

Resonante Quarzsensoren zum Nachweis von Wechselwirkungen supramolekularer Systeme



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplomchemiker Maik Liebau
geboren am 23. Mai 1968 in Sangerhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. R.H.H. Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. P. Hauptmann
3. Doz. Dr. rer. nat. habil. U. Rothe

Halle (Saale), 28.10. 1998

Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurden Wechselwirkungen zwischen supramolekularen Systemen und modifizierten Sensoroberflächen untersucht. Als Standardmeßsystem wurde die Quarzmikrobalance (QMB) als eine Methode zur gravimetrischen Bestimmung von Analytadsorptionen eingesetzt.

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen war die Entwicklung geeigneter Beschichtungs-techniken zur Aktivierung von Sensoroberflächen. Im Mittelpunkt der Studien stand die Weiterentwicklung von Zelladhäsionsmodellen, die Untersuchung von Glycolipid-wechselwirkungen und Enzymadsorptionen sowie die Verfolgung von Wechselwirkungen makrocyclischer Verbindungen.

Im Ergebnis der Arbeit konnten Zusammenhänge aufgezeigt werden, denen Interaktionen in supramolekularen Systemen zugrunde liegen. Es wurde ein umfassendes Konzept zur Anwendung der QMB-Technik in flüssigen Systemen vorgestellt und ein neues QMB-Sensorsystem entwickelt.

Deskriptoren

Quarzmikrobalance – supramolekulare Systeme – Langmuir-Blodgett Technik – selbstordnende Schichten – makrocyclische Verbindungen – Phospholipide – Phospholipase – Ganglioside – Choleratoxin – Lectine – Liposomen – Micellen

0	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
1	BIOSENSOREN	4
1.1	Einteilung von Sensorsystemen nach den Prinzipien der Signalübertragung	5
1.1.1	Kalorimetrische Sensoren	5
1.1.2	Elektrochemische Sensoren	5
1.1.3	Optische Sensoren	6
1.1.4	Akustische Sensoren	7
1.2	Biochemische Erkennungsprinzipien	7
2	MASSESENSITIVE SENSOREN	9
2.1	Einteilung massensensitiver Sensoren	9
2.1.1	Oberflächenwellen-Sensoren (SAW-Sensoren)	10
2.1.2	Pseudo Oberflächenwellen-Sensoren	10
2.1.3	Akustische Platten-Modus-Sensoren (APM-Sensoren)	11
2.1.4	Biege-Plattenwellen-Sensoren (FPW-Sensoren)	11
2.1.5	Volumenwellen-Sensoren (BAW-Sensoren)	12
2.2	Grundlagen der Quarzmikrobalance (QMB)	12
2.2.1	Piezoelektrische Eigenschaften von Quarzkristallen	12
2.2.2	Schwingungsverhalten von Quarzen	13
2.2.3	Nebeneffekte bei QMB-Untersuchungen in Flüssigkeiten	16
2.2.4	Modelle zur Beschreibung des Schwingungsverhaltens	17
2.3	Entwicklung der experimentellen Basis	19
2.3.1	Oszillatorschaltung	19
2.3.2	Entwicklung der Meßzelle	19
3	ANWENDUNGEN DER QUARZMIKROBALANCE	23
3.1	Einleitung	23
3.2	Anwendungen in Gasen	23
3.3	QMB-Biosensoren in Flüssigkeiten	25
3.3.1	Immunosensoren	25
3.3.2	Adsorption, Immobilisierung und Hybridisierung von Nucleinsäuren	29
3.3.3	Kinetik enzymatischer Reaktionen	31
3.3.4	Adhäsion und Wachstum von Biofilmen	32
3.3.5	Rezeptorwechselwirkungen auf Quarzresonatoren	33
3.4	Kommerzielle Anwendungen von QMB-Sensoren	35

4	MODIFIZIERUNG DER SENSOROBERFLÄCHEN	36
4.1	Verfahren zur Immobilisierung von Proteinen	36
4.1.1	Silanisierung der Sensoroberflächen	36
4.1.2	Protein A-Gold Methode	37
4.1.3	Immobilisierung von Proteinen mit Succinimiden	37
4.1.4	Polymere zur Immobilisierung von Proteinen	38
4.2	Einfache experimentelle Beschichtungstechniken	39
4.2.1	Auftropfmethode	39
4.2.2	Air-Brush Verfahren	40
4.2.3	Weitere Methoden	41
4.2.4	Diskussion	41
4.3	Selbstorganisierende Schichten an Goldelektroden	41
4.3.1	Einleitung	41
4.3.2	Adsorption von Thioalkoholen an Goldelektroden	42
4.3.3	Randwinkeluntersuchungen	44
4.3.4	Ellipsometrische Schichtdickenbestimmungen	46
4.3.5	Diskussion	47
4.4	Anwendung der Langmuir-Blodgett Technik	49
4.4.1	Begriffe	49
4.4.2	Filmwaagetechnik	50
4.4.3	Eigenschaften der untersuchten LB Filme	51
4.4.4	Diskussion	53
4.5	Zusammenfassende Diskussion	54
5	MAKROCYCLISCHE MODELLREZEPTOREN ALS SCHICHTMATERIALIEN	55
5.1	Wechselwirkungen von Ammoniumsalzen mit einem modifizierten Calix[4]aren	55
5.2	Cavitanden als vielseitige molekulare Rezeptoren	57
5.2.1	Einführung	57
5.2.2	Adsorptionsverhalten im wässrigen Medium	59
5.3	Zusammenfassung	61
6	ENZYMADSORPTIONEN AN TRÄGERFIXIERTE PHOSPHOLIPIDE	63
6.1	Zielstellung	63
6.2	Enzym-Substrat Wechselwirkungen	64
6.2.1	Erprobung geeigneter Beschichtungstechniken	64
6.2.2	Strukturabhängigkeit von Enzym-Substrat Wechselwirkungen	66

6.3	Enzymatische Hydrolyse von Phospholipiden	68
6.3.1	Titration der Spaltprodukte mit der pH-stat Methode	68
6.3.2	Massensensitive Untersuchungen an Multischichten	69
6.4	Zusammenfassung	71
7	GLYCOLIPIDMATRICES ZUM NACHWEIS VON CHOLERATOXIN	73
7.1	Zielstellung	73
7.2	Adsorption von Cholera toxin an modifizierte Sensoroberflächen	74
7.2.1	Durchführung der Experimente	74
7.2.2	Optimierung der Adsorption an einer G _{MI} /Phospholipid-Matrix	74
7.2.3	Adsorptionsverhalten an verschiedenen Gangliosidfraktionen	75
7.2.4	Wechselwirkungen mit G _{MI} - und CT- Antikörpern	77
7.3	Zusammenfassung	78
8	ADSORPTIONSVERHALTEN SUPRAMOLEKULARER LIPIDSYSTEME	80
8.1	Sorptionsverhalten lectingekoppelter Liposomen	80
8.1.1	Zielstellung	80
8.1.2	Herstellung von Liposomen	81
8.1.3	Adhäsion und Fusion von Liposomen an Schwingquarzen	81
8.1.4	Zusammenfassung	84
8.2	Spezifische Adsorption an trägerfixierten Bilayern	85
8.2.1	Modifizierung der Beschichtung	85
8.2.2	Einfluß der vesikulären Struktur auf das Bindungsverhalten	86
8.2.3	Inhibierung der Liposomen	87
8.2.4	Zusammenfassung	89
8.3	Stabile Mischmicellen als Modellsysteme	91
8.3.1	Einleitung	91
8.3.2	Adsorption micellarer Systeme an Modellmembranen	92
8.4	Beurteilung der Nachweisbarkeit von Lipidadsorptionen	93
9	EXPERIMENTELLER TEIL	95
9.1	Verfahren zur Beschichtung von Schwingquarzen	95
9.1.1	Reinigung der Sensoren	95
9.1.2	Auftropfmethode	96
9.1.3	Air-Brush Verfahren	96
9.1.4	Silanisierung nach Suri et al. []	96
9.1.5	Beschichtung mit Polyethylenimin	97
9.1.6	Self-Assembling (SA) Verfahren	97
9.1.7	Filmwaage (LB) Technik	97

9.2	Analytische Verfahren zur Untersuchung von dünnen Schichten	98
9.2.1	Atomkraftmikroskopie	99
9.2.2	Kontaktwinkelmessungen	99
9.2.3	Schichtdickenbestimmung	100
9.2.4	Fluoreszenzuntersuchungen	101
9.3	Makrocyclische Modellrezeptoren	102
9.3.1	Beschichtung mit Calix[4]aren	102
9.3.2	Versuchsdurchführung	102
9.3.3	Beschichtung mit Cavitanden	103
9.3.4	Versuchsdurchführung und Ergebnisse	103
9.4	Enzymatische Reaktionen	105
9.4.1	Beschichtungen	105
9.4.2	Durchführung der QMB-Untersuchungen	105
9.4.3	Durchführung der pH-stat Messungen	106
9.5	Wechselwirkungen an Gangliosid-modifizierten Oberflächen	107
9.5.1	Beschichtung	107
9.5.2	Durchführung	108
9.6	Adsorptionen supramolekularer Lipidsysteme	109
9.6.1	Herstellung von Liposomen	109
9.6.2	Herstellung von Mischmicellen	110
9.6.3	Adsorptionen vesikulärer Systeme	110
9.6.4	Adsorptionen micellarer Systeme	112
9.7	Herstellung von Thioalkoholen []	114
9.7.1	Mercaptoundecanol	114
9.7.2	Thiolipide	115
10	ZUSAMMENFASSUNG	116
	LITERATURVERZEICHNIS	130

Verzeichnis der Abkürzungen

σ	mechanische Spannung
ϵ_{22}	Dielektrizitätskonstante
θ_{ADV}	Fortschreitrandwinkel
λ_q	akustische Wellenlänge
ρ_q	Dichte der Quarzkristalle
η_q	dynamische Viskosität von Quarzen
μ_q	Schermodul von Quarzkristallen
θ_{REC}	Rückzugsrandwinkel
APM	Akustischer Plattenmodus
BAW	Bulk Acoustic Waves (akustische Volumenwellen)
BVD	Butterworth-Van-Dyke-Modell
C	Kapazität
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
ConA	ConcanavalinA
CT	Choleratoxin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamin
d_q	Dicke der Quarzscheibe
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin
E^0	Standardpotential
F	Faraday-Konstante
FPW	Flexural Plate Waves (Biegeplattenwellen)
f_q	Resonanzfrequenz von Schwingquarzen
FS	Fettsäure
IDT	Interdigital Transducer
ISFET	Ionenselektive-Feldeffekt-Transistoren
K_0	piezoelektrischer Koppelfaktor
K_{ASS}	Assoziationskonstante
L	Induktivität
LB	Langmuir-Blodgett-Technik
$\log P_{Oct}$	Verteilungskoeffizient Wasser/Octanol
MBA	N,N'-Methylen(bisacrylamid)
M_F	Massendichte
m_q	Masse der Quarzkristalle
NaC	Na-Cholat
NaDC	Na-Desoxycholat
N-glut-PE	N-glutaryl-phosphatidylethanolamin

P	Polarisation
PAA	Polyacrylamid
PAC	Polyacrylcholat
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PEG	Polyethylenglycol
PL	Phospholipase
QMB	Quarzmikrobalance
R	ohmscher Widerstand
SA	Self-Assembling-Verfahren
SAW	Surface Acoustic Waves (akustische Oberflächenwellen)
SPR	Surface Plasmon Resonance
T	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v_q	Geschwindigkeit der Ausbreitung akustischer Wellen (Schallgeschwindigkeit)
z	Ladungszahl
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomkraftmikroskopie) NBD-PC 1-Hexadecanoyl-2-[N-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]amino-hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin
SPC	Soja-phosphatidylcholin
Chol	Cholesterin

0 Einleitung und Aufgabenstellung

Prinzipien, nach denen sich einfache Grundsubstanzen zu komplexen, supramolekularen Systemen anordnen, bilden die Grundlage des Lebens. Die Selbstorganisation von Molekülen auf Wasseroberflächen wurde schon in der Antike beobachtet und 1774 von Benjamin Franklin in seinem klassischen Experiment mit folgenden Worten beschrieben:

„... the oil, thought not more than a teaspoonful, produced an instant calm over a space several yards square, which spread amazingly, and extended itself gradually till it reached the lee side, making all that quarter of the pond, perhaps half an acre, as smooth as a looking glass“ [1].

Franklin war damit der erste der erkannte, daß Amphiphile auf der Wasseroberfläche monomolekulare Schichten ausbilden. Heute kennt man die dabei stattfindenden Prozesse sehr viel besser und weiß, daß z.B. durch Aggregation von Phospholipiden Membranen aufgebaut werden oder daß durch Faltungen von Proteinen spezifische Erkennungsstrukturen entstehen. Durch die Weiterentwicklung der Organischen Chemie ist man in der Lage, Moleküle zu synthetisieren, die molekulare Wechselwirkungen mit definierten Strukturen eingehen. Weiterhin kann man – nicht zuletzt dank der bahnbrechenden Studien von Langmuir und Blodgett [2] – supramolekulare Lipidschichten aufbauen, die denen biologischer Membranen ähneln. Wir sind zwar noch weit davon entfernt, die Komplexität natürlicher Systeme zu erreichen, dennoch können auf der Basis der derzeit vorhandenen Erfahrungen Modellsysteme entwickelt werden, die die Simulation natürlicher Erkennungsprozesse gestatten.

In Abbildung 1 sind funktionelle supramolekulare Systeme schematisch dargestellt. Ausgehend von den komplexen Systemen natürlicher Zellen verwendet man artifizielle Strukturen, die auf bestimmte signifikante Merkmale reduziert werden und damit als Modellstrukturen dienen können.

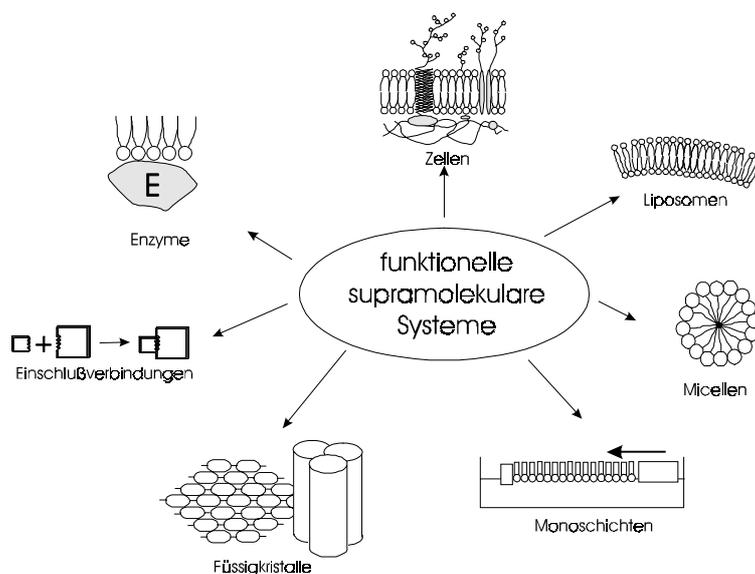


Abbildung 1: Funktionelle supramolekulare Systeme nach Ringsdorf et al. [3]

So wird die zweidimensionale Aggregation von Amphiphilen zur Erzeugung von Monoschichten genutzt. Micellare und lyotrop-flüssigkristalline Systeme sind Ausdruck der spontanen Selbstaggregation bestimmter Molekülklassen in Flüssigkeiten. Unilamellare Liposomen, die in ihrem strukturellen Aufbau den zellulären Systemen sehr ähnlich sind, können ebenfalls mit geeigneten Präparationsmethoden hergestellt werden und schließlich ist die synthetische Erzeugung von Wirtmolekülen, die in der Lage sind, spezifische Gastmoleküle zu adsorbieren, von großer Bedeutung.

Molekulare Erkennungssysteme, beispielsweise supramolekulare Strukturen, können mit mikroelektronischen Bauelementen kombiniert werden, um hochselektive Chemo- und Biosensoren zu entwickeln. Auf der anderen Seite werden z.Zt. derartige Meßmethoden entwickelt, um als einfache und schnelle Testsysteme molekulare und supramolekulare Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Arzneistoffen bzw. Arzneiformen zu charakterisieren [4].

In diesem Zusammenhang widmet sich die vorliegende Arbeit der Entwicklung eines Meßsystems, mit dessen Hilfe Erkennungsprozesse an funktionalisierten supramolekularen Strukturen unter Anwendung geeigneter Signalübertragungsverfahren verfolgt werden können. Ein Nachteil vieler bisheriger Studien ist, daß Wechselwirkungen an Grenzflächen nicht zum Zeitpunkt ihres Geschehens verfolgt werden konnten, sondern lediglich der Ausgangs- und der Endzustand eines biologischen Systems beschrieben wurden. Untersuchungen spezifischer Adsorptionsprozesse an modifizierten Sensoroberflächen sollten deshalb auf Basis der Quarzmikrobalance (QMB) in Realzeit durchgeführt werden. Das Potential dieser massensensitiven Technik zur Anwendung als Biosensor sollte systematisch dokumentiert und an geeigneten Beispielen nachgewiesen werden.

Eine Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchungen stellt die Entwicklung der experimentellen Basis dar. Unter Weiterentwicklung der in Gasen bewährten Sensorelektronik soll ein universell einsetzbares QMB-Sensorsystem entwickelt werden. Besonderer Wert ist dabei auf das Design der Meßzelle zu legen, die einerseits die aus der Meßmethode resultierenden Anforderungen berücksichtigt und andererseits die Bedingungen zur Simulierung von Bioadäsionsprozessen (Volumen, Strömungsverhältnisse, Temperierbarkeit) realisieren muß.

Neben der Entwicklung des Meßsystems ist die Herstellung geeigneter Schichtsysteme eine zweite Voraussetzung für die Durchführung der geplanten Untersuchungen. Es sollten Schichten mit einfachen Strukturen und komplexe Lipidschichtsysteme hergestellt und untersucht werden. Die Vor- und Nachteile der angewandten Beschichtungstechniken sollten herausgearbeitet werden. Auch dabei muß sowohl Rücksicht auf die Besonderheiten der resonanten Meßtechnik (viskoelastische Eigenschaften der Schichten) als auch auf die zu untersuchenden Phänomene genommen werden.

Im Rahmen der Arbeit sollte eine möglichst breite Palette supramolekularer Systeme bearbeitet werden. Die Neuentwicklung von Arzneiformen zielt verstärkt auf eine spezifische Fixierung von inkorporierten Wirkstoffen (Liposomen oder Micellen) an bestimmten Zielstrukturen, z.B. Zellmembranen oder Membranmodelle. Diese auf zwischenmolekularen Wechselwirkungen beruhenden Prozesse sollen verfolgt und optimiert werden. Neben der Entwicklung neuer Arzneiformen steht die Weiterentwicklung von Zelladhäsionsmodellen im Zentrum der Arbeit. Derartige Modelle werden genutzt, um beispielsweise selektinbasierte Erkennungsreaktionen an artifiziellen Membransystemen zu studieren.

Untersuchungen zum Einbau niederer organischer Gastmoleküle in Wirtmoleküle stellen ein einfaches, klar abgegrenztes Teilgebiet der Studien dar. Bei diesen Untersuchungen sollen direkte molekulare Wechselwirkungen unabhängig von der Struktur der Schichten nachgewiesen werden. Dabei gilt es festzustellen, inwieweit zwischenmolekulare Wechselwirkungen mit dem eingesetzten System detektierbar sind. Diese Untersuchungen sollen stellvertretend an Calixarenen und Cavitanden durchgeführt werden unter dem Aspekt, daß analoge zwischenmolekulare Wechselwirkungen auch in natürlichen Systemen (z.B. Enzym/Substrat) auftreten. Darauf aufbauend ist es notwendig, komplexere Systeme zu entwickeln, mit denen sich physiologische Prozesse simulieren lassen. Diese Modellsysteme sollen es ermöglichen, die ineinandergreifenden Teilreaktionen natürlicher Prozesse auf exakt beschreibbare Einzelreaktionen zu reduzieren. Themen der Studien sollen die in Abbildung 1 aufgeführten Systeme sein. Besondere Berücksichtigung finden Wechselwirkungen zwischen Proteinen und trägerfixierten Lipidschichten. Hier sollte es möglich sein, durch Variation der Lipidstrukturen (z.B. Einbau von Kohlenhydraten), Änderungen im Adsorptionsverhalten der Analyte zu beobachten. Wichtig erscheinen außerdem Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Lipiden bzw. aggregierten Lipidsystemen in Lösung (Liposomen, Micellen) und trägerfixierten Lipiden. Damit werden Voraussetzungen geschaffen, um Adsorptionsprozesse supramolekularer mucoadhäsiver Arzneiformen in-vitro verfolgen zu können. Die Beeinflussbarkeit von Fusionsprozessen durch Proteine (gekoppelte Liposomen) ist ein weiterer interessanter Aspekt unter dem die massensensitiven Untersuchungen durchgeführt werden können.

Im Ergebnis der Arbeit sollten die Möglichkeiten und die Grenzen der Charakterisierung von physiologischen Vorgängen mit einem massensensitiven Sensorsystem herausgearbeitet werden. Die Erarbeitung von Vorschlägen zur Ausdehnung der Untersuchungen auf natürliche Systeme (Zellen) bzw. für die Anwendung des Sensors in physiologischen Medien könnte einen Teilerfolg in der Erarbeitung eines neuen medizinisch-diagnostischen Analysenkonzepts darstellen.

1 Biosensoren

Es gibt verschiedene Methoden, um supramolekulare Wechselwirkungen an Grenzflächen nachzuweisen. In dieser Arbeit haben wir uns mit der Entwicklung einer geeigneten Sensortechnik beschäftigt, die es erlaubt, die in der Einleitung beschriebenen Systeme zu charakterisieren. Im ersten Kapitel der vorliegenden Art wird deshalb zunächst eine Definition des Begriffs „Biosensor“ und eine kurze allgemeine Einführung in die Biosensorik gegeben.

Biosensoren sind miniaturisierte Meßsysteme, bei denen biologische Erkennungsstrukturen räumlich eng mit einem geeigneten Signalwandler (Transducer) gekoppelt sind. Durch Wechselwirkungen zwischen Analyten und selektiven Erkennungsstrukturen wird ein physikochemisches Signal erzeugt, das durch den Transducer in elektrisch auswertbare Meßwerte umgewandelt wird [5]. Anwendung finden Biosensoren insbesondere in der klinischen Diagnostik, der Umweltanalytik, der Militärtechnik, der Lebensmittelanalytik und der Prozeßkontrolle. Von Bedeutung sind auch Anwendungen in der Grundlagenforschung, z.B. zur Entwicklung von Modellen auf molekularer Ebene oder zum Nachweis von Makromolekülen und deren Interaktionen in physiologischen Medien.

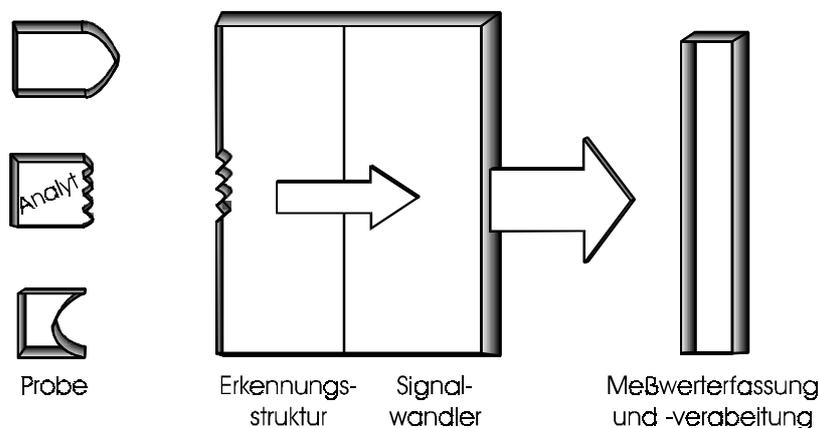


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Biosensors

Typische Probleme bei der Entwicklung von Biosensoren treten durch die Immobilisierung der Biokomponente (Erkennungsstrukturen) und bei der Selektivität der Erkennung des Analyten aus einem Probengemisch wegen der Effizienz der Signalübertragung zum Transducer bzw. bei der Kalibrierung und Datenverarbeitung auf. Allgemein werden an Biosensoren die gleichen Anforderungen wie an herkömmliche kommerzielle Sensoren gestellt [6]. Die Verwendung von Biosensoren hängt aber neben der Qualität der analytischen Ergebnisse (Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Stabilität) letztlich auch von der Akzeptanz der Anwender (Handhabung, Preis, Service) ab.

1.1 Einteilung von Sensorsystemen nach den Prinzipien der Signalübertragung

Es gibt zwei fundamentale Wirkprinzipien von Biosensoren. Zum einen katalysieren Enzyme, Mikroorganismen oder auch Organellen chemische Reaktionen, das bedeutet, daß durch nachgelagerte Reaktionen die Massebilanz an der Sensoroberfläche verändert wird. Zum anderen kommt es, z.B. bei immunologischen Reaktionen, zu spezifischen Adhäsionen des Analyten wobei normalerweise ausschließlich die direkte Ankopplung an eine Grenzfläche untersucht wird. Entsprechend den biochemischen Wirkungsmechanismen müssen die Signalwandler für ein bestimmtes biologisches System ausgewählt werden. Derzeit stehen eine Vielzahl geeigneter Wandler zur Verfügung, die nachfolgend zusammengefaßt sind.

1.1.1 Kalorimetrische Sensoren

Thermistoren [7] registrieren die bei enzymatischen Reaktionen freigesetzte Wärmemenge, die sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Substrats verhält. Eine Spezifität wird durch die geeignete Auswahl der Enzyme erreicht. Die verwendeten Sensoren erfassen bis zu 80% der bei der Umsetzung frei werdenden Energie und haben eine thermische Auflösung von bis zu 10^{-4} K. Damit sind Substratkonzentrationen bis zu 0,1 mmol/l detektierbar [8].

1.1.2 Elektrochemische Sensoren

Elektrochemische Methoden sind nach wie vor der Schwerpunkt der wissenschaftlichen Veröffentlichungen im Bereich Sensorik. Man verwendet potentiometrische, amperometrische und konduktometrische Sensoren.

Potentiometrische Sensoren messen das Potential zwischen zwei Elektroden. Die Elektrodenoberflächen werden beschichtet, um die Anordnung selektiv für bestimmte Ionen zu gestalten. Sie werden entweder direkt in die Probelösung getaucht oder durch eine Membran von der Analytlösung getrennt. Allgemein wird eine Elektrode als Referenz- und die andere als Arbeitselektrode genutzt. Die Abhängigkeit des Aktivitätskoeffizienten (bzw. der Konzentration) a_i vom Potential E wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \cdot a_i \quad (1.1)$$

E^0 – Standardpotential; R – Gaskonstante; F – Faraday-Konstante; z – Ladungszahl; T – Temperatur

Vielfach werden potentiometrische Elektroden als pH-Sensoren angewendet. Eine moderne Version potentiometrischer Elektroden ergibt sich durch die Nutzung der Halbleitertechnik. Sogenannte Ionenselektive Feldeffekt-Transistoren (ISFETs) werden zum Nachweis bestimmter Ionenkonzentrationen eingesetzt. ISFETs haben vor allem den Vorteil, daß man sie auf einem Chip integrieren kann und somit die Möglichkeit besteht, Arrays herzustellen [9].

Der Wechsel des Oxidationszustandes bei biochemischen Reaktionen wird von **amperometrischen Meßtechniken** genutzt. Man mißt den Stromverlauf während Oxidations- oder Reduktionsvorgängen an den Elektroden unter Beibehaltung eines

konstanten Potentials [10]. Die Messung erfolgt entweder mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Technik (Meß- und Gegenelektrode) oder mit der Drei-Elektroden-Technik (Meß-, Gegen- und Referenzelektrode). Die Drei-Elektroden Technik wird verwendet, um den durch den Stromfluß innerhalb der Lösung bedingten Potentialabfall zu kompensieren. Der Zusammenhang zwischen der Stromstärke I und der Geschwindigkeit der Redoxreaktion dn/dt ergibt sich nach Faraday aus Gl 1.2:

$$I = zF \frac{dn}{dt} \quad (1.2)$$

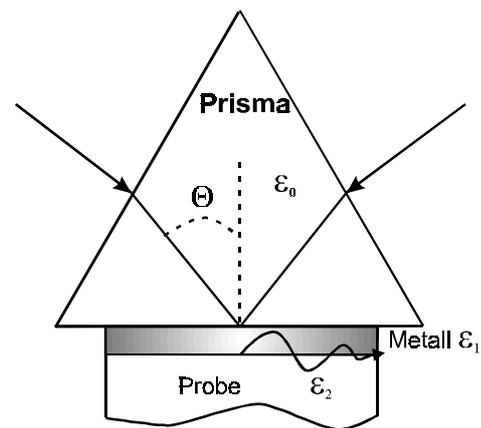
z – Ladungszahl; F – Faradaykonstante (96485,31 As/mol)

Angewendet werden amperometrische Methoden z.B. zur Untersuchung von Adsorptionseffekten [11], zum Nachweis von Sauerstoffverbindungen [12] oder für Testsysteme zum Glucosenachweis [13].

1.1.3 Optische Sensoren

Optische Analyseverfahren haben sich seit langem in der experimentellen Praxis bewährt. Die Anwendung optischer Prinzipien, d.h. die Charakterisierung chemischer Substanzen anhand der Absorption elektromagnetischer Strahlung kann auch für sensorische Zwecke genutzt werden. Dazu ist es notwendig, geeignete Transducer zu verwenden, die in direktem räumlichen Kontakt mit der zu untersuchenden Substanz stehen. Die eigentlich für die Telekommunikation entwickelten optischen Fasern sind geeignete Signalwandler, die in verschiedenen Modifikationen als photometrische Sensoren eingesetzt werden können [14]. Die Ausbreitung des Lichtes erfolgt durch Totalreflexion an den Grenzflächen eines Lichtleiters. Angewendet werden präparierte Lichtwellenleiter, z.B. zum Nachweis von Penicillin [15], Glucose [16] Lactat [17] und Immunosensoren [18].

Neben den faseroptischen Verfahren etablierte sich in den letzten Jahren vor allem die Surface Plasmon Resonance (SPR) als ein neues optisches Verfahren zur Untersuchung von Adhäsionsvorgängen an fest/flüssig Grenzflächen. Derzeit werden drei verschiedene Apparaturen in Deutschland [19] angeboten und entsprechend groß ist auch die Anzahl der Veröffentlichungen auf diesem relativ neuen Gebiet. Bei dieser Methode wird ein Lichtstrahl durch ein Prisma unter Totalreflexion auf einen an der Prismengrenzfläche aufgedampften



Metallfilm gelenkt (Abbildung 3). Dabei kommt es zur Ausbildung eines Plasmons, d.h. einer energiereichen Welle an der Grenzfläche Metall/Umgebung (bzw. Metall/Probe). Im

Resonanzfall (Resonanzwinkel Θ) stimmen die Energie und der Impuls der eingestrahnten Photonen und die Energie des Plasmons überein. Die Übertragung der Energie der Lichtquanten auf das Plasmon ist anhand eines starken Abfalls der Intensität des reflektierten Lichtes erkennbar. Dieser Intensitätssprung wird als sensorisches Signal verwendet [20]. Damit steht eine Technik zur Verfügung, die es gestattet, Grenzflächenreaktionen on-line zu verfolgen.

1.1.4 Akustische Sensoren

Zur Verfolgung von Adhäsionen an Grenzflächen in Realzeit stehen neben der SPR-Technik noch verschiedene akustische Methoden zur Verfügung, die die Ausbreitung akustischer Wellen in einem piezoelektrischen Substrat oder entlang der Oberfläche eines piezoelektrischen Substrats messen. Die akustischen Wellen werden durch Belegung mit Fremdschichten, durch Adsorption von Analyten an Substratgrenzflächen und durch verschiedene Eigenschaften des umgebenden Mediums beeinflusst. Als sensorisches Signal erhält man entweder Verschiebungen der Resonanzfrequenz (proportional zu Massebeladungen) oder Änderungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle [21; 22; 23; 24]. In einer Arbeit von Kößlinger et.al. [25] werden die SPR- und die Quarzmikrobalance- (QMB) Technik anhand der spezifischen und unspezifischen Adsorption von Antikörpern miteinander verglichen. Kößlinger et.al. kommen zu dem Schluß, daß beide Verfahren ähnlich gute Meßergebnisse liefern. Entscheidend ist die Sensorkonfiguration, d.h. die Immobilisierung der Biokomponente und das Design des Sensors. In Kapitel 2 dieser Arbeit wird das Funktionsprinzip akustischer Sensoren ausführlicher beschrieben. Außerdem wird versucht, diese Sensoren anhand der Prinzipien der Wellenausbreitung zu klassifizieren.

