361, 26 (1993)

[118] **B. Sendid, M. Tabouret, J. L. Poirot, D. Mathieu, J. Fruit and D. Poulain**, *New Enzyme Immunoassays for Sensitive Detection of Circulating Candida albicans Mannan and Antimannan Antibodies: Useful Combined Test for Diagnosis of Systemic Candidasis*, Journal of Clinical Microbiology, 37, (5) 1510-1517 (1999)

[119] **K. Mitsutake, T. Miyazaki, T. Tashiro, Y. Yamamoto, H. Kakeya, T. Otsubo, S. Kawamura, M. Ashraf Hossain, T. Noda, Y. Hirakata and S. Kohno**, *Enolase Antigen, Mannan Antigen, Cand-Tec Antigen, and beta-Glucan in Patients with Candidemia*, Journal of Clinical Microbiology, 34, (8) 1918–1921 (1996)

[120] **W. Choi, Y. J. Yoo, M. Kim, D. Shin and H. B. Jeon**, *Identification of proteins highly expressed in the hyphae of Candida albicans by two-dimensional electrophoresis*, Yeast, 20, (12) 1053-60 (2003)

[121] **C. Urban, K. Sohn, F. Lottspeich, H. Brunner and S. Rupp**, *Identification of cell surface determinants in Candida albicans reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell*, FEBS letters, 544 228-235 (2003)

[122] **C. Urban, X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner and S. Rupp**, *The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in Candida albicans*, Mol Microbiol, 57, (5) 1318-41 (2005)

[123] **K. Borchers, A. Weber, E. Hiller, S. Rupp, H. Brunner and G. E. M. Tovar**, *Nanoparticle-based Diagnostic 3D-Protein-Biochip for Candida Albicans*, PMSE Preprints, 95, 1016-1017 (2006)

[124] **Pitarch A, Jimenez A, Nombela C and G. C.**, *Decoding serological response to Candida cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses.*, Molecular and Cellular Proteomics, 5, (1) 79-96 (2006)

[125] **M. Schuerenberg, C. Luebbert, H. Eickhoff, M. Kalkum, H. Lehrach and E. Nordhoff**, *Prestructured MALDI-MS Sample Supports*, Analytical Chemistry, 72, (15) 3436-3442 (2000)

[126] **A. Weber, K. Borchers and G. E. M. Tovar**, *Nanopartikuläre Oberflächen für die Protein-Biochip-MALDI-Massenspektrometrie*, transkript Laborwelt, 4, (6) 20-21 (2003)

[127] **D. I. Papac, J. Hoyes and K. B. Tomer**, *Direct Analysis of Affinity-Bound Analytes by MALDI/TOF MS*, Analytical Chemistry, 66, (17) 2609-2613 (1994)

[128] **W. T. Hutchens and T.-T. Yip**, *New Desorption Strategies for the Mass Spectrometric Analysis of Macromolecules*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 7, 576-580 (1993)

[129] **H. Wang, K. Tseng and C. B. Lebrilla**, *A General Method for Producing Bioaffinity MALDI Probes*, Analytical Chemistry, 71, (10) 2014-2020 (1999)

[130] **D. C. Barbacci, R. D. Edmondson and D. H. Russell**, *Evaluation of the variables that effect resolution in delayed extraction MALDI-TOF*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 165, 221-235 (1997)

[131] **Bruker-Daltonics**, *Ultraflex II Operator Manual*,

[132] **S. M. Colby and J. P. Reilly**, *Space-Velocity Correlation Focusing*, Analytical Chemistry, 68, (8) 1419-1428 (1996)

[133] **D. C. Schriemer and L. Li**, *Combining Avidin-Biotin Chemistry with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry, 68, (19) 3382-3387 (1996)

[134] **S. Girault, G. Chassaing, J. C. Blais, A. Brunot and G. Bolbach**, *Coupling of MALDI-TOF Mass Analysis to the Separation of Biotinylated Peptides by Magnetic Streptavidin Beads*, Analytical Chemistry, 68, (13) 2122-2126 (1996)

[135] **A. Weber, K. Borchers, J. Schmucker, H. Brunner and G. E. M. Tovar**, *Protein-Microarray by Layer-By-Layer Application of Streptavidin-Coated Nanoparticles for Specific Analysis of Biotinylated Ligands by MALDI Mass Spectrometry or Fluorescence Imaging*, Canadian Journal of Science and Spectroscopy, 50, (2) 49-53 (2005)

[136] **J. Fung, S. Donta and R. Tilton**, *Candida detection system (CAND TEC) to differentiate between Candida albicans colonization and disease*, Journal of Clinical Microbiology, 24, 542-547 (1986)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kirsten Borchers
Anschrift	Ostendstr. 109 70188 Stuttgart
Geburtstag, Geburtsort	11. August 1971
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1978 – 1982	Ernst-Reuter-Grundschule, Karlsruhe
1982 – 1991	Otto-Hahn-Gymnasium, Karlsruhe Abschluss Abitur (Notendurchschnitt 1,3)

Studium

WS´92/´93 – WS´95/´96	Grundstudium an der Universität in Karlsruhe, Fächer: Biologie, Physik (für das höhere Lehramt)
SS´96 – WS´97/´98	Hauptstudium an der Freien Universität, Berlin
SS´98 – SS´99	Anfertigung der Staatsexamensarbeit „Zur optischen Spektroskopie an α-HgS“ bei Prof. C. Klingshirn am Institut für angewandte Physik der Universität Karlsruhe (Note 1,5). 1. Staatsexamen in Biologie (Note 1,8) und Physik (Note 2) an der Universität Karlsruhe
SS´99 – SS´00	Aufbaustudium: Mathematik als Beifach 1. Staatsexamen (Note 1,0) an der Universität Karlsruhe

Vorbereitungsdienst

Schuljahr 2000/ 2001, bis 31.12.2001	Staatliches Seminar für Schulpädagogik, Esslingen

Nachpraktikum

15.01.2002 - 31. 08.2002	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart

Anstellung

15.10.2002 - 31.12.2006	Anfertigung der Doktorarbeit „Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln als dreidimansionale Affinitätsoberfläche zum Proteinnachweis auf Microarrays“ bei Prof. H. Brunner am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart, Abteilung Biomimetische Grenzflächen, Leiter PD Dr. G. E.M. Tovar

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, 18.12.2006 Kirsten Borchers

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner und Herrn PD Dr. Günter Tovar bin ich sehr dankbar, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Doktorarbeit am Fraunhofer IGB anzufertigen. Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung der Arbeit. Bei allen meinen Kollegen bedanke ich mich für die herzliche Zusammenarbeit! Ganz besonders danke ich auch Herrn PD Dr. Kai Röcker für viele sehr hilfreiche Diskussionen. Mein spezieller Dank gilt Dr. Christoph Melcher, der mich mit seiner Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit angesteckt hat und Herrn PD Dr. Michael Pankratz, dessen Labortür mir immer weit offenstand.