1.2 Biochemische Erkennungsprinzipien

Die Klassifizierung von Biosensoren kann auch nach der Art der biologischen bzw. chemischen Wechselwirkung an der Sensoroberfläche erfolgen. Prinzipiell unterscheidet man enzymatische Sensoren, Immunosensoren, rezeptorvermittelte Sensoren, Sensoren zur Sequenzanalyse von Nukleinsäuren und Sensoren die bestimmte Kohlenhydrate erkennen. Diese Einteilung erscheint sinnvoll, da sie die Schwerpunkte der gegenwärtigen Forschungsarbeiten umreißt. Daneben gibt es natürlich eine Vielzahl von Kombinationen der verschiedenen Sensorprinzipien. Beispielsweise kombiniert man Methoden der Immunochemie mit denen der enzymatischen Analyse, die die Bestimmungen von Antigenen, Antikörpern und Haptenen ermöglichen.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Wirkprinzipien von Biosensoren, die meist verwendeten Transducer und einige aktuelle Beispiele.

Tabelle 1: Substanzen zur biologischen Erkennung, Signalwandler und Anwendungsbeispiele von Biosensoren

(Bio-)Chemische Wechselwirkung	Transducer	Beispiele
Enzym/Substrat	elektrochemische Sensoren ISFETs Thermistoren optische Sensoren	Review [26] Formaldehyd-Nachweis [27] Spaltung von Saccharose [28] Pyruvat-Optrode [29]
Antigen/Antikörper	piezoelektrische Sensoren amperometrische Elektroden Thermistoren optische Sensoren	Hepatitis-Antikörper [30] DNP- und PQQ*-Antikörper [31] Peritonitis-Antikörper [32] 2,4-D [†] Antikörper [33]
Rezeptoren/Toxin; Pharmaka	amperometrische Elektroden potentiometrische Elektroden	Keuchhusten-Toxin [34] Schalten von K ⁺ -Kanälen [35]
DNA; RNA	elektrochemische Sensoren potentiometrische Elektroden optische Sensoren piezoelektrische Sensoren	Review [36] sequenz-spezifischer DNA-Nachweis [37] Detektion von DNA-Einheiten [38] DNA-Sequenzanalyse [39]
kohlenhydrat- bindende Proteine	amperometrische Elektroden ISFETs	Galactosenachweis [40] Glucosekonzentrationen [41]

* DNP-Dinitrophenol; PQQ-Pyrrolchinolin-Chinon

† 2,4-D-(2,4-Dichlorphenoxy)essigsäure

2 Massensensitive Sensoren

Bei mechanischen Beanspruchungen (Spannungen) bestimmter Klassen von Ionenkristallen treten Polarisationen auf, die durch Verschiebungen der Ladungsschwerpunkte im Kristallverbund verursacht werden. Massensensitive Sensoren nutzen diese Oberflächenpotentiale an den Grenzflächen von Festkörpern als sensorisches Prinzip, d.h. die Umwandlung von elektrischen Impulsen in mechanische Deformationen [42].

Der Zusammenhang zwischen der Polarisation P und der mechanischen Spannung σ lässt sich durch:

$$P = d\sigma \quad (2.1)$$

ausdrücken. Dabei ist der Piezomodul d eine charakteristische Stoffkenngröße, die die Eigenschaften des piezoelektrischen Materials charakterisiert [43]. Das ist die einfachste Beschreibung des *piezoelektrischen Effekts*. Dieses Phänomen tritt bei allen Kristallen ohne Symmetriezentrum im Kristallgitter auf. Es wurde 1880 von Pierre und Jaques Curie entdeckt. Verschiedene piezoelektrische Materialien werden technisch genutzt. Der Quarz hat vor allem wegen seiner großen Frequenzkonstanz ($\Delta f/f = 10^{-8}$) Bedeutung. Als akustoelektronische Wandler werden außerdem andere Kristalle, wie z.B. Bariumtitanat oder Lithiumniobat, verwendet [21].

2.1 Einteilung massensensitiver Sensoren

Akustische Wellen lassen sich hinsichtlich ihrer Ausbreitung im Medium generell in zwei Klassen, in Oberflächenwellen (Surface Acoustic Waves - SAW) und akustische Volumenwellen (Bulk Acoustic Waves - BAW), unterteilen. Die Ausbreitung von BAWs erfolgt innerhalb des piezoelektrischen Materials. SAWs breiten sich direkt entlang der Oberfläche oder durch Reflexion an den Grenzflächen aus.

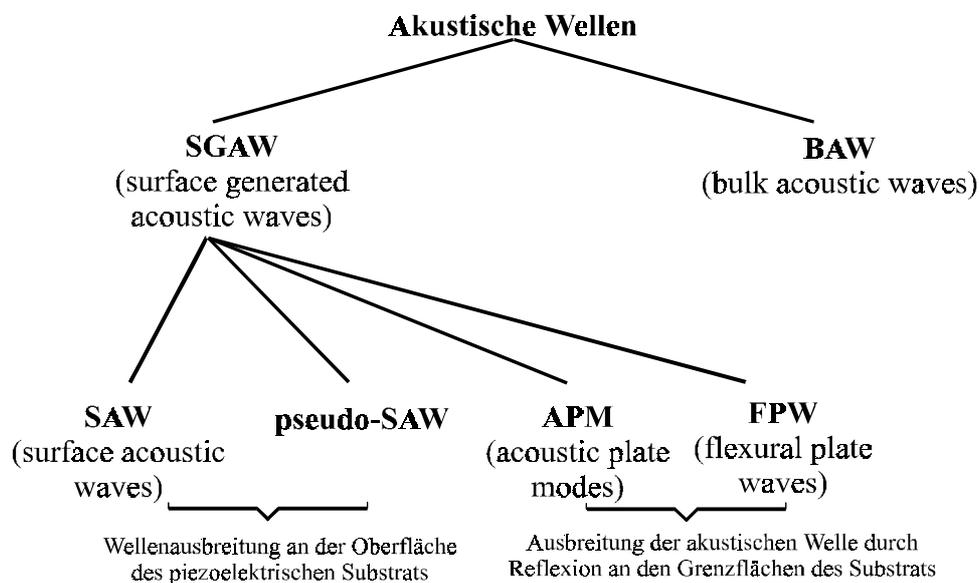


Abbildung 4: Einteilung von akustischen Wellen

Abbildung 4 gibt einen Überblick über verschiedene Typen akustischer Wellen, die von massensensitiven Sensoren genutzt werden [44; 45]. Die Einteilung erfolgt anhand der Art der Wellenausbreitung.

2.1.1 Oberflächenwellen-Sensoren (SAW-Sensoren)

Bei SAW (surface acoustic wave)-Sensoren wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer akustischen Welle zwischen zwei Elektroden gemessen. Die Elektroden befinden sich an gegenüberliegenden Enden des piezoelektrischen Substrates (Abbildung 5). Durch ihre Anordnung in einer kammartig verzahnten Struktur (interdigital transducer - IDT) bestimmen sie die Wellenlänge und die Breite des Wellenzuges. An der „Sende-Elektrode“ werden mechanische Wellen erzeugt (umgekehrter piezoelektrischer Effekt), die an der „Empfangs-Elektrode“ wieder in ein elektrisches Signal zurückverwandelt werden können (piezoelektrischer Effekt) [23]. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung dieser mechanischen Wellen beträgt z.B. im Quarz etwa 3100 m/s. Durch Änderungen von viskosen, elastischen und elektrischen Eigenschaften des Substrats bzw. angekoppelter Schichten wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit und die Amplitude der Welle beeinflusst. Außerdem beeinflusst die Temperatur die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Wellen.

Erfolgreich angewendet werden SAW-Sensoren zur Messung von Temperatur [46], Feuchte [47], zum Nachweis von gasförmigen Analyten [48] und zum Nachweis von Phasenübergängen von Polymeren [49]. Der Einsatz in Flüssigkeiten ist nicht möglich, weil sich die akustischen Wellen („Rayleigh-Wellen“) aufgrund von Energieverlusten in Flüssigkeiten praktisch nicht ausbreiten können.

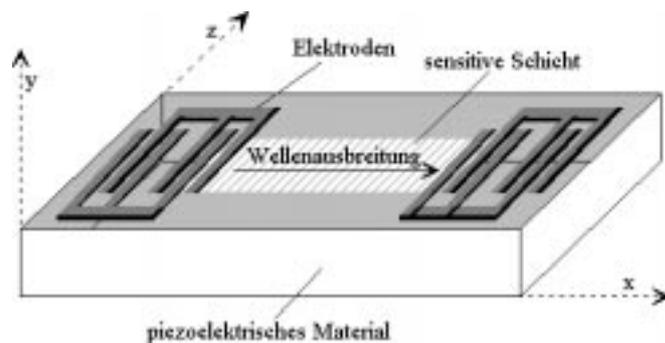


Abbildung 5: Oberflächenwellen-Sensor (SAW-Sensor)

Ein entscheidender Vorteil von SAW-Sensoren ist deren planare Struktur und der damit verbundene geringe technologische Herstellungsaufwand. Desweiteren ist die hohe Empfindlichkeit dieser Sensoren ein wichtiges Anwendungskriterium. Demgegenüber steht der große schaltungstechnische Aufwand, der wegen der hohen Arbeitsfrequenzen (100...500 MHz) erforderlich ist.

2.1.2 Pseudo Oberflächenwellen-Sensoren

Eine andere akustische Welle (pseudo- oder leaky- SAW) breitet sich ebenfalls entlang der Oberfläche aus, wird aber in Ausbreitungsrichtung abgeschwächt [24]. Die Abschwächung geht mit einem Anstieg der Wellenamplitude im Kristall einher. In bestimmten Kristallordnungen ist aber auch eine nahezu ungedämpfte Ausbreitung dieser Wellen möglich.

Man verwendet LiNbO_3 und LiTaO_3 . Zusätzlich verursachen pseudo-akustische Wellen Scherdeformationen an den Kristallflächen, die bei Applikationen in Flüssigkeiten ausgenutzt werden.

Angewendet wurden pseudo-SAW Sensoren z.B. zum enzymatischen Nachweis von Harnstoff [50] und als Geschmackssensoren [51].

2.1.3 Akustische Platten-Modus-Sensoren (APM-Sensoren)

Die Ausbreitung der akustischen Wellen erfolgt in SAW- und pseudo SAW-Sensoren entlang der Oberfläche des piezoelektrischen Substrats. Unter akustischen Wellen im Plattenmodus versteht man die Wellen, die innerhalb der Kristallscheibe angeregt werden können. Die Ausbreitung der akustischen Welle erfolgt parallel zur Substratoberfläche durch Reflexion an den Grenzflächen. Die Geschwindigkeit der Wellenausbreitung liegt in der gleichen Größenordnung wie die der Oberflächenwellensensoren (4513 m/s). Durch die Belegung der Substratoberfläche mit einer sensitiven Schicht kommt es zu Phasenverschiebungen der reflektierten Welle (Abbildung 6). Da keine Energie in angrenzende Medien abgestrahlt wird (Dämpfungen), sind diese Sensoren gleichermaßen für den Einsatz in Gasen und Flüssigkeiten geeignet [52].

Analog zu den SAW-Sensoren werden auch hier IDT verwendet, die die Wellenlänge definieren. Allerdings werden die Elektroden auf der der Flüssigkeit abgewandten Seite des Substrats fixiert. Dadurch sind die Elektroden vor störenden Einflüssen des Mediums geschützt.

Von Ricco und Martin wurden APM-Sensoren zur Untersuchung von Viskositäten verwendet [53]. Andle et.al. verwendeten APM-Sensoren für immunologische Studien und zeigten die Möglichkeit des Einsatzes bei der Untersuchung der Hybridisierung von DNA [54].

2.1.4 Biege-Plattenwellen-Sensoren (FPW-Sensoren)

Die empfindlichsten Bauelemente, die die Ausbreitung akustischer Wellen beschreiben sind Biege-Plattenwellen Sensoren (auch Flexural Plate Waves - FPW oder Lamb Waves - LW). Ursache für die hohe Sensitivität ist die geringe Schichtdicke des piezoelektrischen Materials (Membran), die kleiner ist als die Wellenlänge der akustischen Welle. Die Membran hat einen mehrschichtigen Aufbau, sie besteht aus Siliziumnitrid, Aluminium

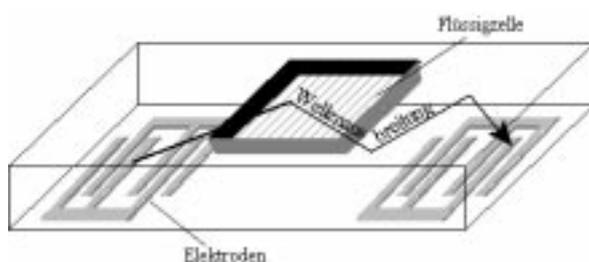


Abbildung 6: Akustischer Platten-Modus-Sensor (APM-Sensor)

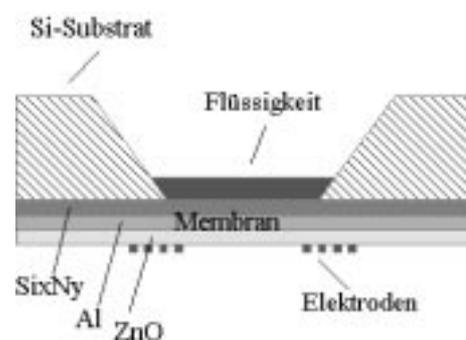


Abbildung 7: Biege-Plattenwellen-Sensor

und Zinkoxid (Abbildung 7). Weil die Flüssigkeit von den Elektroden (i.a. IDTs) getrennt ist, besteht auch die Möglichkeit, eine derartige Sensorkonfiguration in leitfähigen Medien anzuwenden [55]. Mit Hilfe der Mikrosystemtechnik werden diese Membranen erzeugt. Diese extrem sensitive Technik wurde bisher wegen der Zerbrechlichkeit der Membranen und des großen Herstellungsaufwandes nicht als Biosensor eingesetzt [56].

2.1.5 Volumenwellen-Sensoren (BAW-Sensoren)

Eine ständig wachsende Anzahl der Arbeiten, die sich mit akustischen Sensoren beschäftigen behandeln BAW-Sensoren (oder auch: *QCM* [*quartz crystal microbalance*]; *TSM* [*thickness shear mode*] und *QMB* [*Quarzmikrobalance*]-Sensoren). Sie bestehen aus Quarzscheiben mit beidseitig aufgetragenen Elektroden (Abbildung 8). Beim Anlegen einer Wechselspannung werden Dickenscherswingungen erzeugt (*umgekehrter piezoelektrischer Effekt*). Masseanlagerungen an den Elektroden erzeugen eine Verschiebung der Resonanzfrequenz. Diese Resonanzverschiebung wird als sensorischer Effekt genutzt.

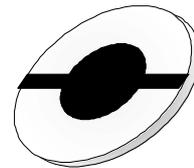


Abbildung 8: Quarzscheibe mit aufgedampften Elektroden

Angewendet wurde die Massensensitivität von Quarzkristallen schon in den Anfängen des Radios. Hier wurden die Empfangsfrequenzen durch Bleistiftstriche auf Quarzscheiben (Masseablagerungen) eingestellt. Heute werden massensensitive Elemente auf Basis der BAW-Sensoren vor allem als Schichtdickenmeßeinrichtung in Sputter- und Bedampfungsanlagen [57], zum Nachweis von Geruchsstoffen mit Hilfe elektronischer Nasen [58] und zur Gasanalytik [59] eingesetzt. Erst seit Mitte der 80er Jahre, mit der Entwicklung der Biosensorik, wurden verstärkte Anstrengungen unternommen, um die Technik zum Nachweis von Analyten in wässrigen Medien einzusetzen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet, die sich vor allem mit Immunotechniken, der Hybridisierung von Nukleinsäuren, der Untersuchung von Biofilmen, enzymatischen Systemen sowie Untersuchungen an Rezeptorsystemen beschäftigen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Wechselwirkungen an Oberflächen von BAW-Sensoren. Aus diesem Grund widmet sich das folgende Kapitel den grundlegenden Theorien dieser Meßtechnik.

2.2 Grundlagen der Quarzmikrobalance (QMB)

2.2.1 Piezoelektrische Eigenschaften von Quarzkristallen

Durch Umkehrung des *piezoelektrischen Effektes* erzeugt man mechanische Deformationen eines piezoelektrischen Festkörpers. Beim Anlegen einer Wechselspannung kommt es zur Ausbildung von Schwingungsmodi, die im Resonanzfall ein Maximum der

Schwingungsamplitude erreichen. Da bekannt ist, in welchen kristallographischen Richtungen der größte Piezomodul auftritt, schneidet man gitterorientierte Quarzscheiben aus einem Einkristall heraus. Durch das Anlegen des Schnittes werden die Eigenschaften der Quarzscheibe hinsichtlich deren Temperaturabhängigkeit (alle piezoelektrischen Festkörper besitzen pyroelektrische Eigenschaften) und hinsichtlich der Vorzugsrichtung der Schwingungen bestimmt. Man kennt Torsions-, Scher- und Biegeschwinger. Die als massensensitiven Sensoren eingesetzten Schwingquarze werden bevorzugt im Dickenschermodus, dem massenempfindlichsten Modus, angeregt. Dabei sind die Schnittwinkel der Kristallscheiben um die X-Achse aus der XY-Ebene herausgedreht (Abbildung 9) [21].

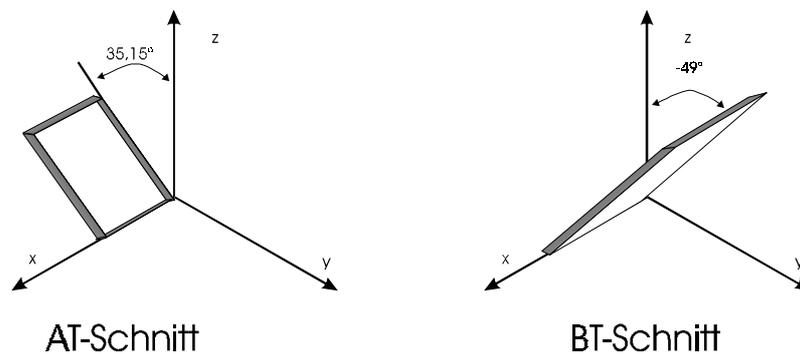


Abbildung 9: AT- und BT-Schnittwinkel von Quarzkristallen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich AT-geschnittene Quarzkristalle verwendet, die bei 25°C ein Plateau mit kleinen Temperaturkoeffizienten aufweisen [60].

2.2.2 Schwingungsverhalten von Quarzen

Außer durch die Eigenschaften des Quarzmaterials selbst wird das Schwingungsverhalten eines Quarzes durch die Temperatur, durch Masseanlagerungen und durch Flüssigkeitskontakt beeinflusst.

Der Einfluß der Temperatur kann mit Hilfe einer kubischen Parabel beschrieben werden[61]:

$$\Delta f = f_0(1 + \alpha' \vartheta + \beta' \vartheta^2 + \gamma' \vartheta^3) \quad (2.2)$$

Die Resonanzfrequenz (f) bei einer Temperatur (ϑ) ist abhängig von der Resonanzfrequenz bei 0°C (f_0) und den Temperaturkoeffizienten α' , β' und γ' . Weil der lineare Temperaturkoeffizient (α') bei den Schnittwinkeln 35°15' und - 49° nahe Null ist, zeichnen sich die AT- und BT-Schnitte durch eine geringe Temperaturabhängigkeit ($\Delta f/\vartheta \gg 1$ Hz/K) aus. Wesentlich temperaturempfindlicher sind z.B. HT-geschnittene Quarze ($\Delta f/\vartheta \gg 10^3$ Hz/K), die als Temperatursensoren eingesetzt werden [62].

Der Einfluß von Masseanlagerungen an Quarzsensoren wurde 1959 von Sauerbrey theoretisch beschrieben [63]. Ausgehend von der Resonanzbedingung, nach der die Schichtdicke der Quarzscheibe d_q gleich der halben Wellenlänge der akustischen Welle λ_q sein muß

$$d_q = \lambda_q/2 \quad (2.3)$$

und der Geschwindigkeit der Ausbreitung der Welle v_q , die sich aus dem Produkt der Wellenlänge λ_q und der Resonanzfrequenz f_q des Quarzes ergibt,

$$v_q = \lambda_q f_q \quad (2.4)$$

läßt sich die Frequenzänderung Δf_q in Abhängigkeit von der Änderung der Schichtdicke Δd_q definieren

$$\frac{\Delta d_q}{d_q} = -\frac{\Delta f_q}{f_q}. \quad (2.5)$$

Den analogen Schluß kann man für die Änderung der Masse des Quarzes Δm_q ziehen

$$\frac{\Delta m_q}{m_q} = -\frac{\Delta f_q}{f_q}. \quad (2.6)$$

Fremdschichten mit der Masse m_F werden als adäquate Quarzsichten behandelt. Das heißt die viskoelastischen Eigenschaften der Fremdschichten müssen denen des Quarzmaterials ähnlich sein. Desweiteren wurde von Sauerbrey der Begriff der Massendichte M_F als Produkt aus Schichtdicke d_F und Dichte der Fremdschicht ρ_F eingeführt:

$$M_F = d_F \rho_F. \quad (2.7)$$

Es gilt weiterhin für die Abhängigkeit der Massendichte von der Frequenzänderung die Beziehung:

$$\frac{\Delta f_q}{f_q} = -\frac{\Delta M_F}{M_q} \quad \text{oder} \quad \Delta f_q = -f_q \frac{\Delta M_F}{M_q} \quad (2.8)$$

Durch Einsetzen der Gleichungen (2.4) und (2.7) in die Gleichung (2.8) erhält man

$$\Delta f_q = -2f_q^2 \frac{1}{\rho_q v_q} M_F = -c_F M_F. \quad (2.9)$$

$$\rho_q (2,648 \text{ g/cm}^3) - \text{Dichte}; v_q (3340 \text{ m/s}) - \text{Schallgeschwindigkeit}$$

Gleichung (2.9) gibt die Abhängigkeit der Frequenzänderung von einer Konstante c_F , die durch die Eigenschaften des Quarzes bestimmt wird, und von der Massendichte der Fremdschicht wieder. Demzufolge ist die Empfindlichkeit von Schwingquarzen quadratisch abhängig von der Anregungsfrequenz f_q . Eine Frequenzänderung von beispielsweise 100 Hz, die mit herkömmlichen 10 MHz-Quarzen registriert wurde, entspricht unter analogen Versuchsbedingungen bei Verwendung von 30 MHz-Quarzen einer Frequenzänderung von 900 Hz.

Wegen der direkten Proportionalität zwischen Δf und M_F besteht die Möglichkeit, Frequenzänderungen zu berechnen und Schwingquarzsensoren zu kalibrieren. Aus Gl 2.9 geht hervor, daß eine Massebelastung von 4,4 ng auf 1 cm² Elektrodenfläche eines AT-geschnittenen 10 MHz Schwingquarzes eine Frequenzänderung von 1 Hz hervorruft.

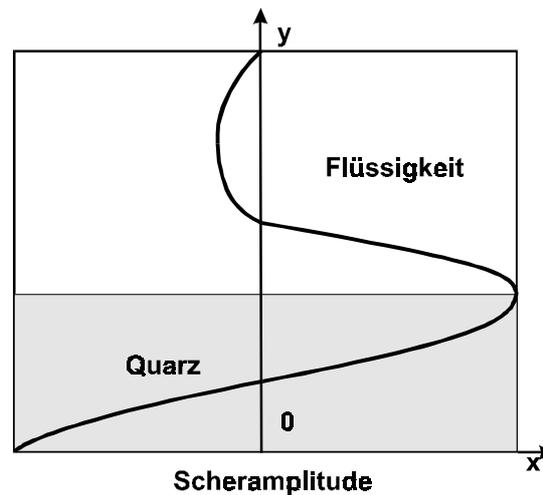


Abbildung 10: Dämpfung der akustischen Welle beim Eindringen in Flüssigkeiten durch die Viskosität des Mediums

Neben dem Einfluß von Temperatur und Masse ist der viskoelastische Einfluß von Beschichtungen und angrenzenden Medien zu beachten. Die akustische Welle dringt nur endlich in angrenzende Medien ein. Die Fortpflanzung der Scheramplitude der akustischen Welle (in Abbildung 10 dargestellt) ergibt sich aus der Navier-Stokes-Differentialgleichung [61]. Bei einem 10 MHz Schwingquarz beträgt die Eindringtiefe in Wasser (bei 20°C) 0,5 μm . Das bedeutet, daß Messungen nur im mikroskopisch nahen Grenzbereich an der Oberfläche stattfinden [64].

Gordon und Kanazawa stellten 1985 ein empirisches Modell vor, mit dem sie den Einfluß von Viskosität η_1 und Dichte ρ_1 von Flüssigkeiten auf die Änderung der Resonanzfrequenz beschreiben konnten [65; 66].

$$\Delta f = f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_1 \cdot \rho_1}{\pi \cdot \mu_q \rho_q}} \quad (2.10)$$

Die Dichte ρ_q des Quarzes (2,648 g/cm^3) und das Schermodul μ_q ($2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm} \cdot \text{s}^2$) sind charakteristische Eigenschaften des Kristalls. Der Einfluß von Viskosität und Dichte der Grenzschicht kann somit den Effekt der Massenadsorption überlagern. In Abbildung 11 ist die Frequenzabhängigkeit von Viskosität und Dichte (Wasser bei verschiedenen Temperaturen) für 10; 20 und 30 MHz Schwingquarze dargestellt [67]. Aus dem Kurvenverlauf erkennt man Unterschiede bezüglich der Sensitivität der Quarze gegenüber temperaturbedingten Viskositätsänderungen. Ein 10 MHz-Quarz hat einen deutlich niedrigeren Temperaturkoeffizienten (15 Hz/K; im Temperaturintervall 30...50°C) als ein 30 MHz-Quarz (82 Hz/K; im Temperaturintervall 30...50°C).

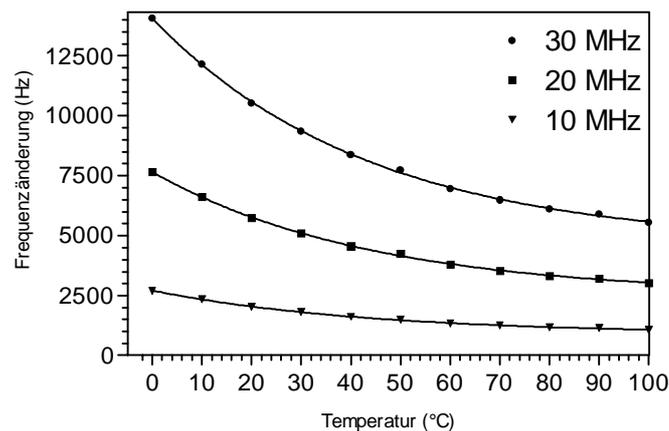


Abbildung 11: Frequenzänderungen von 10; 20 und 30 MHz Quarzen in Abhängigkeit von der Dichte und der Viskosität von Wasser im Bereich von 0 bis 100°C, berechnet nach Gordon und Kanazawa (Gl.: 2.10)

Die Abhängigkeit der Frequenz von der Viskosität ist somit ein wesentlicher Störfaktor bei QMB-Untersuchungen in Flüssigkeiten. Temperaturschwankungen führen auch indirekt zur Verschiebung der Resonanzfrequenz. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer optimalen Temperaturregulierung ($\pm 0,1$ K). In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend 10 MHz-Quarze verwendet, um diese Nebeneffekte zu minimieren.

2.2.3 Nebeneffekte bei QMB-Untersuchungen in Flüssigkeiten

Wie im vorhergehenden Abschnitt angedeutet, ist die Minimierung von Störgrößen eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung exakter Untersuchungen. Besonders in Flüssigkeiten ergeben sich aus dem Meßprinzip eine Reihe von Fehlerquellen, die man ausschließen muß. Prinzipiell sind Schwingquarze vollkommen unspezifische Massensensoren mit hoher Empfindlichkeit, d.h. sie nehmen jede Veränderung Ihrer Umgebung wahr und liefern ein entsprechendes Signal. Erst durch Modifizierung der Sensoranordnung (z.B. durch Beschichtungen) erreicht man eine Spezifität gegenüber einzelnen Analyten, Eigenschaften des Mediums oder anderen äußeren Parametern. Die Ursachen von Nebeneffekten sind verschiedene experimentelle Bedingungen, die sich teilweise gegenseitig beeinflussen. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die wesentlichen Fehlerquellen bei QMB-Experimenten.

Tabelle 2: Querempfindlichkeiten und Störgrößen bei QMB-Untersuchungen

<u>Eigenschaft des Mediums:</u>	<u>Sensordesign:</u>	<u>Grenzflächen:</u>	<u>Beschichtung:</u>
Viskosität	Temperatur	Oberflächenspannung	Schichtdicke
Dichte	Druckverhältnisse	Benetzbarkeit	Phasenübergänge
Dielektrizität	Strömungsverhalten	Rauhigkeit	Hydrophilie
Leitfähigkeit		Kontamination	Schichtstruktur

Demgegenüber ist es selbstverständlich auch möglich, jeden dieser „Fehler“ als analytisches Signal zu verwenden. Das bedeutet, daß für die spezielle Fragestellung Design, Medium, Grenzflächeneigenschaften und die Beschichtung angepaßt werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich Schwerpunkte zur Beschichtung und zum Design der Sensoranordnung gesetzt [68].

2.2.4 Modelle zur Beschreibung des Schwingungsverhaltens

Das komplexe Schwingungsverhalten von Quarzen in Flüssigkeiten kann man nicht simulieren. Durch Abstraktion und Anwendung vereinfachter Modelle können aber wesentliche Eigenschaften von Piezoschwingern veranschaulicht werden.

An dieser Stelle soll zunächst auf das *Butterworth-Van-Dyke-Modell (BVD-Modell)* eingegangen werden, das den Rückschluß auf Stoffkenngrößen gestattet [69]. Dieses Modell beschreibt das elektrische Verhalten eines Quarzes in Form eines elektrischen Ersatzschaltbildes (Abbildung 12).

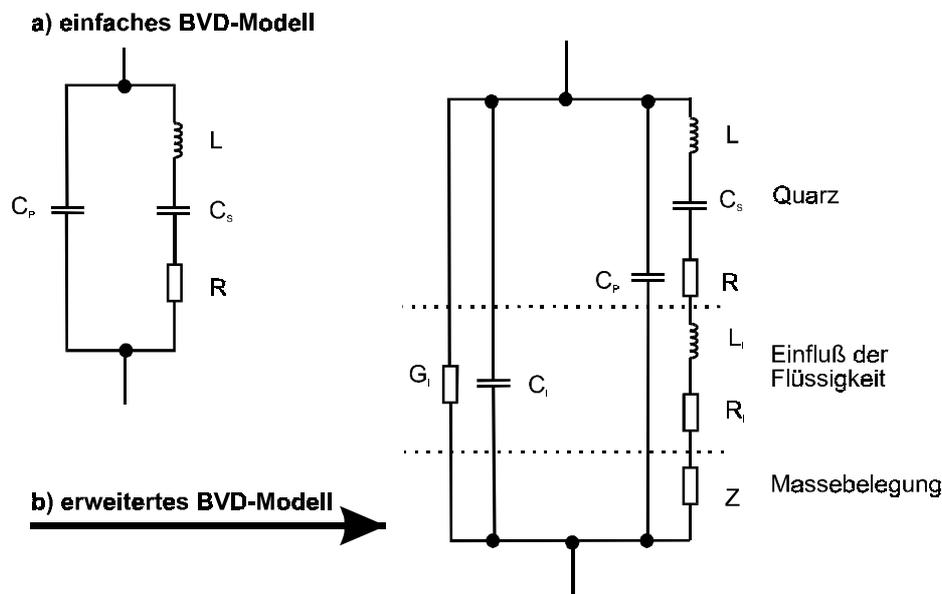


Abbildung 12: Ersatzschaltbilder zur Beschreibung des Schwingungsverhaltens von Quarzen nach Butterworth van Dyke: a) unbeschichteter Quarz in Gasen und b) Quarz mit Massebeladung in Flüssigkeiten

Die schwingende Masse des Quarzes (Abbildung 12 a) wird durch die dynamische Induktivität (L) und die mechanische Elastizität durch die dynamische Kapazität (C_s) ausgedrückt. Energieverluste, durch Abstrahlung und Reibung, werden mit einem Verlustwiderstand (R) beschrieben. Die einzige real existierende Größe, die Parallelkapazität (C_p), wird durch den „Plattenkondensator“ Elektroden/Quarzsubstrat gebildet. Die Größe der Parallelkapazität ergibt sich nach:

$$C_p = \frac{\epsilon_{22} \cdot A_{el}}{d_q} \quad (2.11)$$

aus der Dielektrizitätskonstante ϵ_{22} und der Dicke des Quarzes d_q sowie aus der Fläche der Goldelektrode A_{ej} . Aus den Gleichungen 2.12 bis 2.14 erkennt man, daß alle anderen Größen in diesem Modell mit der Parallelkapazität in Beziehung stehen [70].

$$C_s = \frac{8K_0^2 C_p}{(h\pi)^2} \quad (2.12)$$

$$L = \frac{1}{\omega_s^2 C_s} \quad (2.13)$$

$$R = \frac{\eta_q}{c_{66} C_s} \left(\frac{\omega}{\omega_s} \right)^2 \quad (2.14)$$

K_0 - piezoelektrischer Koppelfaktor; \bar{C}_{66} - Quarzkonstante; h - Nummer der harmonischen Oberwelle; η_q - dynamische Viskosität des Quarzes; ω - Kreisfrequenz; ω_s - Serienkreisfrequenz

Sauerbrey hat bereits 1961 diese theoretisch berechenbaren Ersatzparameter mit experimentell ermittelten Werten verglichen und deren Übereinstimmung nachgewiesen [71]. Damit ist auch praktisch die Gültigkeit dieses Modells, zumindest für dünne Elektroden ($0,3 - 10^{-4} \text{ g/cm}^2$), bestätigt.

Für den Einsatz in Flüssigkeiten wird das Modell erweitert (Abbildung 12 b), um den durch Viskosität, Dichte, Leitfähigkeit und Dielektrizität der Flüssigkeit veränderten Bedingungen gerecht zu werden. Im oberen Teil des Ersatzschaltbildes wird das Verhalten eines Quarzes im Vakuum simuliert. Die Größen R , L , C_s und C_p entsprechen denen im einfachen BVD-Modell (Abbildung 12 b). Erweitert wird dieses Modell um die Größen mit dem Index „l“, die das Schwingungsverhalten in der Flüssigkeit simulieren. Außerdem wird eine komplexe Größe Z eingeführt, die die Massenbelegung des Quarzes ausdrückt [72]. Im einfachsten Fall, d.h. für einseitig mit der Flüssigkeit in Kontakt stehende Quarze ("kein Kurzschluß") und bei Beschichtungen mit optimalen viskoelastischen Eigenschaften (dünne, starre Schichten), läßt sich das erweiterte Ersatzschaltbild auf das einfache BVD-Modell zurückführen.

Neben dem BVD-Modell soll noch auf das *Mason-Modell* hingewiesen werden. Auch dieses Modell bezieht sich auf Schichten, die im wesentlichen den Sauerbrey-Bedingungen entsprechen, d.h. auf starre und homogene Schichten. Im *Mason-Modell* werden Analogien zwischen elektrischen und mechanischen Wellen gezogen. Dadurch ist es möglich, die Ausbreitung der akustischen Wellen in mehreren Schichten auf ein elektrisches Leitungsmodell zu übertragen [73]. Mit Hilfe dieses Modells war es möglich, die empirische Formel für das akustische Verhalten von Quarzresonatoren in Flüssigkeiten (Gl. 2.10) theoretisch zu bestätigen. Wegen der Komplexität der Wellenausbreitung in viskoelastischen Schichten (z.B. Polymerfilme) ist es nicht möglich, deren akustisches Verhalten hinreichend genau zu modellieren.

2.3 Entwicklung der experimentellen Basis

2.3.1 Oszillatorschaltung

Mit Hilfe von Oszillatorschaltungen werden Quarze zur Schwingung angeregt. Meßbar sind Resonanzen, die man in niederohmige Serien- (f_s) und hochohmige Parallelresonanz (f_p) unterscheidet [74]. Im niederohmigen Bereich sind höhere Frequenzstabilitäten zu erzielen, weil die Störeinflüsse wirkungsvoll unterdrückt werden. Darüber hinaus können sich parasitäre Kapazitäten nicht störend auswirken, denn zwischen f_s und f_p liegt induktives Verhalten (Phasenwinkel: $+90^\circ$) und ansonsten kapazitives Verhalten (Phasenwinkel: -90°) vor. In Abbildung 13 sind der Impedanzverlauf und der Phasenwinkel eines ungedämpften Quarzes in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt. Im Falle der Serienresonanz erreicht die Impedanz ein Minimum bei einem Phasenwinkel von 0° , wohingegen beim Maximum der Impedanz Parallelresonanz auftritt und der Phasenwinkel sich um 90° verschiebt.

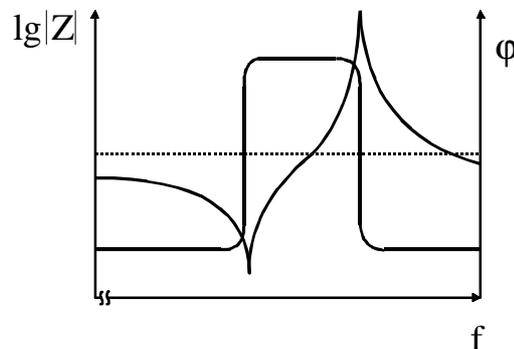


Abbildung 13: Impedanz (Z) und Phase (ϕ) eines ungedämpften Quarzes in Abhängigkeit von der Frequenz (f)

An Oszillatorschaltungen zum Betreiben von Schwingquarzen in Flüssigkeiten werden verschiedene Anforderungen gestellt. Wie bereits erwähnt ist der Betrieb in Serienresonanz zur Vermeidung von Störeinflüssen vorteilhaft. Weiterhin soll das Phasenrauschen unterdrückt werden und eine hohe Temperaturkonstanz gewährleistet sein, und schließlich muß die Meßkammer gegen elektrische Störeinflüsse abgeschirmt werden.

Um diese Anforderungen zu realisieren, stehen mehrere Schaltungsvarianten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Oszillatorschaltung, die unter Verwendung der integrierten Schaltung *OPA 660 (Burr-Brown)* an der Fakultät Elektrotechnik der Universität Magdeburg entwickelt worden ist, eingesetzt [75].

2.3.2 Entwicklung der Meßzelle

Das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte System dient zum Nachweis von Analyten in biologischen Systemen. Die Realisierung dieser sehr allgemeinen Prämisse erfordert ein hochgradig flexibles Sensorsystem. Trotzdem mußten bei der Umsetzung dieses Konzepts

bestimmte Randbedingungen eingehalten werden, die einerseits durch das Meßprinzip und andererseits durch die zu untersuchenden Systeme vorgegeben waren:

- durch einseitigen Kontakt zur Flüssigkeit Minimierung der mechanischen Dämpfung (siehe BVD-Modell, Abschn. 2.2.3.),
- kleines Probevolumen, wegen niedriger Analytkonzentration und schneller Ansprechzeit,
- Handhabbarkeit der Quarzscheiben, um die Quarze auszutauschen und verschiedene Beschichtungstechniken, unabhängig vom Material des Gehäuses anzuwenden,
- mechanische Stabilität zur Vermeidung von Verformungen der Quarze,
- Fixierung der Quarze ohne wesentliche Beeinflussung des Schwingungsverhaltens und
- Einhaltung eines strikten Temperaturregimes.

Die entscheidende Voraussetzung für den Einsatz von Schwingquarzen in Flüssigkeiten ist eine einseitige Schirmung der Quarzscheibe. Das stellt gleichzeitig die größte technologische Herausforderung bei der Konzipierung einer entsprechenden Meßzelle dar. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Sensorkonstruktionen getestet und entwickelt, die dieser Anforderung genügten.

Ausgangspunkt waren Untersuchungen mit PVC-Tauchkopfzellen, die bereits zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung standen. Eine derartige Zelle ist in Abbildung 14 dargestellt.

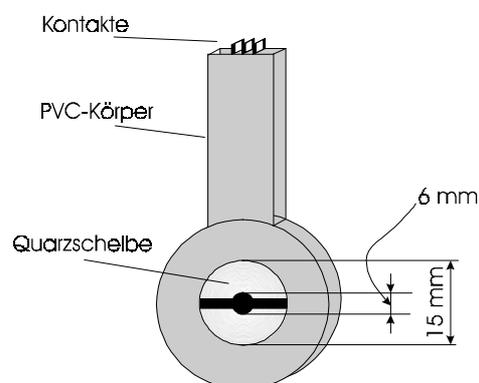


Abbildung 14: Tauchkopfzelle

Der Vorteil der Tauchkopfzellen liegt im wesentlichen in deren einfacher Handhabung. Diese Zellen sind leicht austauschbar und ohne Aufwand herzustellen. Von Bedeutung für das Resonanzverhalten ist weiterhin, daß die Quarzscheibe nahezu spannungsfrei mit Silikon in der Zelle fixiert wurde. Tauchkopfzellen besitzen aber auch entscheidende Nachteile. So ist es generell wegen des Gehäusematerials und der eingesetzten Verbundstoffe nicht möglich, Beschichtungen in organischen Medien durchzuführen, die Quarzscheiben sind nicht austauschbar und für die Untersuchungen wird ein großes Probevolumen benötigt.

Die Weiterentwicklung der Zellentechnologie führte zu Edelstahldurchflußzellen, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden. Auch in diesen Zellen wurden die Quarzscheiben mit Silikon fixiert. Vorteilhaft ist die Möglichkeit, bis zu fünf Sensoren

parallel anzuregen. Diese Zellen sind besonders für Untersuchungen unspezifischer Adsorptionen geeignet, da die gleichzeitige Registrierung mehrerer Sensorantworten zu einem charakteristischen Signalmuster führt. Von Nachteil ist hier ebenfalls, daß die Quarzscheiben nicht austauschbar sind und daß ein relativ großes Totvolumen in der Zelle vorhanden ist.

Die in Abbildung 15 dargestellte, miniaturisierte Zelle wurde speziell zum Nachweis von Wechselwirkungen in Flüssigkeiten entwickelt. Diese Zelle besteht aus drei Teilen:

- einer Grundplatte, in der über eine Nut der Quarz mit Halterung fixiert werden kann
- einem Mittelteil mit dem die Quarzscheibe über Dichtungsringe fixiert wird und
- einem konisch gearbeiteten Oberteil, in dem Schlauchanschlüsse und Flüssigkeitskanäle vorhanden sind.

Die Einzelteile werden durch Verschraubungen fixiert. Aufgrund des geringen Totvolumens von nur 200 μl sind mit dieser Konstruktion Studien zum Adsorptionsverhalten von Analyten, die nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, durchführbar. Die Zugabe von Analyt ist sowohl über eine eingearbeitete Injektionsstelle als auch durch direktes Einspülen möglich. Ein wesentlicher Vorteil der neuen Konstruktion ist daß die Quarzscheiben ausgetauscht und extern beschichtet werden können. Die elektrische Kontaktierung wurde über Federkontakte realisiert. Zur einfacheren Handhabung wurden diese Kontakte mit einer Führung verbunden, die sowohl den Einbau in die Meßzelle erleichtert als auch den Transport beschichteter Quarze ohne Zerstörung der Schichten gestattet.

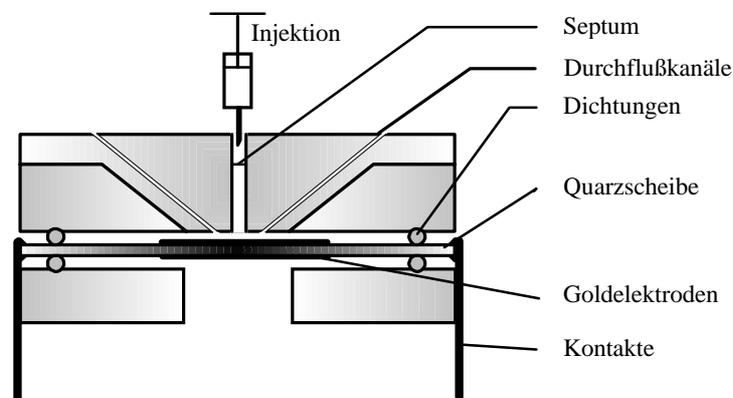


Abbildung 15: Miniaturisierte Meßzelle für biochemische Untersuchungen

Das Resonanzverhalten eines in einer miniaturisierten Meßzelle fixierten Quarzes ist anhand des Phasenwinkels und des Impedanzverhaltens in Abbildung 16 dargestellt. Trotz der mechanischen Belastung des Kristalls durch die Fixierung zwischen Dichtungsringen bleibt der Einfluß auf die akustischen Eigenschaften relativ gering. Der nahezu ideale Kurvenverlauf (vgl. Abbildung 13) verdeutlicht das.

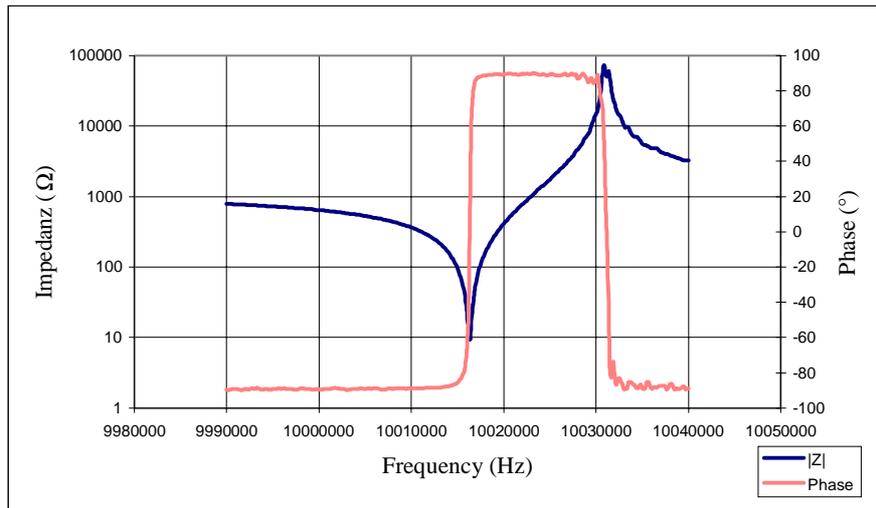


Abbildung 16: Phasenwinkel und Impedanzverhalten eines ungedämpften 10 MHz AT-geschnittenen Schwingquarzes, fixiert in einer miniaturisierten Meßzelle angeregt durch eine modifizierte Oszillatorschaltung [75].

Im Ergebnis der Arbeit wurde ein komplettes QMB-System entwickelt, welches auf der beschriebenen miniaturisierten Meßzelle basiert. Technologische Verbesserungen werden wegen der Möglichkeit der Thermostatierung des Gesamtsystems, wegen der Möglichkeit, zwei Messungen parallel durchzuführen und wegen des verbesserten Pumpensystems erhofft. In Abbildung 17 ist ein derartiges Komplettsystem abgebildet, welches sich derzeit in der Erprobung befindet.

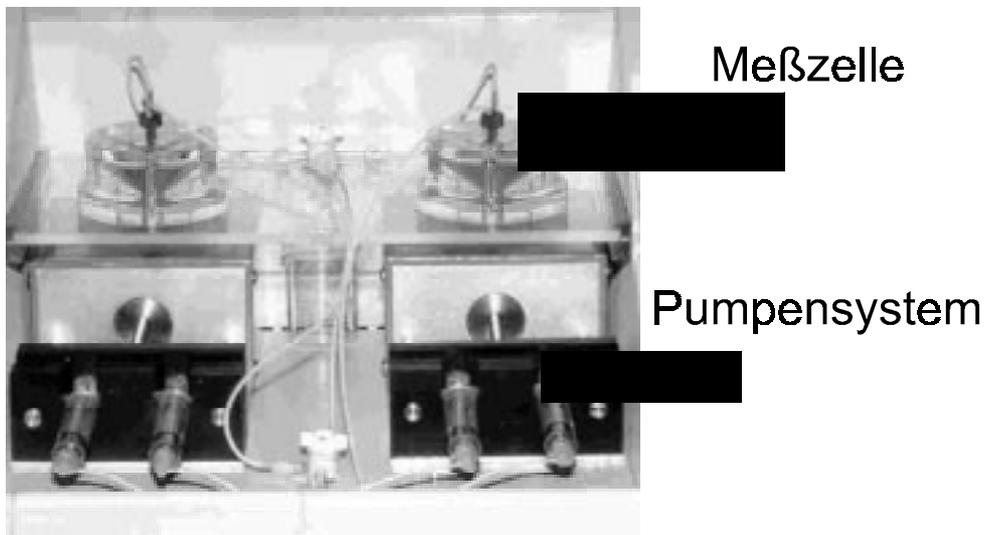


Abbildung 17: QMB-Sensorsystem mit zwei miniaturisierten Meßzellen

3 Anwendungen der Quarzmikrobalance

3.1 Einleitung

Das wachsende Interesse an Schwingquarzsensoren dokumentiert die Zunahme der Publikationen in den vergangenen 10 Jahren. Unabhängig davon, mit welchem Teilgebiet sich die einzelnen Artikel beschäftigen erkennt man das ständig wachsende Interesse an dieser Meßtechnik, denn die Anzahl der Veröffentlichungen hat sich innerhalb dieses Zeitraumes nahezu verzehnfacht [76].

Die Anwendung der QMB-Technik zum Nachweis von Analyten in Gasen stellt den Schwerpunkt der internationalen Forschungstätigkeit dar. So gehören Dickenmessungen von Metallfilmen auf Quarzsubstraten [77] mittlerweile zu Routineanalysen in Sputter- und Bedampfungsanlagen. Vielfältiger sind dagegen die Anwendungsmöglichkeiten als Sensor in der Verfahrenstechnik, der Umweltanalytik, der medizinischen Diagnostik usw. Auch hier hat sich zunächst die Anwendung in Gasen etabliert. Diese Applikationen haben generell den Vorteil, daß eine Vielzahl von Fehlerquellen, die in Flüssigkeiten zu Fehlinterpretationen der Meßergebnisse führen von vornherein ausgeschlossen werden können. Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Anwendung der QMB-Technik in Gasen mit einigen Beispielen aus der Biosensorik eingegangen. Anschließend wird eine zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen in flüssigen Medien zum Nachweis von biochemischen Wechselwirkungen gegeben.

3.2 Anwendungen in Gasen

Eine typische Sensoranordnung zur Durchführung von QMB-Messungen ist in Abbildung 18 dargestellt. Das gasförmige Trägermedium (Stickstoff, Luft, Argon o.a.) wird als Referenzstrom an der Oberfläche des Sensors entlang geleitet. Der Analyt wird in einer zweiten Schleife durch das Trägermedium zum Sensor geschleppt. Dabei kann der Analyt sowohl im gasförmigen als auch im gelösten Zustand vorliegen.

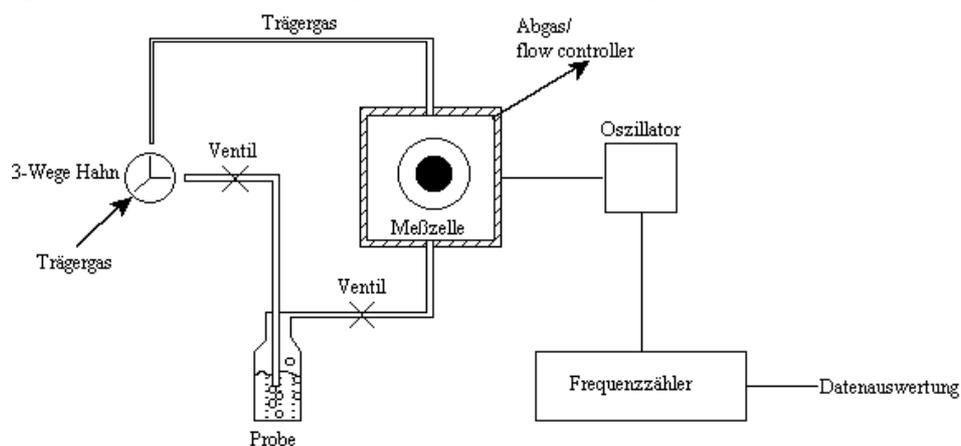


Abbildung 18: Schematische Darstellung einer QMB-Anordnung für Gasuntersuchungen

Voraussetzung für die Entwicklung von QMB-Sensoren zum Nachweis von gasförmigen Substanzen ist die Fixierung sensitiver und selektiver Schichtmaterialien auf dem Sensor (Metallelektrode). Als Beschichtungsmaterialien werden Polymere [78], Käfigverbindungen [79], Mono- und Multischichten [80] oder bioorganische Verbindungen verwendet. Mit Hilfe von massensensitiven Gassensoren wurden z.B. Kohlenmonoxid [81], Phosgen [82], Chlorwasserstoff [83], Blausäure [84], Ozon [85] und andere niedermolekulare Gase detektiert. Eine Übersicht zu Anwendungen von QMB-Gassensoren wurde 1991 von Nieuwenhuizen [23] publiziert.

Die erste Anwendung der QMB-Technik, bei der Proteine auf der Sensoroberfläche immobilisiert wurden, wurde 1983 von **Guilbault** [86] veröffentlicht. Durch Immobilisierung von Enzymen gelang es, Formaldehyd zu detektieren. Das Enzym Formaldehyddehydrogenase katalysiert in Anwesenheit der Cofaktoren NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) und GSH (Glutathion) die Oxidation von Formaldehyd zu Essigsäure. Der Massezuwachs aufgrund der Ausbildung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen konnte nachgewiesen werden. Guilbault zeigte, daß die Sensorstabilität bei nicht kovalent gebundenen Enzymen (Auftropfmethode) niedriger ist als bei kovalent gebundenen Enzymen (Glutardialdehyd-Methode). Die Signalantworten, mit Frequenzänderungen bis zu 500 Hz, waren proportional der Formaldehyd-Konzentration in Luft im Bereich von 10 ppb bis 10 ppm.

Die selektive Wechselwirkung des Pestizids Parathion (O,O-Diethyl-O-(4-nitrophenyl)-thiophosphat) mit Antikörpern wurde von **Ngeh-Ngwainbi** et al. zur Entwicklung eines QMB-Gassensors genutzt [87]. Auch hier wurde die Auftropfmethode zur Immobilisierung der Parathion-Antikörper genutzt. Es wurde festgestellt, daß es bei Verwendung von Silberelektroden zur Denaturierung der Proteine kam. Antikörperbeschichtete Goldelektroden zeigten jedoch eine signifikante Wechselwirkung mit dem Antigen. Außerdem wurde die Querempfindlichkeit der Reaktion getestet. Als Testsubstanzen wurden Malathion (S-[1,2-Bis(ethoxycarbonyl)ethyl]-O,O-dimethyldithiophosphat) und Methylparathion (O,O-Dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-thiophosphat) verwendet. Ngeh-Ngwainbi et al. stellten fest, daß Parathion im Vergleich zu Malathion 3-fach sensitiver und im Vergleich zu Methylparathion 4-fach sensitiver reagiert.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie zum Nachweis der Adsorption niedermolekularer organischer Verbindungen wurden von **Chan** et al. [80] Monoschichten als Adsorptionsmaterial verwendet. Ein Self-Assembling Verfahren wurde angewandt, um goldbedampfte Schwingquarze mit 6-Hydroxyhexan-1-thiol und 6-Benzylhexan-1-thiol zu beschichten. Die dabei entstehenden hochgeordneten Schichten sind in der Lage, niedermolekulare organische Verbindungen zu detektieren. Proportional zum Massezuwachs der Analyten auf der Sensoroberfläche ändert sich die Frequenz der Quarze, womit z.B. Ethanol bis zu einer Konzentration von 10 ppm (in Stickstoff) nachweisbar war.

3.3 QMB-Biosensoren in Flüssigkeiten

Anwendungen der QMB-Technik in Flüssigkeiten werden erst seit Mitte der 80er Jahre beschrieben. Das liegt zum einen an dem allgemein gestiegenen Interesse an der Entwicklung von Biosensoren und andererseits an der Zunahme der theoretischen Kenntnisse über das Schwingungsverhalten der Quarze in Flüssigkeiten [65]. Schwerpunkte sind immunologische und enzymatische Untersuchungen sowie neue Verfahren zur Detektion von Nucleinsäuresequenzen und der Nachweis von Rezeptorwechselwirkungen.

3.3.1 Immunosensoren

Eine breite Palette an Beispielen der Anwendung der QMB-Technik zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern findet man in der Literatur. Dabei wird die Spezifität und die hohe Bindungsaffinität immunologischer Reaktionen zur Fertigung selektiver Sensoren genutzt.

Die erste Arbeit zur Anwendung der QMB-Technik als Immunosensor in Flüssigkeiten wurde von **Shons** et al. 1972 vorgestellt [88]. Die Arbeitsgruppe verwendete 5 MHz-Schwingquarze zum Nachweis der Antikörperaktivität in Lösungen. Die mit Antikörpern beschichteten Quarze wurden mit spezifischen und unspezifischen Seren versetzt, wobei lediglich das spezifische Antiserum reagierte. Die Frequenzänderungen waren proportional der Konzentration an Antigen.

Durch die Anwendung verschiedener Elektrodengeometrien, den Einsatz von Lösungen unterschiedlicher Viskositäten und mit Hilfe neuer Beschichtungstechniken gewannen **Thompson** et al. [89] neue Erkenntnisse zur Applikation von Quarzresonatoren. Sie stellten fest, daß unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen die von Gordon und Kanazawa formulierte Gleichung (Gl. 2.10) zur Frequenzabhängigkeit in Flüssigkeiten nicht zutrifft. Ursache sind Mikroviskositäten an der Sensoroberfläche. Für die Untersuchungen wurden Stearinsäuremono- und Stearinsäuremultischichten sowie unbeschichtete Elektroden verwendet und deren Wechselwirkungen mit Immunglobulin G (IgG) in verschiedenen Lösungen getestet. Desweiteren wurden Untersuchungen mit immobilisierten Antigenen und Antikörpern durchgeführt. Thompson et al. immobilisierten Antigene mit Polyacrylamid/Glutaraldehyd und mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan [90].

Verbesserungen in der Beschichtungstechnik wurden durch die „Protein A Methode“ erzielt. **Muramatsu** et al. [91] haben das Anhaften von Immunglobulinen an Protein A beschichteten 9 MHz Kristallen verfolgt. Protein A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (MG 42000), das Immunglobuline (Ig) bindet, ohne deren Antigenbindungsvermögen zu beeinflussen. Die Adhäsion von Protein A erfolgt auf aktivierten Oberflächen (Aminopropyltriethoxysilan und Glutaraldehyd; siehe Kapitel 4). Beim Anhaften von Immunglobulin G (IgG) wurden Frequenzänderungen von ca. 250 Hz registriert. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Wechselwirkung vom pH-Wert des Puffermediums gezeigt. Mit Hilfe der untersuchten Systeme konnten IgG-Konzentrationen im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-2} mg/ml nachgewiesen werden.

Während Muramatsu et al. noch „Endpunktmessungen“ (Messungen der absoluten Frequenz vor und nach der Reaktion an Luft) durchgeführt haben, wurden von **Davis und Leary** [92], online Untersuchungen in Flüssigkeiten durchgeführt. Sie verwendeten dazu einen einseitig mit der Flüssigkeit kontaktierten 10 MHz Schwingquarz. Außerdem nutzten sie ebenfalls Protein A, vereinfachten jedoch die Immobilisierungsmethode, indem sie das Protein direkt an der Goldelektrode fixierten (Assoziationskonstante: $10^8/M$). Davis und Leary zeigten anhand der unterschiedlichen Frequenzänderungen von Quarzen, die über einen Zeitraum von 15 min, 30 min oder 45 min bei Raumtemperatur in Protein A - Lösung behandelt wurden, die unterschiedlichen Adsorptionsgeschwindigkeiten. Demnach waren nach 15 min 54% der Oberfläche und nach 45 min 70% der Oberfläche mit Protein A bedeckt. Optimal ist eine mehrstündige Verweilzeit in der Protein A - Lösung bei pH 5,5 (isoelektrischer Punkt). Die Zugabe von Antikörpern (Schaf) zu den auf der Sensoroberfläche adsorbierten humanen Immunoglobulinen gab eine signifikante Frequenzänderung.

Ein neues Konzept, das den Nachweis von kleinen Molekülen bzw. von Molekülen mit großem Platzbedarf (geringe Masseänderungen) gestattet, wurde von **Ebersole und Ward** [93] entwickelt. Untersucht wurde die Adsorption von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) – Reduktase. Das Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren. Ebersole und Ward verfolgten zwei Strategien. Erstens wurden Substrate verwendet, die enzymatisch umgewandelt werden und sich auf der Sensoroberfläche proportional zur Anzahl der immobilisierten Antikörper ablagern. Dabei wurde speziell der Nachweis von APS-Reduktase mit einem Phosphatase-BCIP* -Komplex untersucht.

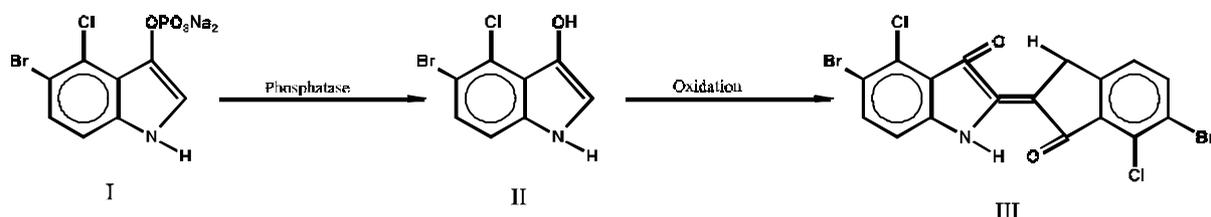


Abbildung 19: Enzymatische Hydrolyse von BCIP* (I); das entstandene Enol (II) wird an Luft zum unlöslichen, blauen BCIP-Dimer (III) oxidiert (der Enzym-BCIP-Komplex bindet spezifisch an APS-Reduktase)

Die entstehenden Sandwichkomplexe (Antikörper/APS-Reduktase/Phosphatase-BCIP-Komplex) geben eine deutliche Signalverstärkung im Vergleich zur direkten Bindung der APS-Reduktase. Ein zweites Beispiel, bei dem ebenfalls Sandwichkomplexe verwendet wurden, diente zum Nachweis des Hormons Choriogonadotropin (hCG – human chorionic gonadotropin). Ein Enzymimmunokomplex aus anti-hCG und Meerrettich-Peroxidase (HRP) koppelt mit dem Hormon. Das Enzym katalysiert die Bildung von I_2/I_3^- wodurch ein Polyvinylferrocen-Film auf der Sensoroberfläche oxidiert wird. Wegen der Reversibilität der Redoxreaktion erhält man einen wiederverwendbaren Sensor. Dieses Konzept der

* BCIP: 5-Brom-3-Chlor-Indolylphosphat

Verwendung von Antikörper/Enzym-Komplexen zur Verbesserung der Empfindlichkeit des Sensors bezeichnen Ebersole und Ward als erweiterten Masse-Immuno-Sorptions Test (AMISA).

Aufbauend auf diesen grundlegenden Experimenten, die sich vor allem mit der Entwicklung der Meß- und Immobilisierungstechniken beschäftigt haben, wurden in den vergangenen Jahren spezielle Applikationen untersucht.

Arbeiten zum Nachweis von HIV (human immunodeficiency virus) Antikörpern wurden z.B. von **Köblinger** et al. [94] vorgestellt. Diese Arbeitsgruppe hat Proteine (BSA; anti-HIV Antikörper; HIV-Antigene und Enzym markierte Antikörper) direkt auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Nachteil der direkten Immobilisierung an Metalloberflächen sind große Standardabweichungen (um 20%). Dennoch konnten spezifische Wechselwirkungen zwischen anti-HIV Antikörpern und HIV-Antigenen (1000 Hz) im Vergleich zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen EBV (Epstein Barr Virus) Antikörpern und HIV-Antigenen (320 Hz) nachgewiesen werden. Interessant ist außerdem die Verwendung von 20 MHz Quarzen in Flüssigkeiten, wodurch eine höhere Sensitivität erreicht wird.

Pestizide sind wichtige Hilfsstoffe in der modernen Landwirtschaft. Andererseits tragen sie als Umweltgifte erheblich zur Kontamination unserer Gewässer und Böden bei. Die Europäische Gemeinschaft hat 1980 im „European Drinking Water Act“ Normen für den Pestizidgehalt in Trinkwasser (Gesamtpestizidgehalt: 0,5 ng/ml; Atrazin: 0,1 ng/ml) festgelegt. Der Nachweis des Pestizids Atrazin (Abbildung

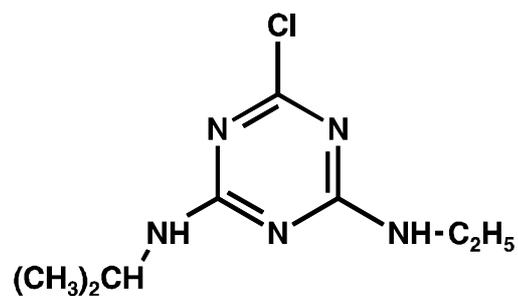


Abbildung 20: Atrazin, ein selektives systemisches Herbizid gegen Unkräuter

20) war Gegenstand einer Veröffentlichung von **Guilbault** et al. [95]. Zur Immobilisierung von Immunoglobulinen wurde die ProteinA-Gold Methode verwendet. Querempfindlichkeiten im Vergleich zu anderen Pestiziden, Detergenzien und Salzen zeigten eine hohe Selektivität der Sensoranordnung. Atrazin konnte reproduzierbar in einem Konzentrationsbereich von 0,03 bis 100 ng/ml nachgewiesen werden. Um den Nachweis von Atrazin zu verbessern, wurde von **Yokoyama** et al. [96] eine kompetitive Immunreaktion mit markierten Antigenen entwickelt. Mit der von ihnen angewandten Methode konnte Atrazin bis zu einer Konzentration von 0,001 ng/ml detektiert werden, wobei eine lineare Korrelation im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1 ng/ml festgestellt werden konnte. Die Messungen wurden offline durchgeführt, d.h. die Quarze wurden vor und nach der Immunreaktion getrocknet und an Luft vermessen.

An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, daß die Arbeiten von Guilbault et al. [95] und Yokoyama et al. [96] in der Literatur kritisch diskutiert wurden. **Skladal** et al. [97] kritisierten vor allem die angegebenen Nachweisgrenzen. Mit dem von ihnen verwendeten kompetitiven Atrazinnachweis konnten bis max. 0,1 ng/ml nachgewiesen werden. Skladal et al. gaben

Anregungen zur Verbesserung der Sensoranordnung. Eckpunkte dabei waren die Oszillatorschaltung, die Temperaturkontrolle, die Erhöhung der Sensitivität durch Verwendung von 15 oder 20 MHz Quarzen und die Optimierung der Immunreaktion (Salzkonzentration, pH-Wert, oberflächenaktive Substanzen). Von Skladal et al. [98] ist eine weitere Arbeit zum Nachweis des Pestizids 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) erschienen. Die Nachweisgrenze des von ihnen entwickelten Sensors wird mit 0,24 ng/ml (2,4-D in Trinkwasser) angegeben.

Daß die QMB-Technik auch zum Nachweis bestimmter Blutgruppen dienen kann, wurde von **Tessier** et al. [99] gezeigt. Tessier et al. immobilisierten anti-A Erythrocyten Antikörper auf „glutaraldehyd-aktivierten“ Quarzen. Die Messungen wurden in realen Blutproben durchgeführt, was besondere Anforderungen an die Meßtechnik wegen der Inhomogenität und der Viskosität des Mediums stellte [100]. Durch Einführung eines Qualitätsfaktor, der den Energieverlust der Schwingung durch die zusätzliche Dämpfung im viskosen Medium Rechnung trägt, war die Auswertung der Messungen möglich. Die Blutgruppen A und B konnten anhand der Frequenzänderungen bestimmt werden.

Wiederverwendbarer Immunosensoren (bis zu 10mal) zum Nachweis von Hepatitis-Viren (Typ A und B) entwickelten **König und Grätzel** [30]. Dazu wurden virusspezifische Antikörper mit Protein A auf Quarzoberflächen fixiert. Die Anzahl der nachweisbaren Virionen lag bei 10^5 , bei einer relativen Standardabweichung von 8%. Parallel zu den Untersuchungen wurden ELISA-Tests durchgeführt, um die Ergebnisse zu validieren.

Die sogenannten „Roten Gezeiten“ sind ein Umweltproblem, das weltweit die Meere verseucht und zu Fischsterben führt. Ursache sind das vermehrte Auftreten von kleinen Algen und von Phytoplankton. Besonders Länder, in denen Fisch ein wichtiger Proteinlieferant ist, erleiden ökonomische Probleme. Eine japanische Arbeitsgruppe (**Karube** et al. [101]) hat einen piezoelektrischen Immunosensor zum Nachweis von *Chattonella marina*, einer Geißelalge entwickelt, die als einer der Hauptverursacher diese Umweltphänomens gilt. Nach Karube et al. können Antikörper gegen *C. marina* auf dem Sensor (mit Protein A oder Polystyren) immobilisiert werden, um mit dieser Sensorkonfiguration direkt die Kontamination des Meerwassers zu untersuchen. Das System ermöglicht den Nachweis von 10^2 bis 10^4 Zellen/ml.

Eine der aktuellsten Arbeiten auf dem Gebiet der piezoelektrischen Immunosensoren beschäftigt sich mit dem Nachweis von *Chlamydia trachomatis*, einer Bakterienkultur, die durch sexuellen Kontakt übertragen wird und verschiedene Infektionen hervorruft (**Wilner** et al. [102]). *C. trachomatis* konnte im Urin im Konzentrationsbereich von 260 ng/ml bis 7,8 µg/ml nachgewiesen werden. Die Immobilisierung von *C. trachomatis* Antikörpern gelang durch Funktionalisierung der Sensoroberfläche mit Cystamin/Sulfo-SMPB* und anschließender Fixierung von entweder Immunglobulinen oder Fab-Fragmenten (Abbildung 21).

* SMPB-Succinylimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrat

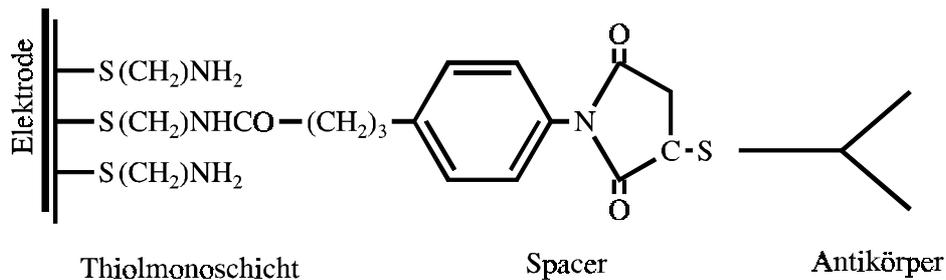


Abbildung 21: Fixierung von Antikörpern mit Cystamin / Sulfo-SMPB*

3.3.2 Adsorption, Immobilisierung und Hybridisierung von Nucleinsäuren

Mit Hilfe der DNS(Desoxyribonucleinsäure)-Diagnostik durch Hybridisierung ist heutzutage die Identifizierung biologischen Materials oder die Erkennung genetischer Erkrankungen möglich. Bei der herkömmlichen Methode zur Untersuchung von DNS-Sequenzen (Sequenzanalyse) werden zunächst unterschiedlich lange DNS-Bruchstücke von einem DNS-Abschnitt erzeugt. Man erhält Gemische aus radioaktiven Oligodeoxynucleotiden, die einen einheitlichen Kettenanfang aber in Abhängigkeit von der Spezifität der Einzelreaktionen unterschiedliche Basen am Kettenende aufweisen. Diese Bruchstücke werden elektrophoretisch getrennt, wobei ein Muster entsteht, das den Rückschluss auf die ursprüngliche Nucleotid-Sequenz gestattet. Weil diese Methode der DNS-Sequenzierung sehr aufwendig ist, liegt es nahe, neue Methoden zu entwickeln, um die spezifische Zusammensetzung von Nucleinsäuren zu ermitteln. Die QMB-Technik könnte dazu ein geeignetes Instrument sein.

Erste Versuche zur Untersuchung der Hybridisierung von Nucleinsäuren mit resonanten Sensoren wurden bereits 1988 von **Fawcett** et al. [103] unternommen. Polynucleinsäuren wurden im Air-Brush-Verfahren auf 9 MHz Schwingquarze aufgebracht und deren Wechselwirkung mit komplementären Nucleinsäuren untersucht.

Durch Beschichtung von Goldelektroden mit SH-modifizierten Desoxynucleotiden (enthalten Thiolgruppen an einem Strangende) war es **Okahata** et al. [104] möglich, einen - gegenüber Bakteriophagen mit der entsprechenden Sequenz - sensitiven Sensor zu entwickeln. Der Sensor erreichte eine Sättigung bei einer Konzentration von 60 ng/ml (560 Hz). Die Interkalation von Homidiumbromid in DNS wurde ebenfalls von Okahata et al. [105] an Schwingquarzen verfolgt und quantitativ ausgewertet. Interkalation bedeutet das Einschieben von Molekülen (Farbstoffe oder Antibiotika) in die Doppelhelix von DNS, wodurch die Replikation und die Duplikation behindert werden. Homidiumbromid blockiert die Synthese von RNS (Ribonucleinsäure) und wirkt mutagen. Die Wechselwirkung eines wasserunlöslichen DNS-Lipidkomplexes mit Homidiumbromid wurde verfolgt und mit einem inaktiven Polyglutamat-Lipidfilm verglichen. Okahata et al. ermittelten die Bindungskonstanten und fanden gute Korrelationen mit Inkubationsexperimenten an Mikroorganismen (*Salmonella typhimurium*). Weitere Untersuchungen wurden von Okahata et al. [106] durchgeführt, um die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und immobilisierten

DNS-Sequenzen zu untersuchen. Solche Protein-DNS-Komplexe sind bei der Transkription (Biosynthese der RNA) von Bedeutung, können aber aufgrund ihrer Komplexität mit herkömmlichen spektroskopischen Methoden nicht charakterisiert werden. Von Okahata et al. wurde anhand der Bindung eines bekannten sequenzspezifischen Proteins die Möglichkeit gezeigt, massensensitive Sensoren für derartige Untersuchungen zu verwenden. Weitere Methoden zur Immobilisierung von DNS zeigten Okahata et al. unlängst. Um monomolekulare Beschichtungen herzustellen, wurden DNS-Stränge mit Thiol- und Biotinendgruppen verwendet. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich hochgeordnete DNS-Stränge immobilisieren. Außerdem wurden Multischichten durch alternierende Beschichtungen von biotinylierten DNS-Strängen und Polystyrensulfonat hergestellt. Durch die Verwendung dieser Multischichten wurde die Sensitivität des Sensors erhöht.

Da man bei der herkömmlichen QMB-Technik nur Resonanzfrequenzen verfolgt, kann nicht zwischen Masse- und Viskositätsänderungen unterschieden werden. Deshalb verwendeten **Oyama** et al. [107] Impedanz-Analyzer für Untersuchungen zur Adsorption und Hybridisierung von DNS. Die Elektrodenoberflächen wurden mit GPTMS (3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan) silanisiert und anschließend hydrolysiert. Über Nacht reagieren die freien OH-Gruppen mit einer DNS enthaltenden Lösung im Sinne einer Veresterung. Die Autoren konnten sowohl diesen Immobilisierungsprozeß als auch die anschließende Aufspaltung der DNS-Doppelstränge durch thermische Behandlung anhand der Frequenzänderungen nachvollziehen. Von Oyama et al. wurde außerdem ein DNS-Sensor auf der Basis der QMB- oder SAW-Technik patentiert [108].

Von **Thompson** et al. [109] wurden einzelne ^{32}P -markierte DNS-Stränge auf Quarzresonatoren immobilisiert. Die Massenlagerung von Nucleinsäuren an diese Substrate wurde sowohl mit Hilfe der QMB-Technik als auch mit Scintillationszählern überprüft. Daß mit Hilfe eines solchen DNS-modifizierten Sensors auch Arzneistoffe detektiert werden können, zeigten Thompson et al. [110] am Beispiel des Nachweises von cis-Diamindichlorplatin (cis-Platin). Es ist bekannt, daß die antitumorale Wirkung dieser Platinkomplexe auf einer kovalenten Bindung an Nucleotidbasen beruht. Andererseits war nicht bekannt, warum trans-Platin keine therapeutische Wirkung besitzt. Mit Hilfe der QMB-Technik konnten Thompson et al. zeigen, daß diese Reaktionen einen unterschiedlichen kinetischen Verlauf haben und daß das die Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit der Substanzen sein könnte. Die Nachweisgrenze für cis-Platin betrug bei dieser Methode 10^{-7}M . Untersuchungen zur Kinetik der Hybridisierung von RNA an immobilisierten DNS-Strängen wurden ebenfalls von Thompson et al. [111] durchgeführt. Außerdem wurden die Einflüsse von Temperatur, Pufferlösung und blockierenden Substanzen beschrieben.

Weitere Untersuchungen, vor allem hinsichtlich der experimentellen Voraussetzungen für erfolgreiche DNS-Hybridisierungen auf Sensoroberflächen, wurden von **Hashimoto** et al. [112] beschrieben. Hier wurde der Einfluß des pH-Wertes des Mediums auf die Immobilisierung, die Effizienz der Hybridisierung in Abhängigkeit von der sterischen Abschirmung der Basensequenzen und die Spezifität der Reaktion getestet.

3.3.3 Kinetik enzymatischer Reaktionen

Der klassische QMB-Enzymsensor von Guilbault et al. [86] zum Nachweis von Formaldehyd war eines der ersten Anwendungsbeispiele der QMB-Technik überhaupt. Die Anwendung der Technik in flüssigen Systemen gestattet heute, Reaktionsabläufe in Realzeit zu verfolgen und Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen zu beobachten.

Im Jahre 1991 wurde von Ward et al. [113] ein Verfahren zum Nachweis von Analyten in flüssigen Systemen mit Hilfe von Enzym-Substrat-Komplexen patentiert. Das Verfahren nutzt die Wechselwirkung eines an der Oberfläche des Sensors fixierten Analyten mit einem Enzym bzw. Enzym-Substrat-Komplex. Das bei der Reaktion entstehende Produkt liefert ein analytisches Signal (Abbildung 22).

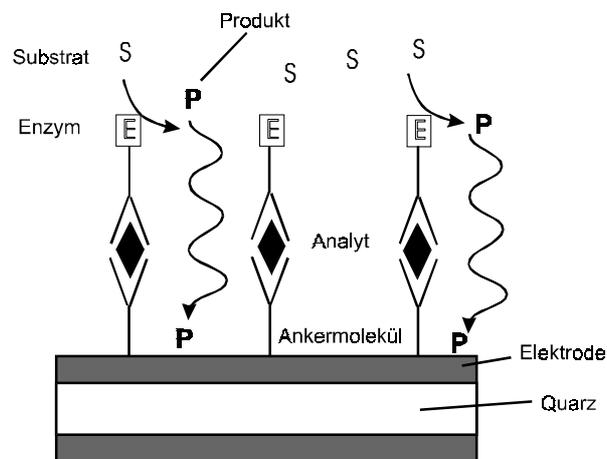


Abbildung 22: Prinzip der Signalverstärkung durch enzymatische Reaktion der Analyte nach Ward [113] (E-Enzym; S-Substrat; P-Produkt)

Das von Ward et al. entwickelte Verfahren ist vor allem dann geeignet, wenn Analyten mit einer geringen Molmasse detektiert werden sollen. Aufgrund der größeren Molmasse der Produkte kommt es zur Verstärkung der Signale.

Die Ankopplung von Enzymen an Phospholipide und deren anschließende Spaltung in Lysolipide und freie Fettsäuren konnte von Okahata et al. [114] beobachtet werden. Dazu wurden mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik acht Phospholipid-Monoschichten (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin) auf einen Schwingquarz übertragen. Diese Multischichten reagieren zunächst mit Phospholipase A₂ unter Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Innerhalb von ca. 2 Stunden kommt es jedoch zur Hydrolyse und damit zum Ablösen des Phospholipidfilms. Okahata et al. stellten fest, daß die Geschwindigkeit der Hydrolyse temperaturabhängig ist. Das Maximum der Hydrolysegeschwindigkeit erreicht man in der Nähe der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide.

QMB-Sensoren zum Nachweis von Glucosekonzentrationen wurden u.a. von Lasky et al. [115] entwickelt. Durch Kopplung elektrochemischer, ellipsometrischer und massensensitiver

Analysenmethoden auf einem einzigen Sensor konnten **Rishpon** et al. [116] Informationen zu fundamentalen Eigenschaften (Masse, Dichte, Dicke,...) enzymhaltiger Filme finden.

Die Immobilisierung von Enzymen durch Proteinfusion (Calmodulin^{*}) an Glutathion[†]-beschichteten Substraten wurde unlängst von **Damrongchai** et al. [117] demonstriert. Die Anlagerung der Proteine konnte durch Versuche mit Enzym-Immunoassays validiert werden. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen Prozeß der durch kompetitive Wechselwirkungen mit Glutathion umkehrbar (Desorption) ist.

3.3.4 Adhäsion und Wachstum von Biofilmen

Bereits 1985 haben Gordon und Kanazawa [65] den Einfluß von Viskosität und Dichte des Mediums auf das Schwingverhalten von Quarzresonatoren empirisch ermittelt. Diese Faktoren wirken in vielen QMB-Untersuchungen als Störgrößen und müssen demzufolge eliminiert werden. Mittlerweile gibt es aber auch eine ganze Reihe von Autoren, die die Änderungen der Viskosität als sensorisches Prinzip nutzen und damit z.B. das Wachstum von Mikroorganismen oder die Blutgerinnung verfolgen können.

Muramatsu et al. [118] verwendeten ein aus 16 Schwingquarzen bestehendes Assay zum Nachweis der Blutgerinnungsfaktoren VIII und IX, deren Fehlen für das Auftreten der Hämophilie (Bluterkrankheit) verantwortlich ist. Beim Auftragen eines Eiweißfilms, der eine definierte Konzentration an Blutgerinnungsfaktoren enthält, gerinnt das Plasma. Dieser Gerinnungsvorgang führt zu Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften des Films, die sich in einem sigmoidalen Kurvenverlauf im

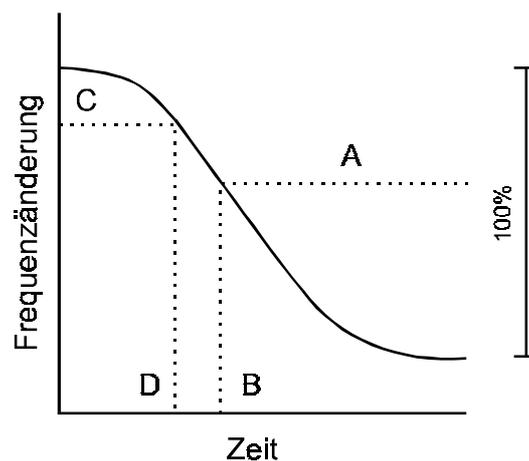


Abbildung 23: Resonanzverlauf bei Gerinnung eines Plasmafilms auf Schwingquarzen; A-Gerinnungsfrequenz, B-Gerinnungszeit, C-Schwellenfrequenz, D-Schwellenzeit

Frequenz/Zeit Diagramm widerspiegeln (Abbildung 23). Zur Auswertung wurden von Muramatsu et al. die Gerinnungszeit (ratio coagulation time) B und der Schwellenwert (threshold coagulation time) D verwendet. Die Methode bietet eine gute Handhabe zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren und stellt eine Alternative zu herkömmlichen Lichtstreuexperimenten dar.

Anhand der Viskositätsänderung von Nährböden konnten **We**i et al. das Wachstum von Mikroorganismen (*Staphylococcus epidermis* [119] und *Proteus vulgaris* [120]) detektieren. Sie stellten fest, daß Gelatinefilme nach ca. 1 Stunde unter den gewählten

^{*} Calmodulin – Protein mit vier Bindungsstellen für Calciumionen, reguliert Aktivitäten verschiedener Proteine

[†] Glutathion – Tripeptid aus Muskeln und Hefezellen isoliert, Puffersystem für Redox-Zustand der Zelle

Versuchsbedingungen ihre Filmeigenschaften drastisch ändern. Diese Änderung der Viskoelastizität ist in den Frequenz-Zeit-Kurven anhand einer deutlichen Frequenzverschiebung zu erkennen. Bei Zugabe von Mikroorganismen verschiebt sich der Frequenzsprung proportional zur Konzentration der Mikroorganismen. Diese zeitliche Verschiebung wurde von Wei et al. als analytisches Signal verwendet. Mit dieser Methode können Mikroorganismen in Konzentrationen von 10^2 bis 10^7 Zellen/ml nachgewiesen werden. Vom gleichen Fachbereich der Universität Hunan (China) wurden Arbeiten zum Nachweis von *Escherichia coli* veröffentlicht. Yao et al. [121] wiesen Viskositätsänderungen von *E. coli* behandelten Nährböden durch Verschiebung der Resonanzfrequenz und anhand der Impedanzspektren nach. Die Frequenzverschiebungen korrelierten mit der Anzahl der Bakterien im Bereich von 10^2 bis 10^6 Zellen/ml ($r = 0,985$). Eine ebenfalls von Yao et al. vorgeschlagene Methode [122] beruht auf dem Fakt, daß beim Wachstum von Bakterien ungeladene in geladene Substrate transformiert werden. Diese veränderten Substrate erzeugen eine Änderung der Impedanz des Mediums. Damit gelang der Nachweis des Wachstums von *Salmonella typhimurium* schon in einem Zeitraum von max 5,5 Stunden. Diese Methode ist damit wesentlich schneller als bislang angewendete Verfahren.

3.3.5 Rezeptorwechselwirkungen auf Quarzresonatoren

Die Verwendung geordneter Bilayer-Matrices wurden in dieser Arbeit bereits erwähnt. Besonders die Arbeitsgruppe von Okahata et al. nutzte zweidimensional geordnete Lipdmatrices ohne Proteine als sensitive Schichtmaterialien und zeigte in ihren Studien die vielseitige Anwendbarkeit dieser

Art der Beschichtungen. Die verwendeten synthetischen Multibilayer werden als polyionischer Komplex aus Dioctadecyldimethylammoniumbromid ($(2C_{18}N2C_1)^+$ und Natriumpolystyrensulfonat (PSS)⁻ gebildet (Abbildung 24). Mit Hilfe dieser Filme wurden beispielsweise Bitterstoffe

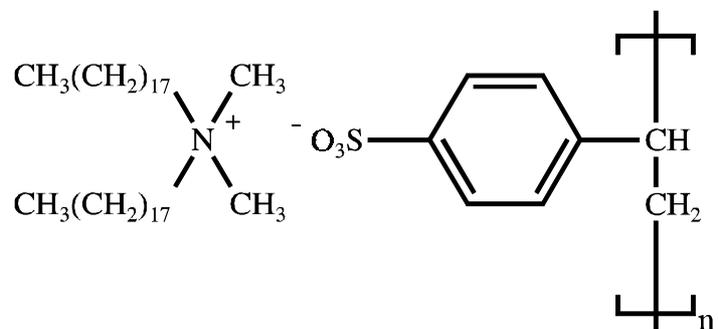


Abbildung 24: Dioctadecyldimethylammoniumbromid und Natriumpolystyrensulfonat bilden Multibilayer

nachgewiesen und deren Verteilungskoeffizienten in Wasser bestimmt [123]. Durch Austausch von $(2C_{18}N2C_1)^+$ gegen andere Ammoniumsalze (perfluorierte und fluoreszenzmarkierte) oder Cholesterol wurde die selektive Adsorption und Penetration hydrophober Alkohole untersucht [124]. Weitere Arbeiten befassen sich mit der spezifischen Adsorption von Lokalanästhetika [125] und mit der Adsorption von Tensiden [126]. Neben diesen Untersuchungen an Multischichten wurden auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Phospholipidmonoschichten an der Wasser-Luft Grenzfläche (einer Langmuir-

Blodgett Filmwaage) von Okahata et al. untersucht [127]. Adsorptionen von Lektinen an mit Glykolipiden versetzten Langmuir-Filmen konnten nachgewiesen werden [128].

Die starke Wechselwirkung von Biotin und Avidin bzw. Streptavidin (Dissoziationskonstante 10^{-15} M) wird in der Affinitätschromatographie, in Immunoassays und auch bei der Entwicklung spezifischer Sensorbeschichtungen auf Schwingquarzen ausgenutzt. Daß Avidin und Streptavidin stabile Monoschichten auf Metallfilmen ausbilden, haben **Ward** et al. [129] experimentell nachgewiesen. Diese Möglichkeit der Immobilisierung von Avidin ermöglicht die Entwicklung einer neuen Sensorkonfiguration, z.B. für Immunotests und für den Nachweis von Nucleinsäuren, wobei das Avidin als Akzeptor für biotinylierte Agenzien eingesetzt wird. **Ringsdorf** et al. [130] ergänzten dieses Konzept, indem sie das Avidin (bzw. Streptavidin) an Spacer aus biotinylierten Lipidfilmen gekoppelt haben (Abbildung 25). Mit Hilfe dieser Sensorkonfiguration waren Fab-Fragmente (von monoklonalen Antikörpern) nachweisbar.

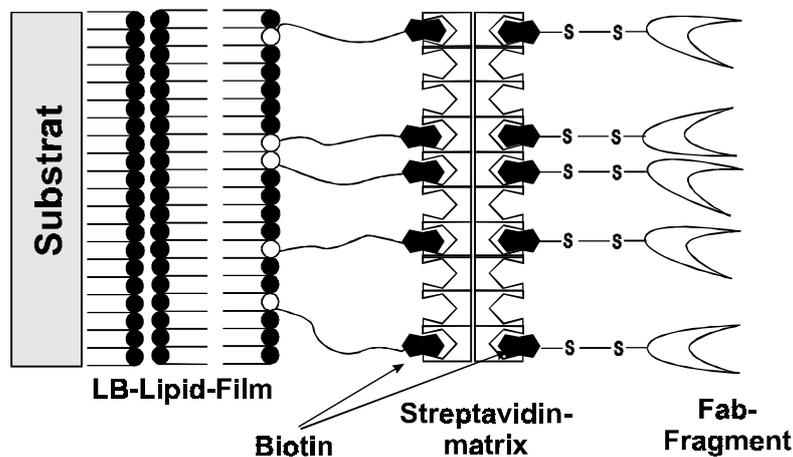


Abbildung 25: Sensorkonfiguration nach Ringsdorf et al. [130], wobei biotinylierte LB-Filme mit Streptavidin gekoppelt werden, an diese Matrix binden biotinylierte Antikörper (bzw. Fab-Fragmente)

Die Verwendung von Cholestyramin, einem Pharmakon, das zur Entfernung von Cholesterol eingesetzt wird als Beschichtung, und die Verfolgung der Wechselwirkung mit Gallensäuren wurde von **Purdy** et al. [131] demonstriert. Der verwendete Sensor ist bis zu 400mal regenerierbar und damit ausgezeichnet geeignet zur Anwendung in klinischen Tests. Die Nachweisgrenzen für Gallensäuren liegen in Wasser bei 0,2 bis 9 nmol und damit deutlich unter den physiologischen Werten. Purdy et al. haben festgestellt, daß bei Anwesenheit von Zitraten die Bindung der Gallensalze um ca. 40% reduziert wird. Sie schlagen deshalb vor, bei Applikation von Cholestyramin-enthaltenden Arzneistoffen auf die Einnahme von Zitronensäure zu verzichten.

Ein weiteres Beispiel zur Anwendung von Quarzresonatoren in klinischen Untersuchungen wurde von Yeh et al. [132] vorgestellt. Sie untersuchten spezifische Wechselwirkungen an Lipopolysacchariden (LPS). LPS, auch als Endotoxin bekannt, sind die Hauptkomponente der äußeren Membran der Zellwände gramnegativer Bakterien. Sie sind verantwortlich für eine

Reihe pathophysiologischer Effekte, die bis zu lebensgefährlichen Schockzuständen reichen. Für therapeutische Zwecke ist es wichtig, einen Arzneistoff zu finden, der spezifisch an LPS bindet und sie damit neutralisiert. Yeh et al. demonstrierten, daß die Verfolgung spezifischer Bindungsprozesse zwischen Proteinen und LPS mit Hilfe der QMB-Technik in Realzeit ein geeignetes Instrument ist, um diese Prozesse quantitativ und qualitativ auszuwerten.

3.4 Kommerzielle Anwendungen von QMB-Sensoren

Seit mehreren Jahren werden Gassensorsysteme, basierend auf der QMB-Technik, kommerziell angeboten (Geruchsmeßgerät OMD 1.10 [133], Gaslab 21 [134], Chemosensor-System QMB 6 [135]). Sie werden zur online Bestimmung von organischen Gaskomponenten und Aromen verwendet. Häufig werden Arrays von Sensoren genutzt, um die Daten mit den Methoden der Mustererkennung auszuwerten. Neben diesen „elektronischen Nasen“ gibt es bislang kaum kommerzielle Systeme, die in der Lage sind, die Adsorption von Analyten in Flüssigkeiten zu verfolgen. Angeboten wird derzeit ein System von Seiko EG&G, das durch Kopplung mit einem Potentiostaten sowohl die Auswertung von Masse- und Viskositätsänderungen ermöglicht als auch die Änderungen der elektrochemischen Aktivität registriert [136].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete QMB-Ausrüstung basiert auf den elektronischen Systemen (Oszillatorschaltungen, Auswertung, Software) des Gaslab21 [134] und wurde uns vom ifak e.V. Magdeburg zur Verfügung gestellt [137].

4 Modifizierung der Sensoroberflächen

Grundlage der Entwicklung spezifischer Sensoren ist die Erzeugung aktiver Grenzflächen, wobei es eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren gibt. Unterscheiden lassen sich prinzipiell Methoden, bei denen natürliche Erkennungsstrukturen (Antikörper, Enzyme, Polynukleinsäuren) immobilisiert werden und Methoden, bei denen man artifizielle Strukturen (Polymere, Lipide, Käfigverbindungen) als Beschichtungsmaterial verwendet. Erstere haben den Vorteil, daß die hohe Selektivität natürlicher Systeme zum Nachweis von Analyten ausgenutzt werden kann. Nachteilig ist aber generell ein hoher Aufwand bei der Immobilisierung dieser Makromoleküle. Synthetische Strukturen lassen sich häufig leichter an Sensoroberflächen fixieren. Diese Verbindungen sind aber im allgemeinen unspezifischer und damit zur selektiven Erkennung von Analyten nur bedingt geeignet.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst aus der Literatur bekannte Verfahren zur Immobilisierung von Proteinen vorgestellt und ab Punkt 4.2 die in dieser Arbeit angewandten Beschichtungstechniken diskutiert. Dabei haben wir uns auf Verfahren konzentriert mit deren Hilfe biologische Strukturen imitiert werden konnten (z.B. Beschichtungen mit Thioalkoholen im Self-Assembling (SA) Verfahren und die Übertragung von Langmuir-Blodgett (LB) Filmen). Angewandt wurden aber auch einfachere Verfahren, wie die Auftropfmethode und die Air-Brush Technik.

4.1 Verfahren zur Immobilisierung von Proteinen

Bei einer Vielzahl von Applikationen der QMB-Technik (immunologische oder enzymatische Untersuchungen) ist es notwendig, Proteine an der Elektrodenoberfläche zu fixieren. Dabei verwendet man Immobilisierungsmethoden, die bereits von herkömmlichen Immunoassays (ELISA, RIA) bekannt sind. Unter Ausnutzung selektiver Wechselwirkungen natürlicher Makromoleküle können Verbesserungen der Sensoreigenschaften, hinsichtlich Selektivität und Sensitivität, gegenüber anderen Beschichtungen (Polymere, Käfigverbindungen etc.) erzielt werden. Wegen der Bedeutung dieser Verfahren werden im folgenden Abschnitt einige dieser Methoden skizziert und Beispiele der Anwendung der QMB-Technik aus der Literatur aufgeführt.

4.1.1 Silanisierung der Sensoroberflächen

Die Aktivierung von Substraten mit Alkoxysilanen kann prinzipiell an jeder oxidierten Oberfläche (Glas, Metall) erfolgen. Bei diesen Verfahren verwendet man häufig Aminosilane, um an der freien Aminogruppe über bifunktionelle Agenzien (z.B. Dialdehyde) Proteine zu immobilisieren. In Abbildung 26 ist das Schema einer Immobilisierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Glutardialdehyd abgebildet [138].

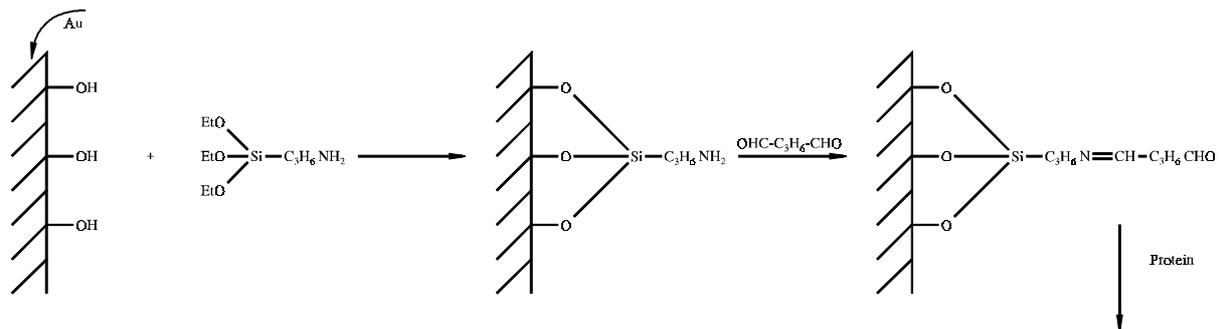


Abbildung 26: Aktivierung oxidierter Metalloberflächen mit APTES und Glutaraldehyd

Neben APTES wird Glycidoxypropyltrimethoxysilan ebenfalls zur Silanisierung von Sensoroberflächen angewendet [139; 140].

4.1.2 Protein A-Gold Methode

Protein A ist ein Zellwandprotein, das z.B. bei der Affinitätschromatographie zur Reinigung und Separierung von Immunglobulinen (Protein A-Sepharose Säulen) eingesetzt wird [141]. Es geht mit Antikörpern spezifische Wechselwirkungen ein, ohne Einfluß auf deren Antigenbindungsvermögen zu nehmen. In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um das Bindungspotential von Protein A für massensensitive Untersuchungen zu nutzen. Einerseits wird Protein A („klassisch“) mit APTES immobilisiert [142], um Immunglobuline nachzuweisen. Andererseits ist es möglich, Protein A direkt auf Goldelektroden zu adsorbieren. Aufgrund starker van der Waals-Wechselwirkungen (Assoziationskonstante $1,5 \cdot 10^8/\text{M}$ [143]) eignen sich Protein A – Gold-Komplexe ideal als Sensormaterial. Davis und Leary [144, 30] nutzten dieses System, um anhand des Frequenzverlaufs kontinuierlich Protein A – Antikörper Wechselwirkungen (hinsichtlich Quantität und Kinetik der Reaktion) nachzuweisen.

4.1.3 Immobilisierung von Proteinen mit Succinimiden

Der Einsatz von Succinimid als Kopplungsreagenz wurde von Okahata et.al [145] beschrieben. Dazu wird zunächst die Goldoberfläche mit Dithiolen funktionalisiert und anschließend mit N-Hydroxysuccinimid, in Anwesenheit wasserlöslicher Carbodiimide (EDC*) umgesetzt (Abbildung 27). An den modifizierten Sensoroberflächen wurden Avidin und biotinylierte DNA immobilisiert, um den Sensor zur Detektion von Nukleinsäuren einzusetzen.

* EDC – N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid

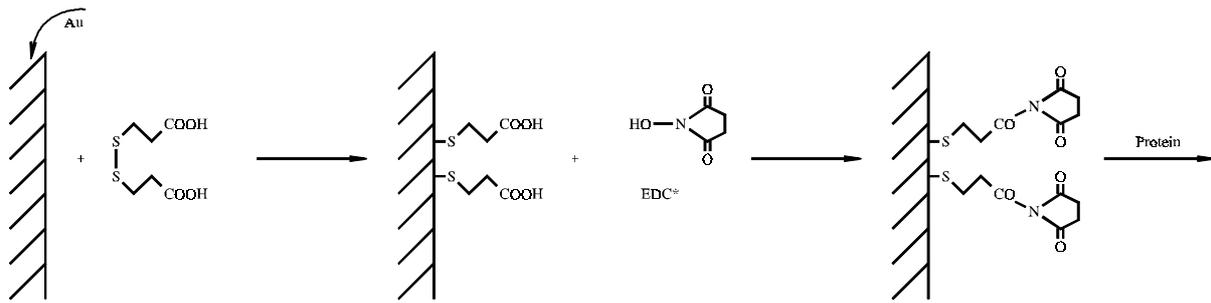


Abbildung 27: Immobilisierung von Proteinen mit Hilfe von N-Hydroxysuccinimid nach Okahata et.al, 1997

*EDC – N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid

Analog zu den von Okahata vorgestellten Arbeiten verwendeten Willner et.al [146] sulfoniertes Succinimid als Kopplungsreagenz zur Fixierung von Proteinen. In diesem Fall wurden die modifizierten Sensoren zum Nachweis von Bakterien (*Chlamydia trachomatis*) eingesetzt.

4.1.4 Polymere zur Immobilisierung von Proteinen

Neben den beschriebenen Methoden zur kovalenten und koordinativen Fixierung von Makromolekülen besteht die Möglichkeit, Proteine an Polymerschichten zu immobilisieren. So wurden Atrazinbiosensoren [147] auf QMB-Basis entwickelt, die mit Polyethylenimin beschichtet und mit Glutaraldehyd vernetzt sind (Abbildung 28).

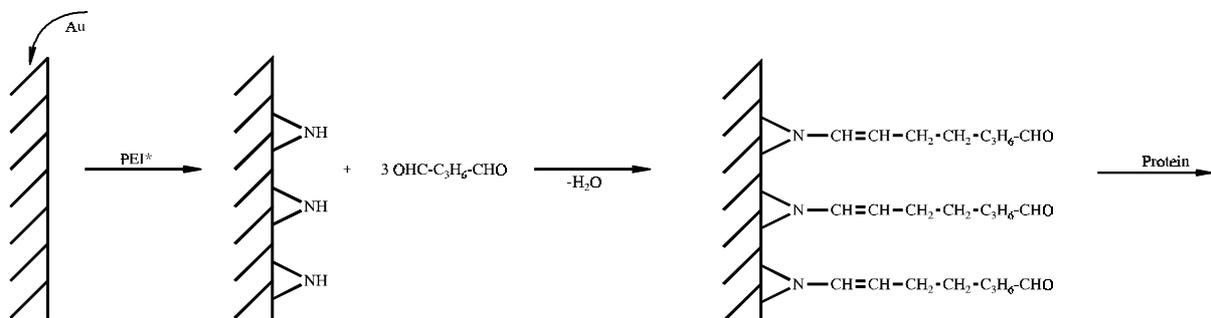


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Beschichtung von Substraten mit PEI* und deren anschließende Umsetzung mit Glutaraldehyd

*PEI - Polyethylenimin

Neben Polyethylenimin wurde auch Polystyren (PS) als Sensormaterial eingesetzt. So wurden von Yokoyama et.al [148] Quarze mit PS im „spin-coating“-Verfahren beschichtet und anschließend mit anti-Atrazin Antikörpern versetzt. Daß mit PS beschichtete Substrate auch zur Quantifizierung von Bakterienkulturen angewandt werden können, wurde von Nakanishi et. al [149] nachgewiesen.

4.2 Einfache experimentelle Beschichtungstechniken

Einfache Beschichtungstechniken, wie sie zum Beispiel aus der Gassensorik bekannt sind, sind ein geeignetes Instrument, um schnell verfügbar dünne Filme auf feste Oberflächen zu übertragen. Diese Schichten sind zum Teil sehr gut reproduzierbar und geeignet, um spezifische Wechselwirkungen zwischen Schicht und Analyt (Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen, Bulk-Effekte, etc.) zu detektieren. Die Untersuchungen an derartigen Oberflächen sollten dazu dienen, Wechselwirkungen an Modellrezeptoren nachzuweisen. Es sollte u.a. festgestellt werden, inwieweit die Ergebnisse aus Untersuchungen in Gasen auch auf flüssige Medien anwendbar sind (Kapitel 5). In den folgenden Kapiteln werden die Methoden beschrieben mit denen diese Schichten erzeugt wurden. Außerdem wird die Struktur der Filme beschrieben.

4.2.1 Auftropfmethode

Die einfachste Methode zur Beschichtung von Sensoroberflächen ist die Auftropfmethode. Dabei wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze eine definierte Menge Substanz aufgetragen. Die Substanz ist normalerweise in leichtflüchtigen Lösungsmitteln gelöst, so daß der Abdampfprozeß an Luft und bei Raumtemperatur zügig verläuft.

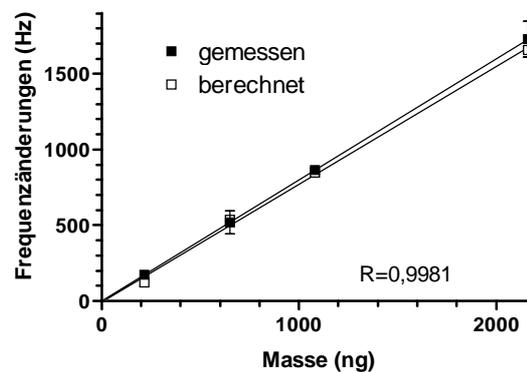


Abbildung 29: Frequenzänderungen in Abhängigkeit von der Masse der aufgetropften Substanz (D,L- α -Tocopherol) und Vergleich mit der nach Sauerbrey berechneten theoretischen Frequenzänderung

In Abbildung 29 sind Frequenzänderungen bei der Beschichtung eines 10 MHz Schwingquarzes mit D,L- α -Tocopherol dargestellt. Im Bereich von 250 bis 2500 ng ist die Änderung der Resonanzfrequenz proportional der Massenänderung und korreliert mit den nach Sauerbrey [63] berechneten Werten ($R = 0,9981$).

Vorteil dieser Methode ist die einfache Verfahrensweise und die schnelle Verfügbarkeit geeigneter Schichten. Nachteilig ist allerdings eine hohe Inhomogenität der erzeugten Filme. Aus diesem Grund wurde die Anwendung der Auftropfmethode in der vorliegenden Arbeit weitgehend vermieden.

4.2.2 Air-Brush Verfahren

Das Aufsprühen von Schichtmaterialien aus leichtflüchtigen Lösungsmitteln ist eine weitere sehr einfache Art der Beschichtung. Verwendet werden dazu handelsübliche Air-Brush-Geräte, mit deren Hilfe sich eine statistisch gleichmäßige Verteilung erzielen lässt. Bild 1 dokumentiert dennoch die relativ uneinheitliche Beschichtung der Elektrodenoberfläche.

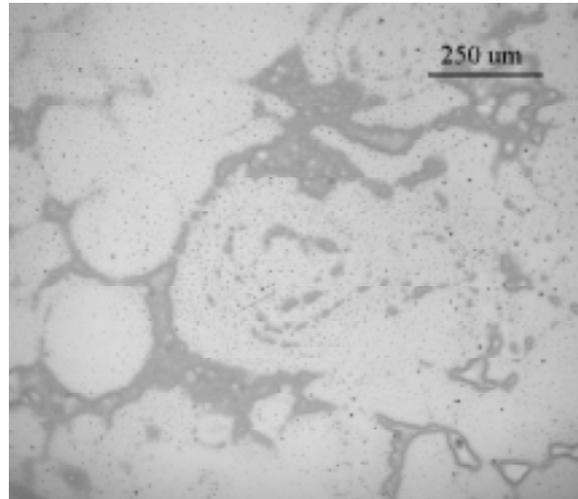


Bild 1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit Hilfe der Air-Brush-Technik beschichteten Quarzes

Deutlich unterscheidbar sind nicht beschichtete Areale (dunkel) und Stellen, die relativ homogene Filme (hell) aufweisen. Diese Technik ist besonders zum Erzeugen von Schichten für die Gasanalytik geeignet. Vorteil der Beschichtung durch Aufsprühen ist die Möglichkeit, definiert Massen bis zu 5000 Hz aufzutragen. Mit Hilfe der Quarzmikrobalance lässt sich die Massebeladung dokumentieren.

In Abbildung 30 ist der Frequenzverlauf während mehrerer Aufsprühvorgänge dargestellt. Demzufolge ist es möglich, Schichten mit je 40 ng (entspr. 50 Hz) wiederholt aufzutragen, um eine gewünschte Massenbeladung einzustellen.

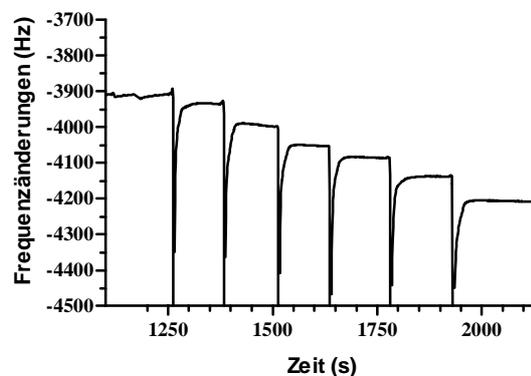


Abbildung 30: Frequenzänderungen beim Aufsprühen von D,L- α -Tocopherol auf einen Schwingquarz

4.2.3 Weitere Methoden

Einige weitere Methoden zur Schichtfixierung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht angewandt werden konnten, sollen an dieser Stelle lediglich erwähnt werden.

Durch **Aufschleudern** von Schichten („spin coating“) erhält man homogene Oberflächen. Bei diesem Verfahren wird das Schichtmaterial in die Mitte eines schnell rotierenden Substrats getropft. Aufgrund der Fliehkraft wird das Material abgeschleudert und ein homogener Film erzeugt. Aufwendig ist jedoch die Gestaltung der Fassung für Quarzkristalle in einer spin-coating-Apparatur. Metallische Adsorbermaterialien lassen sich durch **Aufdampfen** im Hochvakuum (homogene Schichten, die in der Regel weniger als 1 μm dick sind) oder durch **Kathodenzerstäubung** (Sputtern) auf Substrate übertragen. Bei diesem Verfahren wird in einem evakuierten Rezipienten eine Glimmentladung zwischen zwei Elektroden ausgelöst. Die positiven Atome des Restgases (Argon) treffen auf die Kathode (Schichtmaterial) und schlagen dort neutrale Atome aus dem Gitterverband. Diese energiereichen Atome lagern sich auf dem Substrat ab und bauen eine gleichmäßige und dünne Schicht auf. Gesputterte Schichten haften im allgemeinen besser als aufgedampfte Filme [150].

4.2.4 Diskussion

Mit einfachen Beschichtungstechniken lassen sich reproduzierbar Schichten auf feste Oberflächen übertragen. Als geeignet hat sich das Air-Brush-Verfahren erwiesen, weil damit relativ homogene Oberflächen mit einer definierten Massebeladung erzeugt werden konnten. Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sind diese Methoden generell jedoch nur eingeschränkt anwendbar. Weil diese Filme keine einheitliche molekulare Ordnung aufweisen, lassen sich Analytwechselwirkungen nur bedingt auf spezifische Bindungsereignisse zurückführen. In den weiteren Ausführungen (Kapitel 5) wird dargestellt, daß die in Gasen sehr erfolgreich angewandten Methoden nicht generell auf Flüssigkeiten übertragbar sind. Deshalb wurden in den weiteren Arbeiten Schichten mit hoher molekularer Ordnung verwendet, wie sie im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

4.3 Selbstorganisierende Schichten an Goldelektroden

4.3.1 Einleitung

Die Bildung orientierter Monoschichten an einer Grenzfläche durch spontane Adsorption von Molekülen aus Lösungen ist in der Literatur als Self-assembly (SA) Verfahren beschrieben. Unter Ausnutzung der starken Gold-Schwefel Wechselwirkungen ist es mit dieser Methode möglich, Thioalkohole an Goldoberflächen zu fixieren. Dabei entstehen hochgeordnete monomolekulare Filme, die als Sensormaterial eingesetzt werden.

Abbildung 31 zeigt die molekulare Bedeckung einer Au(111) Oberfläche mit Thioalkoholen. Der Gitterabstand der Goldatome beträgt 0,2885 nm. Bei der Ausbildung koordinativer

Bindungen der Schwefelatome zu je drei Goldatomen bildet sich eine Überstruktur mit einem S-S Gitterabstand von 0,4995 nm.

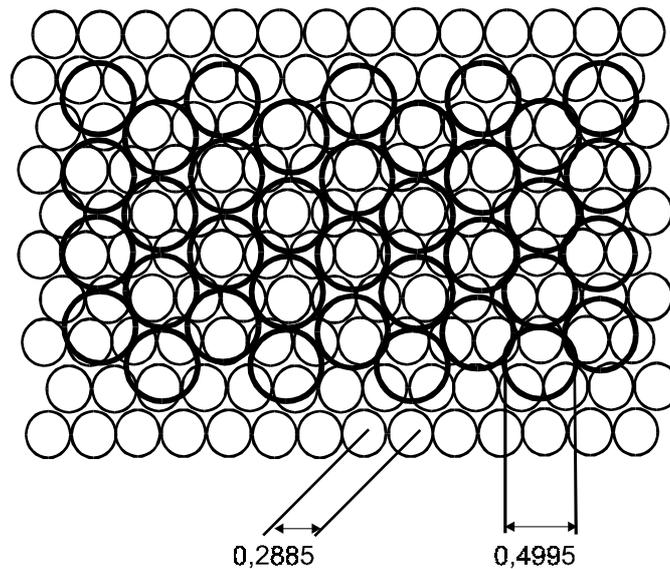


Abbildung 31: Darstellung der monomolekularen Bedeckung einer Au(111)-Oberfläche mit Schwefel nach [151]

4.3.2 Adsorption von Thioalkoholen an Goldelektroden

Die in den Untersuchungen verwendeten vorgefertigten Quarzscheiben sind vom Hersteller (Quarzkeramik GmbH Stockdorf, Deutschland) mit Goldelektroden bedampft worden. Die Oberflächenstruktur dieser Elektroden wurde mit Hilfe der Atomkraftmikroskopie untersucht. In Bild 2 ist die typische „Blumenkohlstruktur“ einer Goldoberfläche zu erkennen. Die Körner haben einen Durchmesser von ca. 100 nm bei einer mittleren Oberflächenrauigkeit von 5 nm.

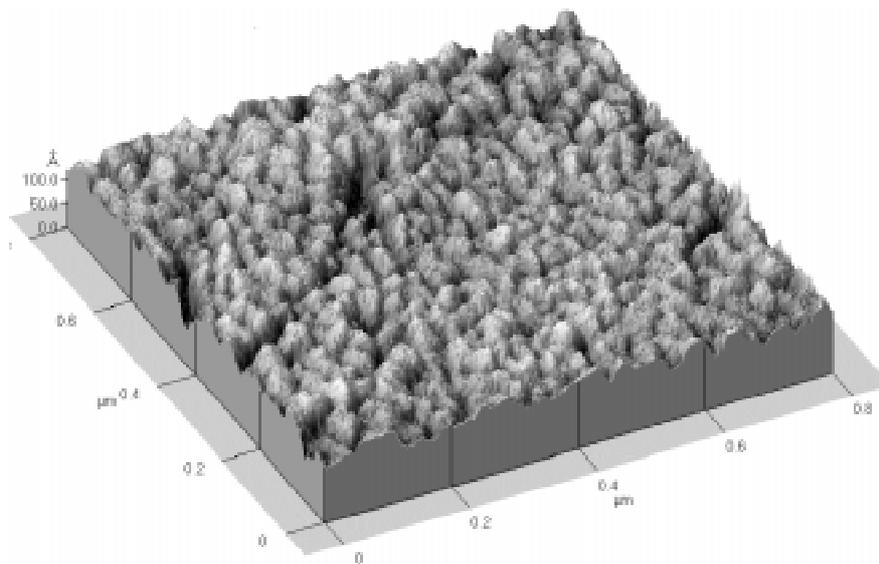


Bild 2: Darstellung der Oberflächenmorphologie der verwendeten Goldelektroden (AFM-Aufnahme; non-contact mode)

Das Adsorptionsverhalten verschiedener Thioalkohole aus wäßrigen und organischen Lösungen wurde mit Hilfe der QMB-Technik verfolgt. Bei diesen Untersuchungen wurden Unterschiede in der Geschwindigkeit des Schichtwachstums in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel ermittelt. So wurde festgestellt, daß bei der Adsorption von Hexadecanthiol aus Chloroform bereits nach 4 Stunden eine Sättigung eintritt. Bei der Adsorption aus ethanolischer Lösung hingegen wurde erst nach 12 Stunden eine Sättigung der Oberfläche beobachtet (Abbildung 32). Diese Versuche wurden schrittweise durchgeführt, d.h. nach jeweils 30 min wurde der Adsorptionsprozeß unterbrochen, der Quarz mit Chloroform gespült und unter Stickstoff getrocknet. Nach weiteren 10 min zur Stabilisierung der Resonanzfrequenz wurden die Werte registriert. Die hohen Standardabweichungen sind aus dieser Verfahrensweise zu erklären, die zu einer uneinheitlichen Adsorption führt.

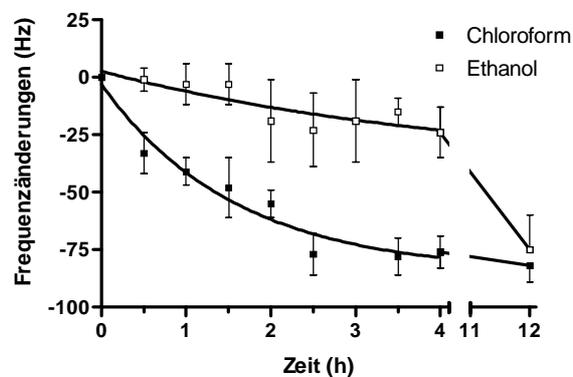


Abbildung 32: Frequenzverlauf bei Adsorption von Hexadecanthiol an Schwingquarzoberflächen (off-line)

Man erhält jedoch bei der Adsorption von Hexadecanthiol eine Sättigungsfrequenz (Δf) von ca. 80 Hz, die mit dem theoretisch nach Sauerbrey [63] ermittelten Wert (78 Hz) sehr gut korreliert und damit die Zulässigkeit des Verfahrens beweist.

Basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde ein einheitliches Beschichtungsverfahren in allen folgenden Experimenten angewandt. Die Reaktionen wurden in 1mM Lösung, in Chloroform bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Reaktionszeit von 4 Stunden genügt zum Erreichen der maximalen Oberflächenbedeckung. Versuche über einen längeren Zeitraum (mit Chloroform) führten zu keiner zusätzlichen Frequenzänderung und damit nicht zum weiteren Massezuwachs.

In der folgenden Tabelle sind die Frequenzänderungen von Schwingquarzen bei Adsorption von Alkanthiolen an die Goldelektrode dargestellt. Unter der theoretischen Voraussetzung einer maximalen Packungsdichte, wie in Abbildung 31 dargestellt, lassen sich anhand der molaren Masse Frequenzänderungen vorhersagen. Für die Berechnung der theoretischen Frequenzänderungen der Thiolipide I-IV wurde ein Platzbedarf von $0,43 \text{ nm}^2$ (ermittelt aus LB-Untersuchungen von DSPC (Abbildung 37) zugrunde gelegt.

Tabelle 3: Vergleich der theoretischen (nach [63]) und der gemessenen Frequenzänderungen bei der Massebeladung von Schwingquarzen mit verschiedenen Alkanthiolen

Verbindung	Summenformel	M (g/mol)	$\Delta F_{\text{gemessen}}$ (Hz)	$\Delta F_{\text{theor.}}$ (Hz)
Liponsäure	$C_8H_{14}O_2S_2$	206,32	121 ± 28 (n = 5)	68
Mercaptobernsteinsäure	$C_4H_6O_4S$	150,14	100 ± 38 (n = 5)	50
Thioglykolsäure	$C_2H_4O_2S$	92,11	35 ± 21 (n = 5)	30
2-Mercaptoethanol	C_2H_6OS	78,13	30 ± 14 (n = 5)	26
Thiouracil	$C_4H_4N_2OS$	128,15	205 ± 45 (n = 5)	42
11-Mercaptoundecan-1-ol	$C_{11}H_{24}OS$	204,37	74 ± 22 (n = 5)	67
1-Hexadecanthiol	$C_{16}H_{34}S$	242,43	80 ± 7 (n = 10)	78
Thiolipid (I)	$C_{20}H_{38}O_8PS$	652,84	59*	115
Thiolipid (II)	$C_{21}H_{38}O_8PS$	680,89	61*	120
Thiolipid (III)	$C_{22}H_{42}O_8PS$	708,94	55*	124
Thiolipid(IV)	$C_{24}H_{46}O_8PS$	765,05	53*	134

* Durchschnittswerte aus je drei Messungen

4.3.3 Randwinkeluntersuchungen

Die sorbierten Moleküle bilden monomolekulare Filme und verändern dadurch die Grenzflächeneigenschaften der Substrate. Bei Kontakt einer Flüssigkeit mit dem beschichteten Substrat bildet sich, wie in Abbildung 33 dargestellt, ein Flüssigkeitstropfen entsprechend der Benetzbarkeit (bzw. der Hydrophobizität bei Benetzung mit Wasser) der Oberfläche aus. Der Winkel θ (Randwinkel) wird als Maß für die Benetzbarkeit der Grenzfläche verwendet. Um qualitative Aussagen über die Benetzung von Substratoberflächen treffen zu können, wurden Randwinkel an mit Alkanthiolen beschichteten Goldsubstraten gemessen.

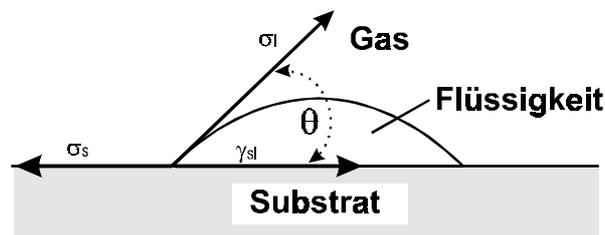


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Ausbildung eines Miniskus beim Benetzen einer Festkörperoberfläche mit Flüssigkeit (θ Randwinkel; σ_l Flüssigkeitsoberflächenspannung, σ_s Feststoffoberflächenspannungen; γ_{sl} Grenzflächenspannung)

Auf einer idealen, hochenergetischen Oberfläche (Metall-, Oxid- oder Glasoberflächen) sollten sich Randwinkel von Null Grad bilden, d.h. es tritt „vollständige Benetzung“ der Oberflächen auf. Im Kontrast dazu spricht man von „Nichtbenetzung“, wenn der Randwinkel

$\theta > 90^\circ$ ist. Extrem hohe Randwinkel erhält man beispielsweise bei der Benetzung von Quecksilber auf Teflon (150°) aber auch beim Kontakt von Wasser mit Teflon (108°) oder Paraffinen ($105-110^\circ$) [43].

Die Randwinkel lassen sich bei bekannter Oberflächenspannung (reines Wasser: $72,75 \text{ mN/m}$, bei 20°C) aus den empirisch zu ermittelnden Grenzflächenspannungen nach der YOUNG'schen Gleichung (4.1) errechnen:

$$\gamma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l * \cos(\theta_{ADV}) \quad 4.1$$

Dabei sind σ_s und σ_l Oberflächenspannungen und γ_{sl} die Grenzflächenspannung (Feststoff/Flüssigkeit). Der Winkel θ ist der Randwinkel. Die Ermittlung der Randwinkel erfolgt nahezu weglos mit einem nach der Ausschlagmethode arbeitenden induktiven Kraftnehmer [152]. Bei diesem dynamischen Randwinkelmeßverfahren werden zwei Randwinkel gemessen. Zum einen erhält man den bei Vergrößerung der Kontaktfläche (Eintauchen der Probe in eine Flüssigkeit) bestimmbaren Fortschreitrandwinkel (θ_{ADV}) und zum anderen wird der bei Verkleinerung der Oberfläche (Herausziehen der Probe) entstehende Rückzugsrandwinkel (θ_{REC}) ermittelt. Die Differenz ($\theta_{ADV}-\theta_{REC}$) wird als Randwinkelhysterese bezeichnet. Der Fortschreitrandwinkel wird im wesentlichen durch die Polarität der äußeren, funktionalisierten Oberfläche beeinflusst, während der Rückzugsrandwinkel durch die Morphologie der Oberflächen verändert wird [151].

Da die beim Ein- und Austauchen aufzuwendende Zugkraft nur von der Geometrie des Trägers und dem Randwinkel abhängig ist, kann aus der Gesamtkraft (Zugkraft und Auftriebskraft) der Kontaktwinkel bestimmt werden. Für die Untersuchungen wurde ein Ringtensiometer der Fa. Lauda (TE 1C/CA) verwendet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 34 zusammengestellt.

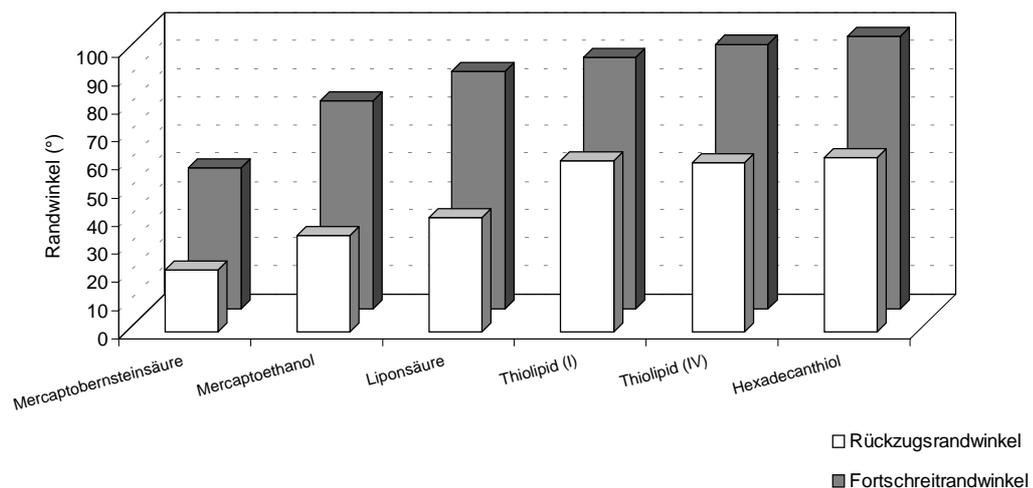


Abbildung 34: Fortschreit- und Rückzugsrandwinkel von beschichteten Goldplättchen, ermittelt nach der Wägemethode

Weitere Verfahren zur Ermittlung von Grenzflächenspannungen sind a) das Steighöhenverfahren, bei dem die Steighöhe in einer Kapillare mit definiertem Radius

gemessen wird; b) das Tropfenvolumenverfahren, bei der die Größe der Flüssigkeitstropfen bestimmt wird; c) das Spinning-Drop-Verfahren, bei dem die Gestalt eines Tropfens in einer schnell rotierenden Kapillaren ausgemessen wird, sowie d) das Blasendruckverfahren, bei dem der Druck bestimmt wird, unter dem sich eine Blase von einer Kapillaren mit bekanntem Innenradius ablöst [153].

4.3.4 Ellipsometrische Schichtdickenbestimmungen

Die Ellipsometrie umfaßt im weitesten Sinne Messungen des Polarisationszustandes von Licht. Bereits vor mehr als 100 Jahren wurde von Paul Drude und von Lord Rayleigh der Polarisationszustand reflektierter Lichtstrahlen untersucht [154].

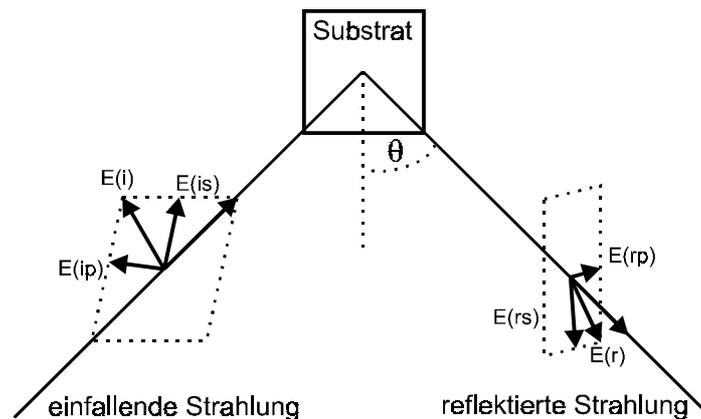


Abbildung 35: Strahlenverlauf am Ellipsometer bei einem Einstrahlungswinkel kleiner als der Brewsterwinkel. Dargestellt sind die Energievektoren der einfallenden (i = incident) und reflektierten (r = reflected) Strahlung, sowie die parallelen (p) und senkrechten (s) Vektorkomponenten.

Anhand von Änderungen der Amplitude der optischen Welle und der Phasenverschiebung der senkrechten und parallelen Energievektoren des auf die Substratoberfläche eingestrahnten (linear polarisierten) Lichts können der Brechungsindex, der Extinktionskoeffizient und die Dicke einer unbekanntenen Schicht ermittelt werden.

Das Verhältnis der parallelen und senkrechten Wellenanteile kann anhand der FRESNELSchen Reflektionskoeffizienten r_p ($E^{(rp)}/E^{(ip)}$) und r_s ($E^{(rs)}/E^{(is)}$) mit Hilfe der Ellipsometerwinkel (ψ und Δ) angegeben werden.

$$r_p/r_s = \tan \psi \exp(i\Delta) \quad 4.2$$

Die optischen Eigenschaften des Mediums werden durch den Brechungsindex (n) und durch den Extinktionskoeffizienten (E) hinlänglich beschrieben. Beide Größen sind Funktionen der Wellenlänge des Lichtes. Durch r_p , r_s und mit den Ellipsometerwinkeln können diese Parameter und die Schichtdicke ermittelt werden [155].

Für die Untersuchungen wurde ein Ellipsometer der Fa. SENTECH (SE 400) mit in x-y-Richtung veränderbarer Probenhalterung (Mapping Ellipsometry) verwendet. Dieses Gerät arbeitet mit einem He/Ne-Laser, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, bei Einfallswinkeln zwischen 40° und 80° .

In der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 36) sind die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen an selbstordnenden Thioalkoholen zusammengefaßt.

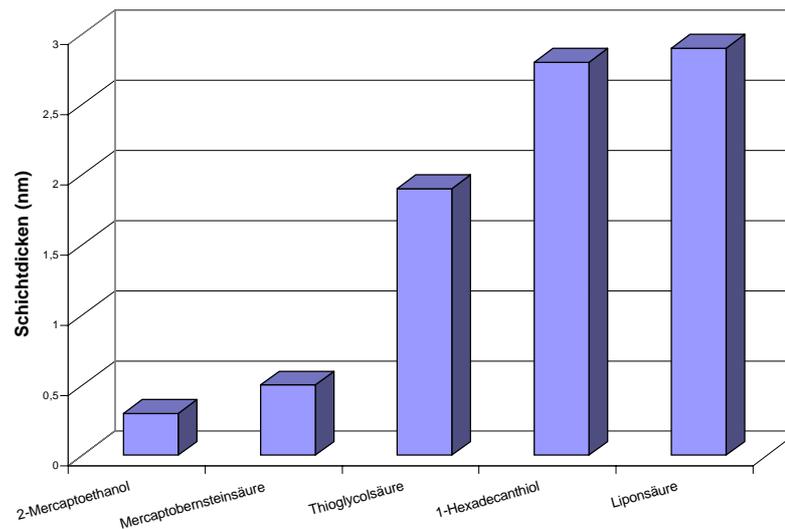


Abbildung 36: Ermittlung der Schichtdicken ausgewählter Alkanthiolschichten mit Hilfe der Ellipsometrie (vgl. Tabelle 8)

4.3.5 Diskussion

Aus den Experimenten zur Verfolgung des Aufwachsverhaltens von Alkanthiolen auf Goldelektroden erkennt man, daß die QMB-Technik für die Untersuchung dieser Phänomene geeignet ist. Die großen Standardabweichungen (Abbildung 32) verdeutlichen allerdings auch die Grenzen der Methode. Weil es aufgrund der starken Dämpfung der Quarzschwingung in Flüssigkeiten nicht möglich ist, ohne Abschirmung einer Seite der Quarzscheibe Messungen durchzuführen (siehe Kapitel 2), und weil keine geeignete Gehäusungstechnik zur Verfügung steht, die es erlaubt in organischen Lösungsmitteln zu arbeiten, wurden die Reaktionen offline durchgeführt. Diese Arbeitsweise ist verbunden mit einer Unterbrechung des Adsorptionsprozesses bei gleichzeitiger mechanischer Belastung der adsorbierten Schichten und führt deshalb zu relativ großen Schwankungen. Es wurden jedoch maximale Oberflächenbedeckungen ermittelt, die mit den nach Sauerbrey [63] berechneten Werten für monomolekulare Beschichtungen übereinstimmen. Desweiteren konnten die experimentellen Bedingungen optimiert werden, um innerhalb kurzer Zeit eine Sättigung der Oberfläche zu erreichen. Ausgehend von diesen Experimenten, die dazu dienten, den Verlauf der Adsorption von Alkanthiolen an Goldschichten zu verfolgen, wurden Experimente zur Charakterisierung der entstandenen Monoschichten durchgeführt.

AFM-Aufnahmen waren wegen der Rauigkeit der Goldoberfläche nicht sinnvoll, weil die Dimensionen der „Körner“ (Bild 2) die einer molekularen Bedeckung übersteigt. Das bedeutet, daß sich die Schichten der Morphologie der Oberfläche anpassen. Für derartige Untersuchungen müßte man homogene Au (111) Kristalle verwenden [150]. Es standen

jedoch alternative Möglichkeiten zur Verfügung, die zur Charakterisierung der modifizierten Sensoroberflächen dienen sollten. So konnten mit Hilfe von Randwinkeluntersuchungen deutliche Unterschiede in der Hydrophobizität der Substrate festgestellt werden. Lediglich Hexadecanthiol und das Thiolipid IV zeigten demzufolge eindeutig lipophiles Verhalten mit einem Fortschreitrandwinkel von über 90° . Demgegenüber sind die mit Mercaptobernsteinsäure und mit 2-Mercaptoethanol beschichteten Substrate hydrophil. Liponsäure, ebenso wie das Thiolipid I, haben einen Fortschreitrandwinkel um die 90° und demzufolge gleichen sich die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften nahezu aus. Diese Untersuchungen beweisen, daß z.B. Hexadecanthiol, entsprechend den Erwartungen die Goldoberfläche homogen bedeckt. Die Ausbildung einer dichten Matrix der Alkylketten führt, ebenso wie bei den Thiolipiden zur Ausbildung von Fortschreitrandwinkeln über 90° . Nicht so eindeutig ist die Interpretation der Fortschreitrandwinkel unter 90° , weil es zur Ausbildung von Fehlstellen, von gewinkelten Strukturen oder auch zur Bildung von Doppelschichten kommen kann. Deshalb wurden die Ergebnisse mit QMB-Untersuchungen (Tabelle 3) verglichen. Tatsächlich findet man bei der Adsorption von Hexadecanthiol an Goldelektroden die theoretisch berechneten Massebeladungen wieder. Somit kann man davon ausgehen, daß in diesem Fall hochgeordnete monomolekulare Beschichtungen erzeugt wurden. Der Vergleich der Resultate der Adsorption von Liponsäure (121 Hz) mit dem Erwartungswert (68 Hz) legt die Vermutung nahe, daß es hierbei zur Ausbildung von Doppelschichten kommt. Diese Hypothese wird durch ellipsometrische Untersuchungen (4.3.4) bestätigt. Die experimentell ermittelte Schichtdicke von 2,9 nm ist wesentlich größer als die mit Simulationsrechnungen theoretisch vorhergesagte Schichtdicke von 0,84 nm [156]. Die vermutlich wasserstoffverbrückten Doppelschichten wurden ebenfalls bei der Anlagerung von Mercaptobernsteinsäure gefunden. Untersuchungen mit Thiouracil (theoretisch: 42 Hz; gemessen: 205 Hz) zeigen, daß sich auch Multischichten im SA-Verfahren anordnen können. Für Verbindungen mit Molmassen unter 100 g/mol (Thioglykolsäure und 2-Mercaptoethanol) können wegen der hohen Standardabweichungen der QMB-Experimente keine eindeutigen Schlußfolgerungen gezogen werden.

Die durchgeführten Messungen zur Adsorption von Thiolipiden zeigen eine große Diskrepanz im Vergleich zu den theoretisch ermittelten Werten. Ursache ist möglicherweise ein Fehler in der den Berechnungen zugrunde liegenden molekularen Fläche ($0,43 \text{ nm}^2 \cong \text{DSPC}$). Aufgrund der stark gewinkelten Anordnung der Thiolipide kommt es wahrscheinlich zu einer Vergrößerung des Flächenbedarfs. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Thiolipide festgestellt werden. Die Differenzen liegen innerhalb der Standardabweichung.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß mit der Quarzmikrowaage der Massezuwachs bei der spontanen Adsorption von Thiolen auf Goldelektroden prinzipiell verfolgt werden kann. Zusätzliche Informationen wie Schichtdicke und Hydrophobizität sind notwendig, um Aussagen zur Struktur der entstandenen Filme treffen zu können. Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig mit Hexadecanthiol beschichtete

Schwingquarze verwendet, um eine optimale hydrophobe Basisbeschichtung zu gewährleisten.

4.4 Anwendung der Langmuir-Blodgett Technik

4.4.1 Begriffe

Chemische Substanzen kann man prinzipiell in wasser- und fettlösliche Substanzklassen einteilen. Moleküle, die beide Eigenschaften aufweisen, nennt man **Amphiphile**. Die Kombination dieser einander widersprechenden Eigenschaften führt zur spontanen Ausbildung geordneter Strukturen beispielsweise an den Grenzflächen isotroper Medien. Amphiphile sind essentielle Bausteine z.B. biologischer Membranen aber auch industriell von Bedeutung (Tenside). Die am längsten bekannten Amphiphilen sind Seifen.

Eine **Langmuir-Monoschicht** ist ein Areal geordneter, amphiphiler Moleküle, die mit ihren hydrophilen Kopfgruppen auf der einen und mit den hydrophoben Schwänzen auf der anderen Seite der Fläche orientiert sind. Beim Spreiten flüssiger oder gelöster Amphiphile an der Grenzfläche Wasser/Luft kommt es zur spontanen Ausbildung derartiger Monoschichten. Dabei kann die Oberflächenspannung des Wassers ($\gamma_{\text{Wasser}} \approx 72 \text{ mN/m}$) bis Null gesenkt werden.

Die Änderung der Oberflächenspannung, verursacht durch die Ausbildung von Langmuir-Monoschichten, bezeichnet man als **lateralen Druck** (Π). Der Lateraldruck (oder Oberflächendruck) beschreibt die Differenz zwischen der Oberflächenspannung des reinen Wassers (γ_0) und der filmbedeckten Wasseroberfläche (γ_F) und hat die Dimension [mN/m].

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma_F \quad 4.3$$

Die grafische Darstellung in Abhängigkeit von der Fläche je Molekül (bei konstanter Temperatur) nennt man **Isotherme** (Abbildung 37).

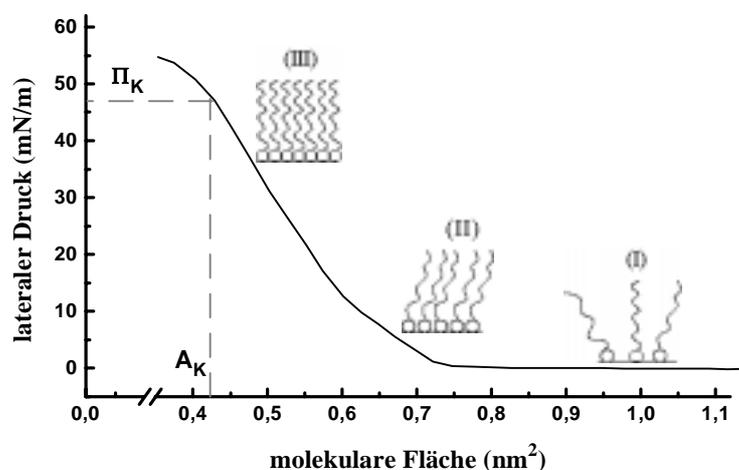


Abbildung 37: Druck/Flächendiagramm von DSPC bei 20°C (I gasanaloge Phase, II flüssig-ausgedehnter Bereich, III flüssig-kondensiert (super liquid))

Wie in Abbildung 37 dargestellt, verläuft die Kompression von Lipidfilmen an der Wasseroberfläche in mehreren Phasen. Bei niedrigem Lateraldruck ($\Pi < 0,2 \text{ mN/m}$) treten gas- und flüssiganaloge Zustände auf (I). Durch Verringerung der Oberfläche bilden sich kondensierte Domänen innerhalb des flüssiganalogen Films (II). Letzendlich erreicht man im Bereich der maximalen Kompressibilität quasi-kristalline Zustände (III). Weitere Druckerhöhung führt zur Zerstörung der Nahordnung der Moleküle. Das Zusammenbrechen der Struktur erfolgt bei einem für die jeweilige Substanz spezifischen Kollapsdruck (Π_K). Im Jahre 1918 hat Langmuir entdeckt, daß es möglich ist, Lipidmonoschichten auf Substrate zu übertragen. Seine Assistentin, Katharine Blodgett stellte 16 Jahre später fest, daß dieser Vorgang wiederholbar ist und zur Ausbildung von Multischichten definierter Dicke führt [157, 158]. Filme, die auf diese Art übertragen werden, nennt man **Langmuir-Blodgett (LB)** Filme.

4.4.2 Filmwaagetechnik

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten LB-Filme werden mit Hilfe der Filmwaagetechnik auf Substrate übertragen. Der Aufbau der Filmwaage entspricht im Prinzip dem von Pockel gegen Ende des vergangenen Jahrhunderts entwickelten Modell („Langmuir-Pockels-Filmwaage“). Die wesentlichen Bestandteile des Gerätes sind ein temperierbares Wasserbad, ein Druckmeßsystem nach Wilhelmy sowie eine bewegliche Barriere. Wie in Abbildung 38 dargestellt, werden die auf der Wasseroberfläche gespreiteten Lipidfilme mit Hilfe der beweglichen Barriere bei einer konstanten Geschwindigkeit komprimiert. Dieses Verfahren der *kontinuierlichen* Kompression erleichtert die Aufnahme der Isothermen, kann jedoch bei zu hohen Kompressionsgeschwindigkeiten zu Überkompressionen des Films führen. Deshalb werden Isothermen auch im *diskontinuierlichen* Verfahren, d.h. unter Gleichgewichtsbedingungen, erzeugt.

Die Übertragung von Monoschichten auf feste Träger (Quarze) war im Rahmen dieser Arbeit von entscheidendem Interesse. Mit dem von Langmuir und Blodgett entwickelten Verfahren wurde wie oben beschrieben eine Monoschicht an der Wasser/Luft Grenzfläche erzeugt. Indem man einen beschichteten Träger senkrecht durch diese hochgeordneten

Amphiphile taucht, werden die Filme übertragen. In Abhängigkeit von der Oberfläche des Trägers ordnen sich beim Eintauchen die hydrophoben Ketten oder beim Herausziehen die Kopfgruppen an der Substratoberfläche an. Durch wiederholtes Ein- und Austauchen können gezielt mehrere Schichten übertragen werden. Wie in Abbildung 38 dargestellt, wurden in dieser Arbeit mit Hexadecanthiol beschichtete Quarze verwendet. Die Übertragung erfolgte

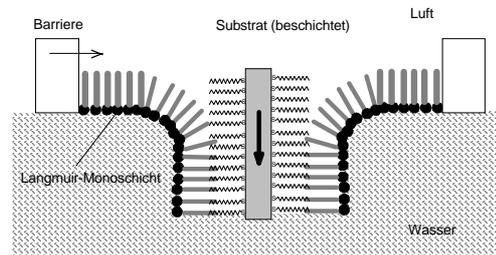


Abbildung 38: Übertragung einer Langmuir-Monoschicht auf ein Alkanthiol-beschichtetes Substrat

also hydrophob beim Eintauchen unter „Verschmelzung“ der Alkylketten. Der Materialverlust auf der Wasseroberfläche wird durch automatisches Nachregeln der Filmfläche bei konstantem Druck ausgeglichen. Als Übertragungsverhältnis bezeichnet man den Quotienten aus Substratoberfläche und nachgeregelter Fläche.

LB-Filme sind stabil, d.h. beim Übertragen werden die vom Lateraldruck beeinflussten Filmstrukturen eingefroren. Damit besteht die Möglichkeit, relativ exakt vorhersagbare Strukturen auf Sensoroberflächen zu erzeugen. Vornehmlich werden Übertragungsdrücke so gewählt, daß sich der Film im quasi-kristallinen Bereich, d.h. in Phase III, befindet (Abbildung 32). Die beschichteten Substrate wurden ausschließlich unter Wasser gehandhabt, um eine Zerstörung der Beschichtungen beim Durchziehen durch die Wasseroberfläche zu vermeiden.

4.4.3 Eigenschaften der untersuchten LB Filme

Ein Vorteil der Substratbeschichtung unter Anwendung der LB-Technik im Vergleich zu herkömmlichen Methoden ist die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode. DSPC*-Filme wurden bei einem Lateraldruck von 30 mN/m auf Quarze übertragen. Zur Ermittlung der Frequenzdifferenzen wurden die Substrate anschließend unter Stickstoff getrocknet und vermessen. Die untersuchten DSPC-Filme ergaben eine Frequenzänderung von 115 Hz mit einer Standardabweichung von 5,7% ($N = 20$). In Anbetracht der Empfindlichkeit und des Einflusses von Störgrößen bei QMB-Untersuchungen (siehe Kapitel 2) sind diese Fehler gering.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil dieser Beschichtungstechnik ist aber auch die Möglichkeit des definierten Einbaus von Rezeptorstrukturen in die Matrixlipide bzw. die Verwendung spezifischer Lipide. LB-Filme besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit biologischen Membranen. Deshalb wurden sie im Rahmen der vorliegenden Arbeiten als Modellmembranen eingesetzt, an denen spezifische Reaktionen durch den Einbau dieser Rezeptormoleküle verfolgt werden konnten. Als Rezeptoren wurden einerseits Glycolipide (Ganglioside und Mannoselipide) in DSPC[†]-Monoschichten eingebaut und andererseits Wechselwirkungen an derivatisierten Phospholipiden untersucht. Durch Verwendung von DSPC als Gerüstlipid wird die Fluidität der Monoschicht beeinflusst. Das ist günstig, um die physikochemischen Eigenschaften während der Übertragung konstant zu halten.

In Abbildung 39 sind Isothermen der Gemische von Gangliosiden (zur Struktur siehe Kap. 7) und DSPC dargestellt.

Zunächst läßt sich anhand der Isotherme der Ganglioside die molekulare Fläche am Kollaps (A_{K3}), d.h. bei der größten Packungsdichte der Lipide, ermitteln. Demzufolge hat G_{M1} einen Platzbedarf von $0,84 \text{ nm}^2$ (im Vergleich DSPC: $0,43 \text{ nm}^2$). Der relativ niedrige Lateraldruck am Kollaps (53 mN/m) weist auf hohe flüssiganaloge Anteile hin. Auch bei einem Gemisch

* DSPC – 1,2-Distearyl-sn-glycero-phosphatidylcholin

† DSPC – 1,2-Distearyl-sn-glycero-phosphatidylcholin

von 30% G_{M1} in DSPC kollabiert der Film schon bei einem Druck von 51 mN/m. Die molekulare Fläche ist hier erwartungsgemäß kleiner ($0,58 \text{ nm}^2$). Mischfilme mit einem G_{M1} -Anteil von 10% waren im Vergleich stabiler. Bei einem Lateraldruck von 60 mN/m und einer molekularen Fläche von $0,47 \text{ nm}^2$ sind diese Monoschichten kollabiert. Die Monofilme zeigten bei Raumtemperatur keine eindeutigen Phasenübergänge.

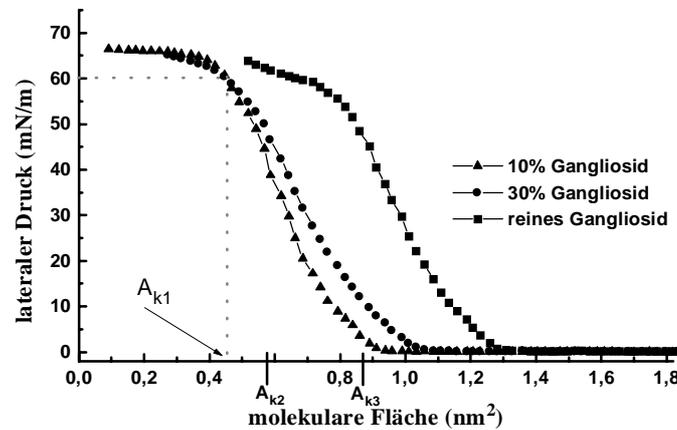


Abbildung 39: Π/A -Isothermen von zwei Gangliosid*/DSPC-Gemischen und von reinem Gangliosid bei Raumtemperatur (A_{K1} , A_{K2} und A_{K3} sind die Flächen am Kollaps)

Durch Kombination einer Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop ist es möglich, Informationen über die Morphologie der Monofilme zu erhalten. Dazu wird der Film mit einem Fluoreszenzmarker (0,1-1% NBD-PC) markiert. In der eingesetzten Konzentration beeinflusst dieser Farbstoff das Phasenverhalten der Lipide nicht. In Bild 3 sind fluoreszenzmikroskopische Momentaufnahmen eines DSPC/ G_{M1} -Monofilms (bei 30 und 60 mN/m) dargestellt. Der Farbstoff ist in der hellen, flüssiganalogen Phase lokalisiert. In Bild 3 (A) sind die dunklen, kondensierten Lipiddomänen mit einer Größe von $1,5\text{-}3 \mu\text{m}$ deutlich von der Umgebung differenziert. Bei weiterer Kompression des Films (Bild 3 (B)) sind die Lipide nahezu vollständig zweidimensional kristallisiert.

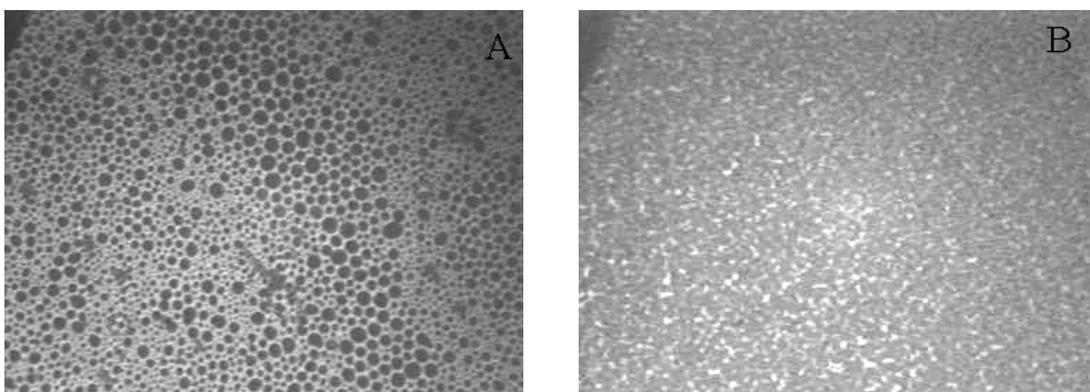


Bild 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Mischfilms von DSPC und G_{M1} im molaren Verhältnis 9:1. (Lateraldruck: $\Pi_{\text{Bild A}} = 30 \text{ mN/m}$; $\Pi_{\text{Bild B}} = 60 \text{ mN/m}$)

* Gangliosidfraktion – G_{M1} (Struktur siehe Kapitel 8)

Weitere Untersuchungen sind zu den ebenfalls als Sensorbeschichtungen eingesetzten Mischfilmen aus DSPC und den Glycolipiden *Mannosid III* bzw. *Mannosid VIII* (zur Struktur siehe Kapitel 6) durchgeführt worden. Gemische aus 10% Mannosid VIII und DSPC kollabieren bei einem Lateraldruck von 48 mN/m im Vergleich zu analogen Gemischen des Mannosids III, die bei 43 mN/m kollabieren. Ursachen für die Unterschiede in der Stabilität der Mischfilme sollten in der Struktur der hydrophoben Schwänze liegen, denn der molekulare Platzbedarf (entspr. Dimension der Kopfgruppen) ist in beiden Fällen identisch. Diese Befunde werden ebenfalls durch Fluoreszenzaufnahmen bestätigt. In Bild 4 sind Momentaufnahmen beider Gemische bei $\Pi = 30$ mN/m dargestellt. Es ist zu erkennen, daß unter diesen Bedingungen beide Mischfilme wenig flüssiganaloge Domänen (hell) aufweisen. Das Ausmaß der kristallinen Bereiche ist nahezu identisch.

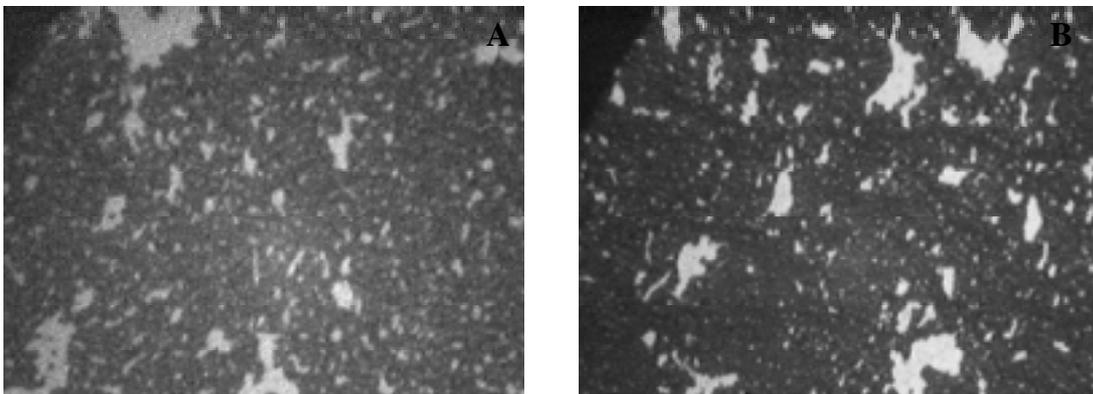


Bild 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mischfilmen von DSPC und Mannosid III (A) und DSPC und Mannosid VIII (B) im molaren Verhältnis 9:1 bei einem Lateraldruck von 30 mN/m.

4.4.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lipidmonoschichten als sensitive Materialien verwendet, weil sie gut reproduzierbar auf QMB-Sensoren übertragbar sind. Neben diesem technologischen Aspekt haben die durch Kopplung von SA- und LB-Beschichtung erzeugten Lipiddoppelschichten große Bedeutung als biomimetische Modellmembranen. Durch den Einbau von Glycolipiden wurden die Strukturen natürlicher Zellmembranen simuliert.

Vorraussetzung war die Entwicklung einer geeigneten Beschichtungstechnik, die möglichst universell zur Fixierung von Erkennungsstrukturen in Membranen geeignet ist. Günstig erwies sich die hydrophobe Übertragung von Mischfilmen aus 10 % Glycolipid und 90 % DSPC auf (mit Alkanthiolen hydrophobierten) Sensoroberflächen. Deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Lipidstrukturen konnten den Fluoreszenzuntersuchungen entnommen werden. Mischfilme aus DSPC und Gangliosid (9:1) bilden kreisförmige Domänen (Bild 3). Erst beim Erreichen des Kollapsdruckes entstehen großflächige kristalline Areale. Im Gegensatz dazu sind bei Mischfilmen aus Mannoselipiden auch bei einem Lateraldruck von 30 mN/m keine differenzierten Strukturen erkennbar. Strukturelle Unterschiede zwischen Filmen die Mannosid III und Filme, die Mannosid VIII enthalten,

können ebenfalls nicht den fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen entnommen werden. Die Länge der Ethoxyketten hat offensichtlich wenig Einfluß auf die zweidimensionale Orientierung der Monoschichten.

4.5 Zusammenfassende Diskussion

Die beschriebenen Methoden zur Erzeugung von dünnen Schichten auf Quarzsensoren bildeten eine entscheidende Grundlage für die vorliegende Arbeit. Im Sinne der Zielstellung wurde eine Technik entwickelt die geeignet ist, molekulare Erkennungsreaktionen mit Quarzsensoren zu verfolgen. Es standen zunächst einfache Beschichtungstechniken zur Verfügung mit deren Hilfe aber nur ungeordnete Schichtstrukturen zu erzeugen waren. Wesentlich definierter sind die durch Kopplung von SA- und LB-Technik erzeugten Modellmembranen. Diese supramolekularen Strukturen sind prinzipiell so wie Membranen natürlicher Zellen aufgebaut. Diese Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit Wechselwirkungen an solchen biomimetischen Strukturen. Das ist eine moderne Strategie zum Nachweis biomolekularer Reaktionen, die in der vorliegenden Arbeit erstmals umfassend an QMB-Sensoroberflächen durchgeführt wurde. Entscheidende technologische Vorteile sind die geringe Dicke und der hohe Ordnungsgrad der übertragenen Filme, wodurch die akustischen Eigenschaften der Quarze nicht beeinflußt wurden. Ziel war es zu klären, inwieweit mit der QMB-Technik charakteristische biophysikalische Wechselwirkungen an Membranen (Zelladhäsionen, Adsorption von Toxin und enzymatische Reaktionen) simuliert werden können. Einleitend wurden dennoch Untersuchungen an ungeordneten Schichten durchgeführt, um die Wechselwirkung niedermolekularer Analyte an supramolekularen Strukturen (makrocyclische Modellrezeptoren) zu verfolgen.

5 Makrocyclische Modellrezeptoren als Schichtmaterialien

Die aus der supramolekularen Chemie bekannten „Wirt-Gast-Beziehungen“ werden zum Nachweis chemischer und biochemischer Analyten in der Sensorik genutzt. Wechselwirkungen zwischen Wirt- und Gastmolekül beruhen auf schwachen zwischenmolekularen Kräften, die jedoch durch die sterische Anpassung des Gastes im Hohlraum des Wirtes verstärkt werden und somit einen Selektivitätsgewinn bedeuten können. Einfache Wirtmoleküle dienen als Modellrezeptoren, um die Funktionalität des Gesamtsystems zu zeigen. Neben den nichtstöchiometrischen Einschlußverbindungen (Clathrate) sind vor allem die stöchiometrischen Wechselwirkungen niedermolekularer Verbindungen mit makrocyclischen Wirtmolekülen (Cavitanden, Cyclodextrine, Calixarene, etc.) seit Ende der 70er Jahre intensiv untersucht worden [159]. Im folgenden Kapitel haben wir Studien zum Nachweis von Molekülen mit einer Molmasse < 100 g/mol mit Hilfe von Cavitand- bzw. Calixarenbeschichtungen in wäßrigen Medien durchgeführt.

5.1 Wechselwirkungen von Ammoniumsalzen mit einem modifizierten Calix[4]aren

In dieser Studie wurde ein Anionenrezeptor getestet, der durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen Acetate bzw. Bromide binden sollte. Verwendet wurde ein bifunktionelles Calix[4]aren, das zwei Harnstoffeinheiten enthält. Das Molekül ist in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. So werden beispielsweise Acetate im Käfig gebunden (Abbildung 40).

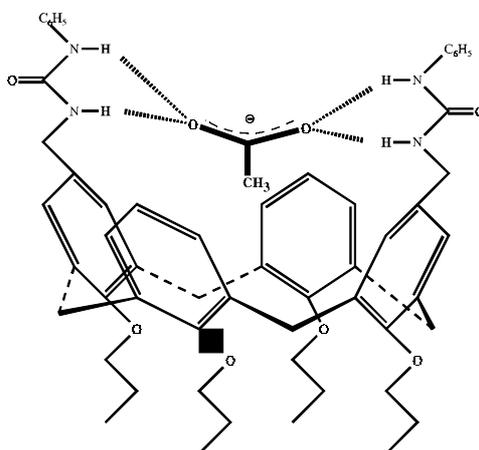


Abbildung 40: Modellvorstellung zur Bindung von Acetat-Anionen an ein harnstoffderivatisiertes Calix[4]aren (im folgenden als Calix[4]aren bezeichnet)

Die Detektion von Anionen durch synthetische Rezeptoren ist im Vergleich zu Untersuchungen zum Nachweis von Metallionen durch Komplexbildung ein wenig entwickeltes Forschungsgebiet. Erst in jüngster Zeit wurden erste systematische Untersuchungen mit modifizierten Calixarenen durchgeführt [160; 161]. Von Hamilton et.al [162] wurde gezeigt, daß durch die Verwendung von Harnstoffderivaten als H-

Brückendonatoren vier sekundäre Wasserstoffbindungen ausgebildet werden können. Dadurch entstehen in Lösung (Dimethylsulfoxid) stabile Komplexe. Studien zur Bindung von Anionen wurden von Ungaro et.al [163] mit $^1\text{H-NMR}$ durchgeführt. Bei Kopplung von Tetrabutylammoniumsalzen konnte eine deutliche Tieffeldverschiebung der NH_x -Bande festgestellt werden. Ungaro et.al fanden eine ausgeprägte Affinität von Calix[4]aren zu Acetat-Anionen ($K_{\text{Ass}}=2200 \text{ M}^{-1}$) im Gegensatz zu Halogeniden mit Assoziationskonstanten unter 10 M^{-1} .

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Calix[4]aren war ein Vergleich zwischen den von Ungaro et.al beschriebenen Wechselwirkungen in Lösung und dem Adsorptionsverhalten der Anionen an modifizierte Sensoroberflächen. Für die Untersuchungen wurden Tauchkopfsensoren (Kapitel 4) verwendet. Die Schichten wurden mit der Air-Brush-Technik auf den Sensoren fixiert.

Mit der QMB-Technik wurden Studien zur Wechselwirkung von trägerfixierten Calix[4]aren mit vier Ammoniumsalzen in Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführt. Verwendet wurden Tetrabutylammoniumacetat (NBu_4Ac), Ammoniumacetat (NH_4Ac), Tetrabutylammoniumbromid (NBu_4Br) und Ammoniumbromid (NH_4Br). Generell waren bei allen Untersuchungen im Vergleich zur Referenz (unbeschichteter Quarz) Masseanlagerungen zu beobachten. Die Ergebnisse von Ungaro et.al konnten allerdings nicht bestätigt werden. Bei Wechselwirkungen mit Bromiden wurden durchschnittlich größere Frequenzänderungen ermittelt als bei den Ammoniumsalzen der Acetate. Diese größeren Frequenzänderungen resultieren nicht nur aus der größeren Molmasse von Bromid. Wie in Abbildung 41 dargestellt, ist auch die Anzahl der an der Sensoroberfläche fixierten Bromidmoleküle höher als bei den Acetaten.

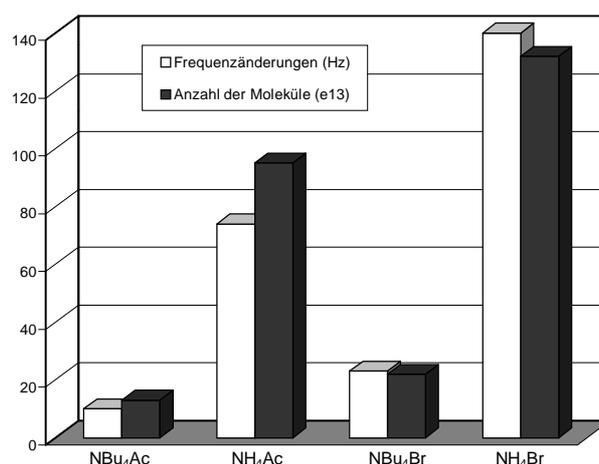


Abbildung 41: Frequenzänderungen bzw. molekulare Beladung von Calix[4]aren-beschichteten Quarzsensoren bei Wechselwirkung mit Tetrabutyl- und Ammoniumacetat sowie Tetrabutyl- und Ammoniumbromid

Außerdem wurden Unterschiede im Frequenzverlauf bei Zugabe von Tetrabutylammoniumsalzen (10 bzw. 23 Hz) im Vergleich zu einfachen Ammoniumsalzen (74 bzw. 140

Hz) festgestellt. Zusätzlich wurden Studien in Dimethylsulfoxid durchgeführt, wobei keine signifikanten Frequenzänderungen gegenüber der Referenz festgestellt werden konnten.

Die hier dargestellten Untersuchungen widerlegen die Ergebnisse von Ungaro et.al nicht. Bei Wechselwirkungen an supramolekularen Strukturen ist der Ordnungszustand der Moleküle von essentieller Bedeutung. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, daß aus Untersuchungen an fest/flüssig-Grenzflächen andere Schlußfolgerungen gezogen werden als bei Studien in der flüssigen Phase. Erschwerend kommt hinzu, daß die von uns verwendete Beschichtungstechnik (Air-Brush) inhomogene Beschichtungen erzeugt. Das äußert sich vor allem in Standardabweichungen um die 30%.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Hilfe der QMB-Technik Wechselwirkungen an Einschlußverbindungen nachvollziehbar sind. Um spezifische Wechselwirkungen an derartigen Strukturen zu beschreiben und zu quantifizieren, müssen andere Beschichtungstechniken angewandt werden. Unspezifische Wechselwirkungen sind mit dieser Methode nachweisbar.

5.2 Cavitanden als vielseitige molekulare Rezeptoren

5.2.1 Einführung

Trotz der in Kapitel 5.1 dargestellten Probleme bei QMB-Messungen an Einschlußverbindungen lassen sich durch geeignete Untersuchungsmethoden Wirt-Gast-Wechselwirkungen auch mit ungeordneten Schichten nachweisen. Basierend auf Erkenntnissen, die unter Verwendung makrocyclischer Modellrezeptoren bei Messungen in der Gasphase gewonnen werden konnten [164], sollte das Adsorptionsverhalten verschiedener niedermolekularer Analyte an modifizierten Sensoroberflächen getestet werden. Aus einer Vielzahl von QMB-Untersuchungen in Gasen ist bekannt, daß mit strukturellen Veränderungen der Schichtmaterialien (Größe der Hohlräume, aromatische Systeme, Einfluß von Alkylketten usw.) das Adsorptionsverhalten von Molekülen an Sensoroberflächen gezielt beeinflusst werden kann.

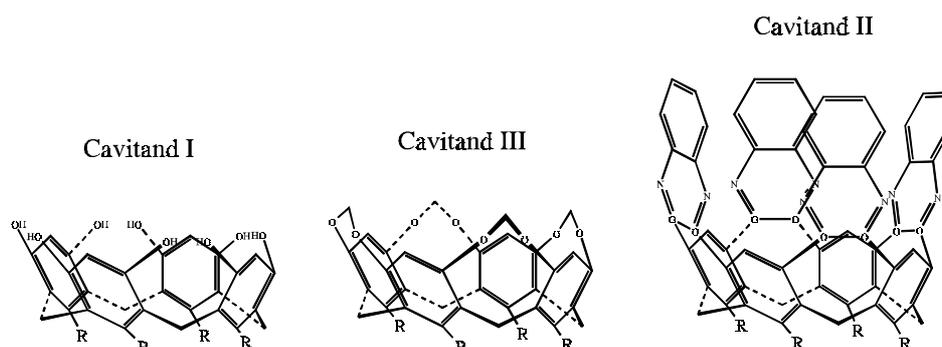
Im folgenden Abschnitt werden Untersuchungen an Cavitandschichten vorgestellt. Cavitanden, definiert als organische Verbindungen mit erzwungener konkaver Oberfläche in molekularer Größenordnung [165], sind interessante und vielseitige synthetische Rezeptoren. Das Adsorptionsverhalten niedermolekularer Verbindungen an derartigen Strukturen in Flüssigkeiten ist komplexer als in Gasen, weil Wechselwirkungen zwischen Medium und Analyt auftreten. So hat die Hydrophilie und die Löslichkeit der Verbindungen entscheidenden Einfluß auf deren Adsorptionsverhalten. In Tabelle 4 ist die Wasserlöslichkeit und der Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser (als Maß für die Lipidlöslichkeit) der als Modellschichten ausgewählten Lipide aufgeführt. Diese Verbindungen sind durchweg hydrophil, unterscheiden sich aber hinsichtlich des Elektronengerüsts und damit bezüglich der Affinität zu den Cavitandschichten.

Tabelle 4: Verteilungskoeffizienten (Octanol/Wasser) und Wasserlöslichkeit einiger organischer Analyte

Analyt	$\log P_{\text{Oct}}$ [166]	Löslichkeit in Wasser [167]
Chloroform	1,97	wenig löslich
Tetrachlorethan	2,39	kaum löslich
Tetrachlorkohlenstoff	2,64	sehr wenig löslich
Tetrachlorethylen	2,88	unlöslich
Toluol	2,69	sehr wenig löslich
Anisol	2,04	unlöslich

Untersucht wurden zwischenmolekulare und sterische Wechselwirkungen, die durch die Derivatisierung der Cavitanden beeinflusst werden konnten. Strukturvariationen erfolgten in zweierlei Hinsicht. Einerseits wurden unterschiedliche Alkylreste (R) am unteren Teil des Rezeptors eingeführt und andererseits wurden verschiedene Brückenstrukturen zwischen den Resorcin-Einheiten am oberen Teil der Rezeptorverbindung verwendet.

Tabelle 5: Strukturelemente und Bezeichnung der untersuchten Cavitanden



Brückenstruktur	Substituent (R)	Bezeichnung
unverbrückt	-hexyl	I
diazanaphthalen	-hexyl	II.1
diazanaphthalen	-undecyl	II.2
methylen	-hexyl	III.1
methylen	-undecyl	III.2

In den Untersuchungen wurden unverbrückte Resorcinarene (I) sowie diazanaphthalen- (II) und methylenverbrückte (III) Cavitanden eingesetzt (siehe Kapitel 9). Aufgrund des π -Elektronensystems der diazanaphthalenverbrückten Derivate und wegen der freien OH-Gruppen der unverbrückten Derivate sollten Wechselwirkungen mit polaren Verbindungen erkennbar sein. Die unterschiedliche Länge der Alkylketten (am „unteren Rand“) hat Einfluß auf die Lipophilie und die Fluidität der Systeme. Auch an dieser Stelle sollten Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Analyte an diesen Systemen detektierbar sein.

5.2.2 Adsorptionsverhalten im wässrigen Medium

Zur Durchführung der Experimente wurden Edelstahlzellen verwendet, die parallele Untersuchungen an vier unabhängigen Quarzen ermöglichen. Es wurden jeweils drei Sensoren mit Cavitand (5000 ng) beschichtet und ein unbeschichteter Sensor als Referenz verwendet. Das System wurde im Durchfluß betrieben. Als Analyten wurden Chlorkohlenwasserstoffe, Aromaten und Carbonylverbindungen eingesetzt. Alle Untersuchungen fanden unter gleichen Bedingungen, d.h. bei einer Analytkonzentration von 100 ppm (100 mg/l) in dest. Wasser und bei 25°C, statt.

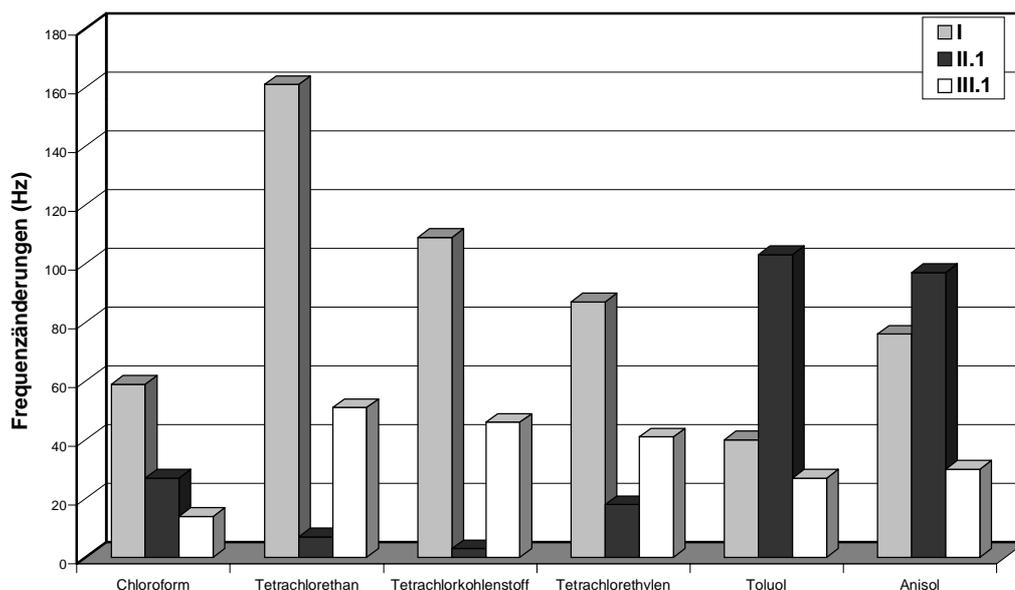


Abbildung 42: Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen zwischen trägerfixierten Käfigverbindungen und niedermolekularen Analyten in Wasser (100 ppm). Vergleich zwischen unverbrückten (I), diazanaphthalen-(II.1) und methylenverbrückten (III.1) Derivaten.

In Abbildung 42 ist ein typisches Frequenzmuster für die Reaktion der unterschiedlich verbrückten Cavitanden dargestellt. Aus den Untersuchungen sind zunächst deutlich die großen Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen zwischen den unverbrückten Cavitanden (I) und halogenierten Kohlenwasserstoffen zu erkennen. Diese starken Interaktionen werden durch die Polarität des Schichtmaterials hervorgerufen. Desweiteren sind ausgeprägte Adsorptionen der Verbindung Anisol an diazanaphthalenverbrückten Cavitanden festgestellt worden. Diese Adsorptionen werden durch Wechselwirkungen der π -Elektronensysteme (Wirt/Gast) verursacht. Ebenfalls starke Adsorptionen von Toluol an diazanaphthalenverbrückte Cavitanden sind auf Wechselwirkungen zwischen der Methylgruppe des Toluols und dem π -Elektronensystem des Cavitanden zurückzuführen. Demgegenüber steht die Erkenntnis, daß aufgrund der sterischen Verhältnisse der käfigartigen Verbindungen (II) offensichtlich die Wechselwirkungen mit halogenierten Kohlenwasserstoffen reduziert sind. Diese Analyten lagern sich nicht in die Hohlräume des Wirtmoleküls ein.

Weitere Untersuchungen wurden an Derivaten mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen am „unteren Rand“ des Cavitandgerüsts durchgeführt. Wie in Abbildung 43 dargestellt, lassen sich Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Analyte in Abhängigkeit von der Kettenlänge (Vergleich von Hexylderivaten und Undecylderivaten) feststellen. So geht aus den Untersuchungen hervor, daß die Verbindungen mit längeren Alkylketten stärker mit den Analyten in Wechselwirkung treten als die kurzkettigen Homologen. Dieses Adsorptionsverhalten wurde schon bei Untersuchungen in der Gasphase gefunden und damit erklärt, daß sich bei längererkettigen Cavitanden poröse und disperse Schichten ausbilden [164]. Damit verbunden sind bessere Diffusionseigenschaften und demzufolge eine erhöhte Masseanlagerung. Ähnliches Adsorptionsverhalten in der flüssigen Phase läßt auch hier den Schluß zu, daß die durch die Länge der Alkylketten beeinflusste Ordnung der Cavitandschichten entscheidend für das Ausmaß der Masseanlagerungen sind.

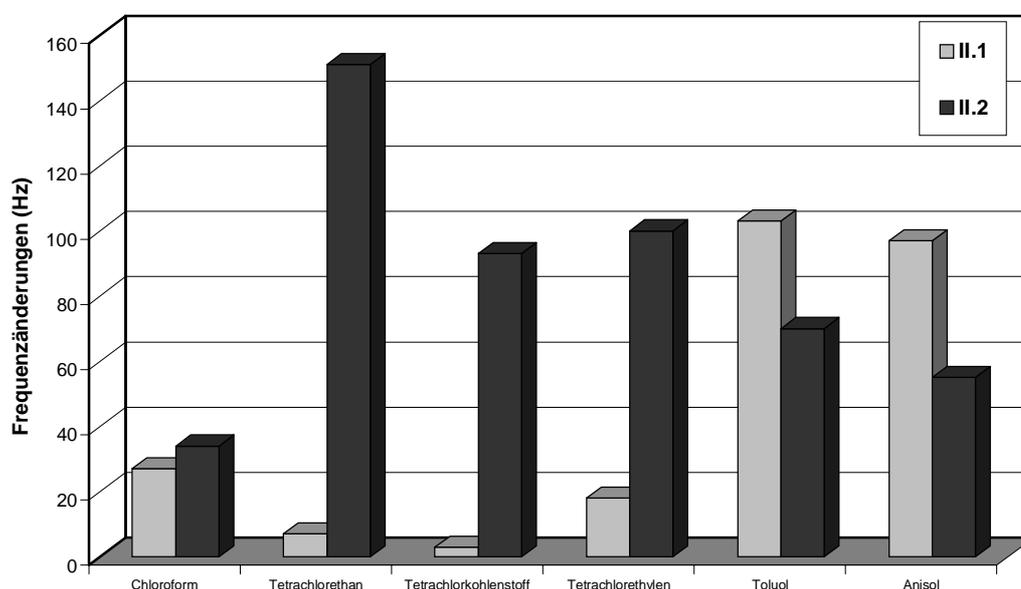


Abbildung 43: Einfluß der Länge der Alkylketten (am unteren Rand) von Cavitanden auf deren Wechselwirkungen mit verschiedenen Analyten (Verbindung II.1: hexyl; Verbindung II.2: undecyl)

Zusätzliche Effekte treten bei Wechselwirkungen zwischen diaznaphtalenverbrückten Cavitanden (II) und aromatischen Verbindungen (Toluol, Anisol) auf. Frequenzänderungen zwischen 70 und 100 Hz wurden sowohl bei den längererkettigen Verbindungen (II.2) als auch bei den hexylverzweigten Cavitanden (II.1) festgestellt. An dieser Stelle beeinflussen die Wechselwirkungen der π -Elektronensysteme der Aromaten entscheidend das Adsorptionsverhalten (Hohlraumeffekt).

Eine zusammenfassende Darstellung der Struktur der Cavitanden und aller Meßergebnisse findet man im experimentellen Teil (Kapitel 9).

5.3 Zusammenfassung

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an makrocyclischen Käfigstrukturen konnte das Adsorptionsverhalten niedermolekularer Verbindungen getestet werden. In einer ersten Studie zum Einschluß von Anionen in Calix[4]arene wurde eine höhere Affinität von Acetationen (im Vergleich zu Bromidionen) aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen nicht festgestellt. Mit der verwendeten Sensoranordnung (Tauchkopfsensoren) war es unter diesen Bedingungen nicht möglich, Aussagen zur Spezifität der Reaktionen zu treffen. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Untersuchungen die Herangehensweise verändert. Durch Verwendung einer Anordnung von vier unabhängigen Sensoren und durch den Einsatz einer Palette von fünf strukturell unterschiedlichen Makrocyclen (Tabelle 5) konnten Trendaussagen zum Adsorptionsverhalten von niedermolekularen Verbindungen getroffen werden. Die folgenden strukturellen Merkmale haben Einfluß auf die Affinität der Analyten:

- *Verbrückung*; bei Beschichtung mit diazanaphthalenverbrückten (II) Cavitanden wurden höhere Massebeladungen als an methylenverbrückten (III) ermittelt,
- *Kettenlänge*; allgemein führt eine Verlängerung der Ketten am „unteren Rand“ zu höheren Frequenzänderungen durch Bildung hydrophober und mikroporöser Schichten und
- *Polarität*; die unverbrückte, polare Verbindung (I) hat eine höhere Affinität zu den eingesetzten Analyten als die homologen verbrückten Cavitanden. Eine Ausnahme bildet die Adsorption von Aromaten an π -elektronenreichen Käfigverbindungen (Hohlraumeffekt).

Bei Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Acetonitril, Nitromethan und Ethylacetat wurden keine Masseanlagerungen detektiert, weil die ausgeprägte Hydrophilie der Analyten eine Anlagerung an der organischen Grenzschicht verhindert. Es ist anzunehmen, daß der Ordnungszustand der adsorbierten Wirtmoleküle wesentlich zum Reaktionsverhalten des Sensors beiträgt. Die Strukturen der Wirt-Gast-Komplexe in Lösung sind nicht in jedem Fall identisch mit den Strukturen der an der Sensoroberfläche adsorbierten Systeme. Trotzdem können auf der Grundlage dieser Untersuchungen Sensoranordnungen entwickelt werden. Zur Auswertung der unspezifischen Adsorptionen an Grenzflächen müssen Methoden der Mustererkennung herangezogen werden [168].

In der Biosensorik entfernt man sich zunehmend von einfachen makrocyclischen Modellen und nutzt biochemische Rezeptoren (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide), die spezifische Wechselwirkungen mit ausgewählten Bioanalyten eingehen. Zudem bedient man sich geordneter Lipidstrukturen, um biochemische Wechselwirkungen an einfachen Modellen nachzuvollziehen.

In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit werden Untersuchungen vorgestellt, die sich mit Analytanlagerungen an geordneten Systemen beschäftigen. Mit Hilfe der LB-Technik (siehe Kapitel 4) wurden supramolekulare Strukturen erzeugt, die als Modellmembranen dienen. Es

soll unter anderem gezeigt werden, daß durch die Verwendung derartiger Strukturen weitergehende Aussagen bezüglich der Mechanismen der molekularen Erkennung gewonnen werden können.

6 Enzymadsorptionen an trägerfixierte Phospholipide

6.1 Zielstellung

Im folgenden Abschnitt werden Untersuchungen vorgestellt, die gemeinsam mit einer Arbeitsgruppe des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt wurden. Ziel dieser Arbeiten war die Untersuchung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen in Abhängigkeit von den sterischen Eigenschaften der verwendeten Substratlipide. Zur Erzeugung trägerfixierter Lipidmembranen wurde die in Kapitel 4 dieser Arbeit vorgestellte Technik (Kopplung von SA- und LB-Technik) verwendet. An diesen supramolekularen Sensoroberflächen wurde die Adsorption von Phospholipase (PL) nachgewiesen.

Phospholipasen sind wasserlösliche Enzyme, die die Hydrolyse von Phospholipiden katalysieren. Sie spalten entweder die Bindung der Carbonsäureester (PL-A₁ und PL-A₂) oder die Phosphodiesterbindungen (PL-C und PL-D) (Abbildung 44). Bei Einwirkung von Phospholipasen aus Bienen- oder Schlangengift auf Lecithine (bzw. Kephaline) entstehen durch Abspaltung der mittelständigen Fettsäuren Lysophosphatidylcholine (bzw. – ethanolamine). Dieser Vorgang ist z.B. für die „Hämolyse“ von roten Blutkörperchen verantwortlich.

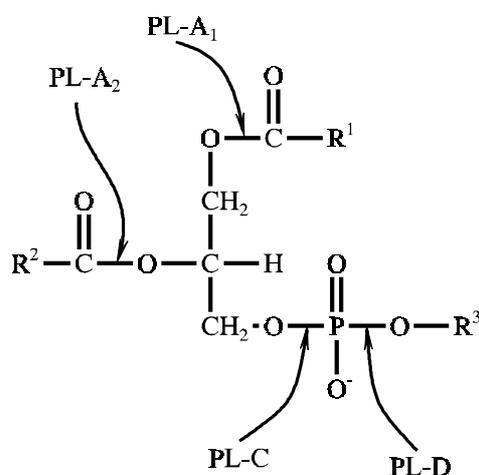


Abbildung 44: Einwirkung von Phospholipasen (A₁; A₂; C; D) auf 1,2-Diacyl-sn-phosphoglyceride

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Verzweigungen der mittelständigen Alkylkette (R²) sowie die Stereoisomerie der Phospholipide die enzymatische Aktivität entscheidend beeinflussen.

Eine wichtige Rolle bei dieser enzymatischen Reaktion spielt der Phasenzustand und die Aggregationsform der Phospholipidmoleküle. PL-A₂ katalysiert aktiv die Hydrolyse von Lipiden in micellaren Strukturen [169], in vesikulären Systemen [170] und in geordneten Monoschichten [171]. Die Aktivität der PL-A₂ gegenüber Monomeren ist sehr gering [172]. Für die enzymatische Aktivität der Phospholipasen ist demzufolge die spezifische Anlagerung

an geordnete Lipidstrukturen ebenso verantwortlich wie die anschließende Fettsäureabspaltung. Mit den klassischen Methoden zur Bestimmung der hydrolytischen Wirkung von Phospholipasen (pH-stat Titration, Fluorimetrie, Radiometrie) wird lediglich die Konzentration an freien Fettsäuren bestimmt. Die Adsorption der Enzyme an Substratmolekülen kann mit diesen Methoden nicht charakterisiert werden. Für die Verfolgung der Anlagerung von Phospholipase an trägerfixierte Phospholipidmembranen wurde in der vorliegenden Arbeit die QMB-Technik eingesetzt.

6.2 Enzym-Substrat Wechselwirkungen

6.2.1 Erprobung geeigneter Beschichtungstechniken

Erste Arbeiten zur Untersuchung der Hydrolyse von DPPE* durch PL-A₂ mit Hilfe der QMB-Technik wurden von Okahata et.al [114] veröffentlicht in denen gezeigt wurde, daß es möglich ist, diese Reaktionen nachzuweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in Vorversuchen getestet werden, unter welchen Bedingungen (Beschichtungstechnik, Temperatur, Konzentration, Medium) diese enzymatischen Reaktionen detektierbar sind.

Zunächst wurden Untersuchungen an DPPC†-beschichteten Sensoren durchgeführt. Ungeordnete Beschichtungen wurden im Auftropfverfahren (Kapitel 4) hergestellt. Dieser Test war notwendig, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen PL-A₂ und Lipiden auszuschließen. Eine Adsorption bzw. die nachgelagerte hydrolytische Reaktion war bei diesen ungeordneten Strukturen nicht zu erwarten. In Abbildung 45 ist ein typischer Frequenzverlauf bei Zugabe von Enzymlösung (2,5 U/µl) dargestellt. Man erkennt, daß an diesen Oberflächen erwartungsgemäß keine Reaktionen stattfanden.

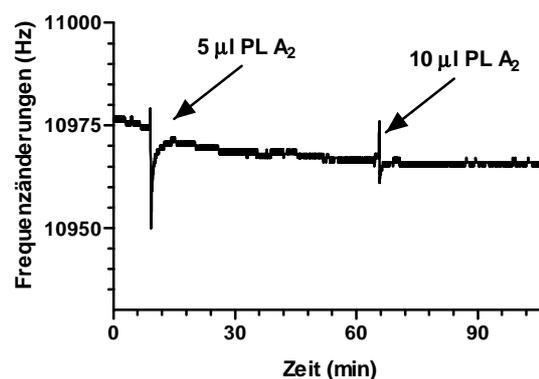


Abbildung 45: Frequenzverlauf bei der Wechselwirkung einer ungeordneten DPPC-Schicht mit PL-A₂

* DPPE - 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamin

† DPPC - 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin

Im folgenden wurden durch die Anwendung des SA-Verfahrens geordnete Phospholipidfilme hergestellt. Als Substrat wurde das Thiolipid II (zur Struktur Kapitel 9) eingesetzt. Aus Kontaktwinkeluntersuchungen ($\theta_{ADV} = 89,56^\circ$) war bekannt, daß sich hydrophobe Obeflächen ausbilden. Das bedeutet, daß sich im wesentlichen die Ketten der Lipide nach außen ordnen und die Kopfgruppen nicht für die Reaktion zur Verfügung stehen. Dennoch wurden Adsorptionen von PL-A₂ an Thiolipid modifizierten Oberflächen beobachtet (Frequenzänderungen: 89 ± 7 Hz). Es können an dieser Stelle keine Aussagen zum Mechanismus der Reaktionen getroffen werden. Wichtig war jedoch festzustellen, daß deutliche Unterschiede zwischen dem Reaktionsverhalten an kristallinen Thiolipidfilmen im Vergleich zu ungeordneten DPPC-Beschichtungen auftreten. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurden in weiteren Versuchen Enzymadsorptionen an trägerfixierten Doppelschichten untersucht. Zur Fixierung der Schichten eignet sich das in Kapitel 4 beschriebene Verfahren der Kopplung von SA und LB-Technik.

Zunächst konnten an diesen supramolekularen Lipidschichten keinerlei Adsorptionen beobachtet werden. Untersucht wurden sowohl DSPC* als auch DPPC beschichtete Schwingquarze bei Raumtemperatur. Die LB-Monoschichten wurden jeweils bei 30 mN/m, d.h. in der kondensierten Phase übertragen. Bei Temperaturerhöhung ändert sich die Fluidität der Membranen. Das sollte zu einer Verbesserung der molekularen Erkennung führen. Deshalb wurde in den folgenden Untersuchungen bei einer Temperatur von $40 \pm 2^\circ\text{C}^\dagger$ gearbeitet. Tatsächlich war es mit dem so modifizierten System möglich, die Ausbildung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen zu verfolgen. Frequenzdifferenzen von 80 Hz wurden bei der Adsorption des Enzyms gemessen.

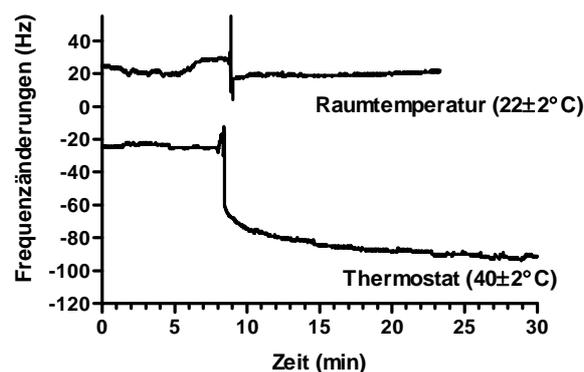


Abbildung 46: Bindung von PL-A₂ an trägerfixierte DPPC-Membranen bei erhöhter Temperatur im Vergleich zu Untersuchungen bei Raumtemperatur

Ausgehend von diesen Untersuchungen waren die Bedingungen für die nachfolgenden Messungen an Lecithinen vorgegeben. Einerseits war es notwendig, mit Hilfe der LB-Technik

* 1,2-Distearyl-sn-glycero-phosphatidylcholin

† Phasenübergangstemperatur von DPPC: $41,3^\circ\text{C}$

geordnete Strukturen zu erzeugen und andererseits sollten die Experimente bei erhöhter Temperatur stattfinden. Alle Messungen wurde bei 40°C im stationären Zustand durchgeführt. Nach Einbau der beschichteten Sensoren in die Apparatur wurde ca. 1 Stunde bis zum Erreichen der Frequenzstabilität gewartet. Anschließend wurden jeweils 5 µl Phospholipase A₂ (2,5 U/µl) injiziert. Die Frequenzänderungen wurden nach weiteren 30 Minuten registriert und in Einzelfällen über bis zu 12 Stunden verfolgt.

6.2.2 Strukturabhängigkeit von Enzym-Substrat Wechselwirkungen

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß bestimmte strukturelle Eigenschaften der Substrate notwendig für die molekulare Erkennung durch Phospholipase sind [173]. Man weiß daß PL-A₂ mittelständige Fettsäuren von Phosphatidylcholinen abspaltet. Desweiteren ist bekannt, daß Lecithine stereospezifisch hydrolysiert werden und daß Glycole ebenfalls mit PL-A₂ reagieren. In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide dargestellt [174]. Eingesetzt wurden unverzweigte, methylverzweigte und tetradecylverzweigte Phospholipide.

Tabelle 6: Strukturen der verwendeten Phospholipide

$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ \\ \text{HC} - \text{O} - \text{C}(\text{O}) - \text{R} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \text{P}(\text{O}) - \text{O} \cdot \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \cdot \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	
D- oder L- 1-C ₁₆ 2-C ₁₈ PC (1-Hexadecyl-2-octadecanoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin)	R= $-\text{C}_{17}\text{H}_{35}$
D- oder L- 1-C ₁₆ 2 (4C ₁)C ₁₈ PC (1-Hexadecyl-2-octadecanoyl(4-methyl)-sn-glycero-phosphatidylcholin)	R= $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{C}_{14}\text{H}_{29} \end{array}$
D- oder L- 1-C ₁₆ 2 (4C ₁₄)C ₁₈ PC (1-Hexadecyl-2-octadecanoyl(4-tetradecyl)-sn-glycero-phosphatidylcholin)	R= $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \nearrow \text{C}_{14}\text{H}_{29} \\ \searrow \text{C}_{14}\text{H}_{29} \end{array}$

Die Übertragung der Verbindungen (im folgenden PC genannt) auf den Träger erfolgte mittels LB-Technik bei Raumtemperatur und einem Lateraldruck von 30 mN/m. Die bei 20°C ermittelten Isothermen der C₁₄-verzweigten und C₁-verzweigten PC zeigten signifikante Phasenübergänge bei 5 mN/m (C₁₄) und bei 15 mN/m (C₁). Für unverzweigte PC konnten keine Phasenübergänge festgestellt werden. Den größten molekularen Platzbedarf haben C₁₄-verzweigte PC mit 0,61 nm² wohingegen sich die molekulare Fläche von unverzweigten (0,4

nm²) und methyl-verzweigten (0,37 nm²) PC kaum unterscheidet. Beim Übertragungsdruck von 30 mN/m befinden sich die Filme jeweils im festanalogen Bereich, d.h. es existieren überwiegend kristalline Domänen.

Mit Hilfe der QMB-Technik war es möglich, strukturbedingte Abhängigkeiten im Bindungsverhalten von Phospholipase aufzuzeigen. In Abbildung 47 sind die Frequenzänderungen bei Adsorption des Enzyms an lipidmodifizierten Schwingquarzen dargestellt.

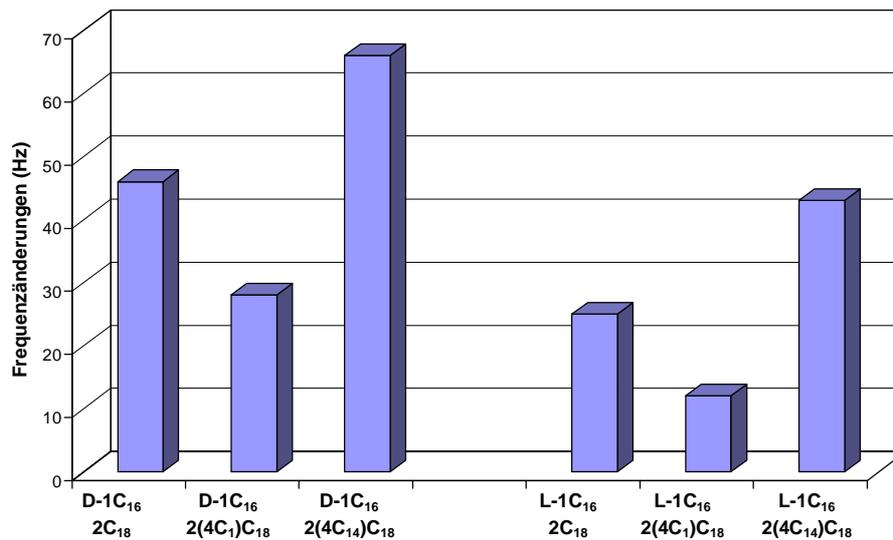


Abbildung 47: Frequenzänderungen bei Adsorption von PL-A₂ an trägerfixierte Phospholipide

Aus den Untersuchungen ergeben sich zunächst Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Enantiomere. Phospholipide mit D-Konfiguration haben demzufolge eine höhere Affinität zu PL-A₂ als ihre optischen Antipoden. Desweiteren konnten Unterschiede aufgrund der Substituenten in Position 2 demonstriert werden. Demzufolge finden starke Wechselwirkungen zwischen den C₁₄-verzweigten Verbindungen und PL-A₂ statt. Deutlich geringere Affinitäten besitzen C₁-verzweigte und unverzweigte Lipide. Die Verhältnisse der Frequenzverschiebungen der Phospholipide mit L-Konfiguration sind mit denen der D-Konfiguration identisch [175].

Die Quantifizierung der Adsorptionen von PL-A₂ kann nach Sauerbrey [63] anhand der Massebeladung der Sensoren erfolgen. Die Frequenzänderung bei Anlagerung von PL-A₂ an C₁₄-verzweigte PC (D-Form) von 66 Hz entspricht einer Masse von 82 ng. Es ergeben sich Differenzierungen der Massenlagerungen für die D-Formen im Verhältnis von C₁₄-verzweigten/C₁-verzweigten/unverzweigten PC wie 1:0,4:0,7 und für die L-Formen im Verhältnis 1:0,3:0,6. Desweiteren kann das Verhältnis der Wechselwirkungen an D- und L-Formen quantifiziert werden. Die Adsorption von PL-A₂ ist demzufolge bei den L-Formen um 46% gegenüber den D-Formen reduziert.

6.3 Enzymatische Hydrolyse von Phospholipiden

6.3.1 Titration der Spaltprodukte mit der pH-stat Methode

Die QMB-Untersuchungen zur Adsorption von PL-A₂ an trägerfixierten Phospholipiden wurden parallel mit der pH-stat Methode validiert. Bei dieser Methode wird der Anteil der bei der enzymatischen Reaktion entstandenen freien Fettsäuren titrimetrisch bestimmt. Die Substratlipide wurden als vesikuläre Systeme [176] eingesetzt. Vesikelpräparationen eignen sich aufgrund der unter Normalbedingungen annähernden Michaelis-Menten-Kinetik ihrer Hydrolyse sowohl für Studien zur Reaktionskinetik als auch für Aktivitätsmessungen der PL-A₂ [177] (Vesikelpräparation siehe Kapitel 9).

Diese Untersuchungen sollten bei der Existenz zweier unabhängiger Vesikelpopulationen (L-DPPC Vesikel und Vesikel aus synthetischen Phospholipiden (PC)), die um die Bindung von PL-A₂ konkurrieren, qualitative Aussagen zur Substratspezifität liefern. Der Einfluß der PC auf die enzymatische Aktivität äußert sich in der geringeren Freisetzung von Fettsäuren und damit im niedrigeren KOH-Verbrauch. In Abbildung 48 ist der Verlauf der Hydrolyse von Phospholipiden für reines L-DPPC und für Gemische aus PC und L-DPPC anhand des Verbrauchs von KOH dargestellt.

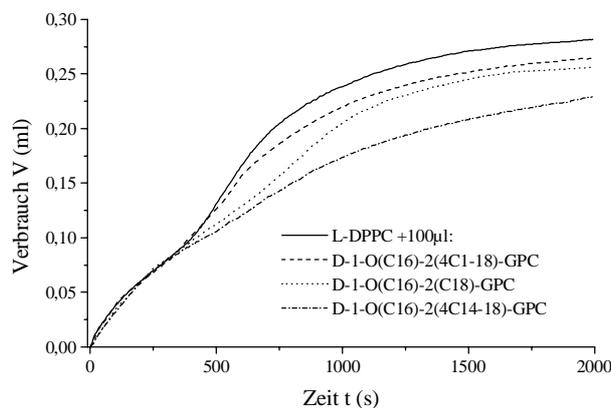


Abbildung 48: KOH- Verbrauch der L-DPPC Hydrolyse unter Einfluß von D-Lipiden

Man erkennt hier die gleiche Abstufung, die bei Adsorptionsexperimenten an QMB-Sensoroberflächen (6.2.2) gefunden wurde. Anhand des KOH-Verbrauchs läßt sich folgende Reihenfolge der Beeinflussung der Hydrolyseaktivität feststellen: C₁₄-verzweigt > unverzweigt > C₁-verzweigt.

Weitere Untersuchungen fanden mit den enantiomeren Verbindungen statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.

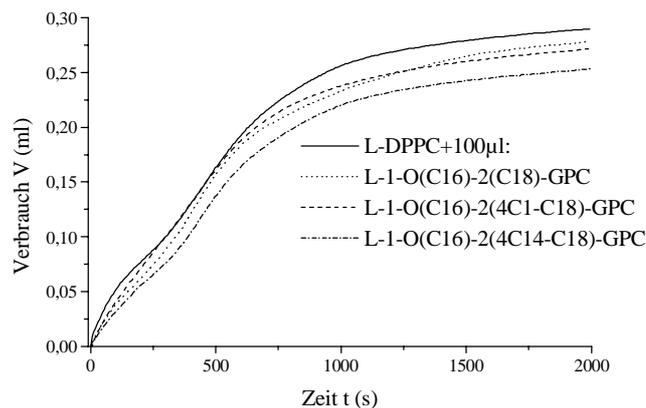


Abbildung 49: KOH-Verbrauch der L-DPPC Hydrolyse unter Einfluß von L-Lipiden

Bei den L-Formen hatte ebenfalls die C₁₄-verzweigte Verbindung den größten Einfluß auf die Hydrolyseaktivität des Enzyms. Die C₁-verzweigte und die unverzweigte Verbindung hatten beide geringeren Einfluß auf die Hydrolyse. Allgemein ist die Beeinflussung der Hydrolyse durch Vesikel, bestehend aus L-DPPC, niedriger als bei Wechselwirkung mit D-DPPC Vesikeln.

Unter Voraussetzung der Richtigkeit unserer These, daß die Bindungsaffinität des Enzyms zu den einzelnen Lipiden mit deren Einfluß auf die Hydrolyse korreliert, kann man aus den vorgestellten Ergebnissen schließen, daß die Bindungsstärke des Enzyms in der Reihenfolge C₁-verzweigt < unverzweigt < C₁₄-verzweigt zunimmt. Dieser Befund stimmt mit den QMB-Untersuchungen überein. Die Aussage läßt sich erweitern, denn bei beiden Versuchsreihen wurden signifikante Unterschiede im Verhalten der D- und L-Formen gefunden. Demzufolge besitzen die L-Formen generell geringere Bindungsaffinitäten an PL-A₂ als die D-Formen.

6.3.2 Massensensitive Untersuchungen an Multischichten

Die in Kapitel 6.2 dargestellten Reaktionen dienen zum Nachweis der Ausbildung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen. Tatsächlich werden diese Reaktionen jedoch durch die nachfolgende hydrolytische Spaltung der trägerfixierten Phospholipide überlagert. Die Hydrolyse sollte zur Desorption der Lipidschichten, d.h. zur Abnahme der Masse auf der Sensoroberfläche führen. Dieses Reaktionsverhalten wurde bereits 1992 von Okahata et.al [114] an DPPE* Multischichten nachgewiesen. Im Widerspruch dazu konnte in den vorhergehenden Versuchen keine Frequenzerhöhung festgestellt werden. Ursache könnten unspezifische Haftvorgänge der Fettsäuren an der hydrophoben Alkanthiolmatrix sein, wodurch Desorptionen verhindert werden. Aus diesem Grund wurden in Analogie zu den Arbeiten von Okahata et.al Versuche an Multischichten (Alkanthiol + drei LB-Filme) durchgeführt. Die LB-Filme wurden anhand der Übertragungsverhältnisse (0,97 bis 1,05) und

* 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamin

der Massenbilanz charakterisiert. Dabei wurden Frequenzänderungen von $420 \text{ Hz} \pm 135 \text{ Hz}$ ermittelt. Das entspricht nach Sauerbrey einer Massebeladung von 522 ng (80% d. Theorie). Die hohen Standardabweichungen der Frequenzänderungen (32%) lassen den Schluß zu, daß die Homogenität der Multischichten niedriger ist als bei den bisher verwendeten Doppelschichten.

Bei der Durchführung der QMB-Experimente an Lipidmultischichten konnten keine eindeutigen Adsorptionen beobachtet werden. Studien unter identischen experimentellen Bedingungen ergaben sowohl Adsorptions- als auch Desorptionsprozesse. Die wesentliche Ursache für die Streuung der Meßwerte ist der geringere Ordnungszustand der Lipide, was auf die Morphologie der Sensoroberfläche zurückzuführen ist. Eine weitere Ursache ist die Überlagerung von Ablösen und Nichtablösen der während der Hydrolyse gebildeten freien Fettsäuren. Wahrscheinlich ist die Affinität der Fettsäuren zu der Hexadecanthiolmonoschicht verantwortlich für partielle, unspezifische Adsorptionen (Abbildung 50).

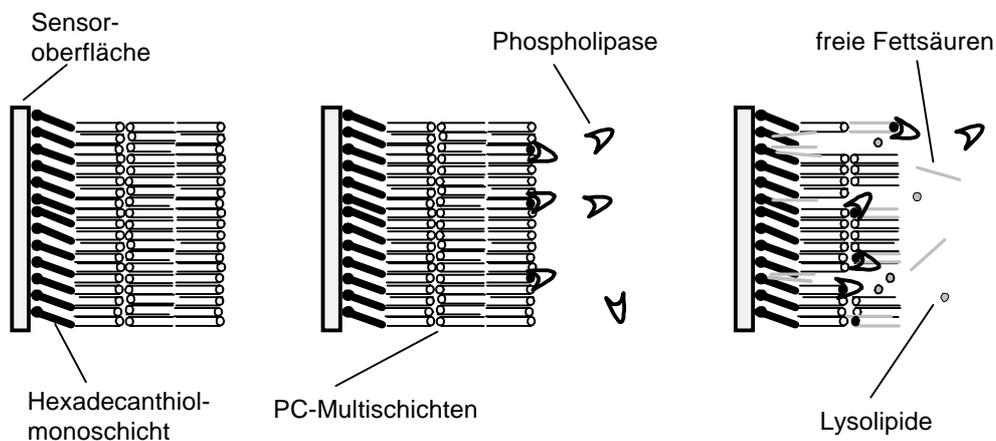


Abbildung 50: Modell zur Adsorption von Phospholipase an PC-Multischichten und deren anschließende Hydrolyse unter Einbau von Fettsäuren in Hexadecanthiolmonoschichten

Trotz dieser Einschränkungen ist es prinzipiell möglich, mit der QMB-Technik auch die Hydrolyse der Phospholipide zu verfolgen. In Abbildung 51 ist an einem Beispiel der Frequenzverlauf bei enzymatischer Reaktion an DPPC Multischichten dargestellt. Nach Zugabe des Enzyms kommt es zunächst zur Adsorption der Lipase (Absinken der Frequenz) und anschließend im Verlauf mehrerer Stunden zur Desorption der Lipide (Frequenzanstieg). Aufgrund der Streuung der Meßwerte können zum Verlauf der enzymatischen Hydrolyse der Phospholipide jedoch keine quantitativen Aussagen getroffen werden.

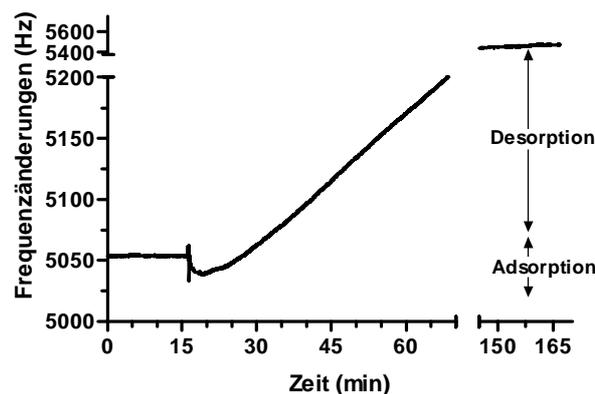


Abbildung 51: Hydrolyse von L-DPPC Multischichten durch enzymatische Reaktion mit Phospholipase A₂

6.4 Zusammenfassung

Ziel der enzymatischen Untersuchungen zur Hydrolyse trägerfixierter Phospholipide war der Nachweis, daß bestimmte Strukturmerkmale für die Ausbildung der Enzym-Substrat Bindungen verantwortlich sind. Um mit der QMB-Technik derartige Bindungsreaktionen an Sensoroberflächen nachweisen zu können, sind Beschichtungstechniken anzuwenden, mit deren Hilfe zweidimensional geordnete Lipidstrukturen an Sensoroberflächen erzeugt werden können. Es wurde gezeigt, daß Schwefelderivate der Phospholipide im SA-Verfahren geeignete Strukturen bilden und daß an so modifizierten Sensoroberflächen Wechselwirkungen stattfinden, die mit der QMB-Technik nachweisbar sind. Um verschiedene PC (Tabelle 6), die nicht mit Schwefel derivatisiert sind auf dem Sensor fixieren zu können, wurde die LB-Technik angewandt. Im Gegensatz zu den SA-Schichten konnten in diesem Fall bei Raumtemperatur keine Wechselwirkungen festgestellt werden. Erst bei Temperaturerhöhung und der damit verbundenen Änderung der Fluidität der Membranen wurden auch hier Frequenzerniedrigungen, hervorgerufen durch die Adsorption des Enzyms, festgestellt.

In Abhängigkeit von der Verzweigung der mittelständigen Fettsäuren konnten charakteristische Adsorptionen festgestellt werden. Die Untersuchungen fanden an sechs Verbindungen statt, deren mittelständige Fettsäure unverzweigt, C₁-verzweigt und C₁₄-verzweigt waren. Untersucht wurden jeweils die L- und D-Formen der Verbindungen. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Affinität des Enzyms zu den PC in der Reihenfolge C₁₄-verzweigt > unverzweigt > C₁-verzweigt abnimmt. Außerdem reagieren die L-Formen deutlich weniger als die D-Formen der PC.

Der Nachweis der hydrolytisch freigesetzten Fettsäuren durch Titration mit KOH (pH-stat Methode) erbrachte vergleichbare Ergebnisse wie die vorhergehenden QMB-Untersuchungen. Es wurden bei den L-Formen geringere Bindungsaffinitäten festgestellt als bei den D-Formen.

Außerdem konnte auch hier die charakteristische Abstufung der Bindungsstärken aufgrund der Verzweigung der mittelständigen Fettsäuren bestätigt werden.

Ziel des letzten Abschnitts dieser Studie war es, die Hydrolyse der PC mit der QMB-Technik zu verfolgen. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen auf einen Zeitraum von mehreren Stunden ausgedehnt. An Doppelschichten waren nach maximal 30 min. keine weiteren Frequenzänderungen feststellbar. Bei Untersuchungen an Multischichten (Hexadecanthiol und drei LB-Filme) wurden teilweise Desorptionen des Films beobachtet. Generell läßt sich sagen, daß die Desorption der freigesetzten Fettsäuren nicht statistisch nachvollziehbar war. Ursache ist wahrscheinlich die Affinität der Fettsäuren zu der Hexadecanthiolmonoschicht, hervorgerufen durch hydrophobe Wechselwirkungen. Zusätzliche Probleme traten bei Multischichten wegen der Morphologie der Sensoroberfläche auf. Die übertragenen Filme haben strukturelle Defekte, die eine Anlagerung der Phospholipase verhindern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die QMB-Technik eine wertvolle Ergänzung der herkömmlichen Methoden zur Untersuchung der hydrolytischen Wirkung von PL-A₂ darstellt. Mit diesem Verfahren konnte die Adsorption von Phospholipase an Modellmembranen quantifiziert werden. Die Ergebnisse korrelieren mit titrimetrischen Bestimmungen der freien Fettsäuren. Zur Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von Phospholipiden kann das System nur eingeschränkt verwendet werden, weil durch den Einbau von freien Fettsäuren in die Lipidschichten keine definierten Massedesorptionen stattfinden.

7 Glycolipidmatrices zum Nachweis von Cholera toxin

7.1 Zielstellung

Im folgenden Abschnitt werden Untersuchungen zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Gangliosiden und Toxin vorgestellt. Ganglioside sind Glycolipide, die vor allem im Nervengewebe als Membranbestandteile auftreten. Bestimmte Ganglioside sind Rezeptoren für Toxine [178] oder Viren [179]. Sie sind aus einem oder mehreren Sialinsäuregruppen und einem ceramidischen Rest aufgebaut. Über den lipophilen Ceramidrest werden Ganglioside in Lipiddoppelschichten verankert. Die Monosaccharideinheiten stehen in Kontakt mit der Umgebung der Zellen und sind verantwortlich für die molekulare Erkennung von Liganden. In Abbildung 52 ist die Struktur des Gangliosids G_{M1} dargestellt.

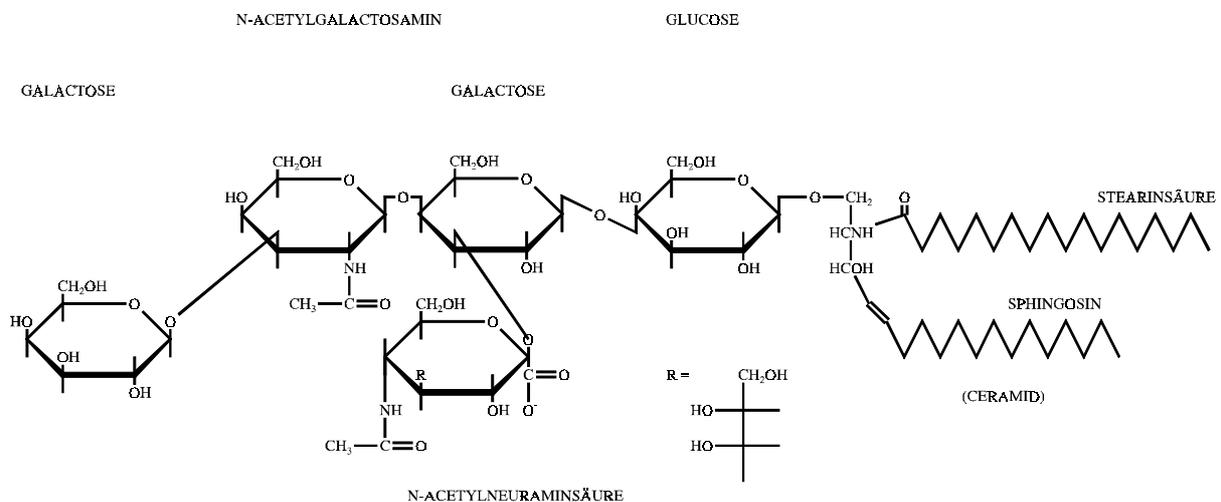


Abbildung 52: Struktur des Monosialogangliosids G_{M1}

Wechselwirkungen zwischen Gangliosiden und Cholera toxin (Cholera toxin) sind bereits sehr gut untersucht [180]. Cholera toxin (CT) wird von dem Bakterium *Vibrio cholerae* produziert. Es ist ein kugelförmiges Protein mit einer Molmasse von 84 kDa, bestehend aus zwei Untereinheiten der stöchiometrischen Zusammensetzung AB_5 . Die nicht toxische CT (β -Untereinheit) hat eine molekulare Masse von 11,6 kDa und initiiert die Bindung an Zellen (bzw. Ganglioside). Im Gegensatz dazu ist die CT (α -Untereinheit) ($M = 27$ kDa) für die Aktivierung der Adenylatcyclase und damit für die übermäßige Produktion von $cAMP^*$ verantwortlich. Der Effekt der Freisetzung verdauungsfördernder Flüssigkeiten im Darm, ist das wesentliche Symptom der Cholera.

Heute weiß man, daß die Kohlenhydratstrukturen an der Kopfgruppe von G_{M1} für die spezifische Erkennung von CT verantwortlich sind [181]. Seit 1994 ist die Röntgenstruktur des G_{M1}/CT – Komplexes bekannt [182]. Mit Hilfe der vorliegenden Studie sollte getestet werden, ob die prinzipielle Möglichkeit des Nachweises von Wechselwirkungen zwischen

trägerfixierten Gangliosiden und Cholera toxin mit der QMB-Technik besteht. Desweiteren sollte das Sorptionsverhalten von CT quantitativ und kinetisch beschrieben werden. Zusätzlich wurden Experimente zur spezifischen Adhäsion von anti-CT Antikörpern an CT-modifizierten Sensoroberflächen durchgeführt.

7.2 Adsorption von Cholera toxin an modifizierte Sensoroberflächen

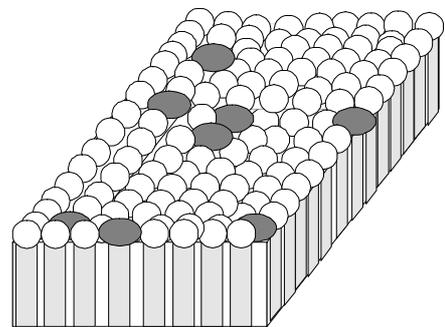
7.2.1 Durchführung der Experimente

Für die Untersuchungen wurden lipidbeschichtete Schwingquarze verwendet (Kapitel 4). Durch den Einbau der Ganglioside in eine trägerfixierte DSPC[†]-Matrix wurden stabile und hochgeordnete Sensoroberflächen erzeugt, mit deren Hilfe es möglich war, Cholera toxin (CT) nachzuweisen. Die Kopfgruppen der Ganglioside sollten dabei (als reaktives Zentrum) aus der DSPC-Matrix herausragen.

Aus technologischen Gründen wurden die Messungen nicht im Durchflußbetrieb durchgeführt. Nach Zugabe des Analyten zum stationären System wurde die Meßzelle (miniaturisierte Zelle, Kapitel 2) mit dem Medium (Phosphatpuffer, pH 7) gespült, um unspezifisch gebundenes Material zu entfernen. Die angegebenen Frequenzänderungen beziehen sich auf die Differenz zwischen der Basisfrequenz (vor der Analytzugabe) und der nach Injektion und anschließendem Spülvorgang ermittelten Frequenz.

7.2.2 Optimierung der Adsorption an einer G_{M1}/Phospholipid-Matrix

Das erste Problem bei QMB-Untersuchungen zur Adsorption von CT war die Entwicklung einer optimalen Beschichtungstechnik, um eine maximale Sensorantwort zu erhalten. Zunächst war klar, daß die Wechselwirkungen an LB-Filmen untersucht werden sollten, weil durch die reproduzierbaren Ordnungszustände optimale Bedingungen zur Bildung des G_{M1}/Gangliosid Komplexes gegeben sind. Allerdings bilden Ganglioside keine stabilen Langmuir-Filme an der Wasser-Luft Grenzfläche. Sie liegen im wesentlichen in der flüssig-analogen Phase vor. Aus diesem Grund wurde eine DSPC-Matrix verwendet, die diese Filme stabilisiert. Bei der Kompression des Lipidfilms mit einer Filmwaage bilden sich innerhalb der kristallinen Domänen geordnete Glycolipidstrukturen aus (Abbildung 53).



Die Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen von CT mit trägerfixierten DSPC/Gangliosid(G_{M1})-Filmen, bei verschiedenen G_{M1}-Anteilen wurden

Abbildung 53: Schematische Darstellung einer gemischten LB-Schicht, bestehend aus Phospholipiden und Glycolipiden (dunkel)

* cAMP – cycl. Adenosin-3',5'-monophosphat

† DSPC – 1,2-Distearyl-sn-glycero-phosphatidylcholin

untersucht. Es wurde das Adsorptionsverhalten an reinen DSPC-Filmen, an reinen G_{M1} -Filmen, an 10%igen G_{M1} und an 30%igen G_{M1} -Filmen ermittelt. Wie erwartet zeigten reine DSPC-Filme keine Wechselwirkungen mit CT. Reine G_{M1} -Filme gaben, wahrscheinlich wegen des geringen Ordnungszustandes, ebenfalls nur geringe Resonanzantworten. Ein Maximum der Verschiebung der Resonanzfrequenz (ca. 60 Hz) wurde bei Verwendung von DSPC-Filmen mit einem Gehalt von 10% G_{M1} beobachtet. In Abbildung 54 ist das typische Resonanzverhalten von QMB-Sensoren bei Zugabe von CT dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die signifikante Frequenzänderung des mit 10% G_{M1} beschichteten Quarzes.

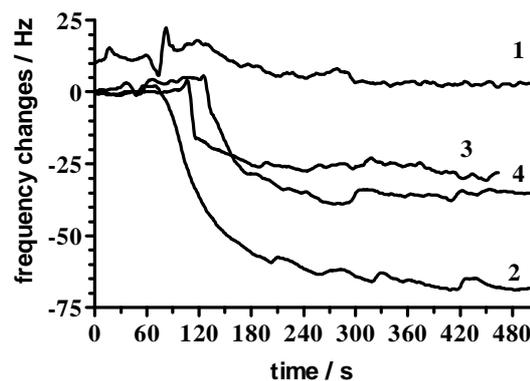


Abbildung 54: Frequenzänderungen bei Zugabe von Cholera toxin (β -Untereinheit). (1 - reiner DSPC-Film; 2 - 10% G_{M1} ; 3 - 30% G_{M1} ; 4 - 100% G_{M1})

Bei allen weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden Beschichtungen mit einem Gehalt von 10% G_{M1} verwendet.

7.2.3 Adsorptionsverhalten an verschiedenen Gangliosidfraktionen

Im zweiten Abschnitt der Studie wurden die Wechselwirkungen zwischen CT (β -Untereinheit) und vier verschiedenen Gangliosidfraktionen untersucht. Die Gangliosidfraktionen G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} und G_{T1b} , schematisch dargestellt in Abbildung 55, wurden unter Verwendung der LB-Technik auf dem Träger fixiert.

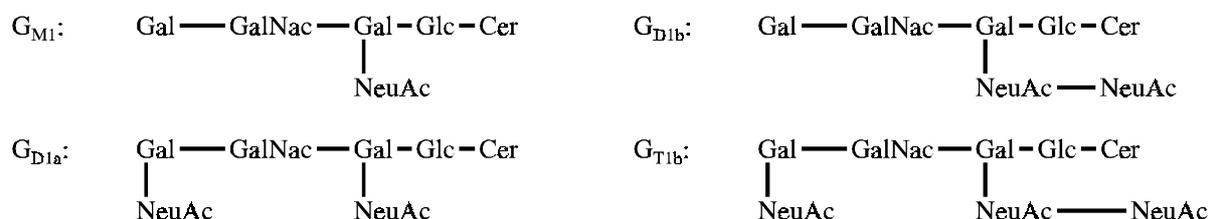


Abbildung 55: Strukturen der verwendeten Ganglioside. (Abkürzungen: Cer: Ceramid; Gal: Galactose; GalNac: N-Acetylgalctosamin; Glc: Glucose; NeuAc: N-Acetylneuraminsäure)

Die Position des Sialinsäurerestes (NeuAc) spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Komplexe mit CT. Aus früheren Untersuchungen mit der SPR-Technik* [183] war bekannt, daß die einzelnen Ganglioside spezifisch mit CT reagieren. Mit massensensitiven Methoden wurde bislang lediglich das Bindungsverhalten von Tetanustoxin an Glycolipidmatrices untersucht [184]. In der vorliegenden Studie konnte das Bindungsverhalten von CT an trägerfixierte Gangliosidfraktionen quantifiziert werden. Die Wechselwirkungen finden innerhalb kurzer Zeiträume statt (Sättigung nach ca. 10 min.). Eine Frequenzänderung von 60 Hz bei der Wechselwirkung zwischen CT und G_{M1} (stärkste Wechselwirkung der untersuchten Ganglioside) entspricht nach Sauerbrey [63] einer Massenbeladung von 75 ng. Da aus den Filmwaageuntersuchungen die molekulare Fläche der Ganglioside ($0,84 \text{ nm}^2$) und der Platzbedarf von DSPC ($0,43 \text{ nm}^2$) bekannt ist, läßt sich die Anzahl der theoretisch adsorbierten Moleküle abschätzen. Aus den Berechnungen ergibt sich eine theoretische Massenbeladung 64 ng (51 Hz).

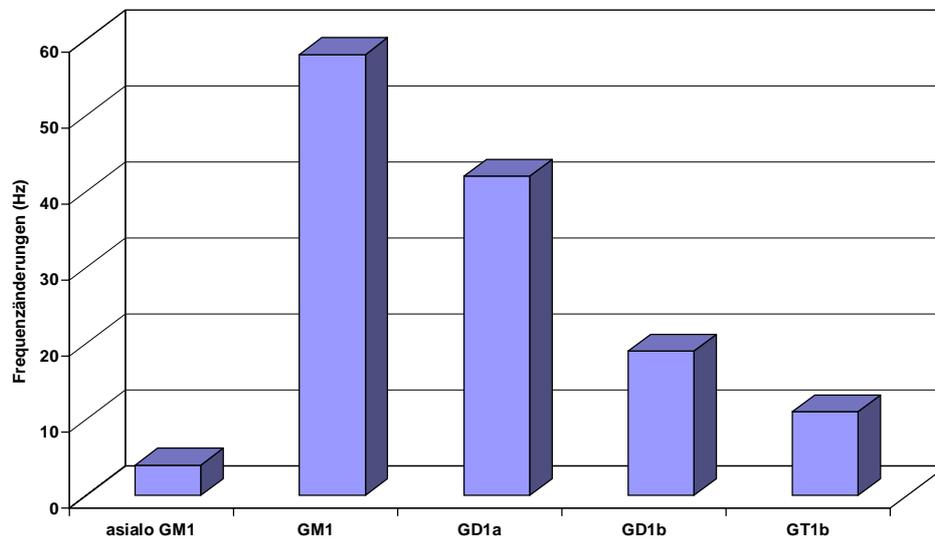


Abbildung 56: Frequenzverlauf und Zusammenfassung der Frequenzänderungen bei der Wechselwirkung zwischen trägerfixierten Gangliosiden und Cholera toxin (β -Untereinheit).

In der Abbildung 56 ist die Spezifität der Wechselwirkungen gezeigt. Wie dargestellt erhält man bei der Fraktion G_{M1} ein Maximum der Resonanzantwort, wohingegen bei Untersuchungen mit der Fraktion G_{T1b} keine signifikanten Wechselwirkungen festgestellt wurden. Die Studie zeigt, daß CT (β -Untereinheit) an Ganglioside bevorzugt in der Reihenfolge $G_{M1} > G_{D1a} > G_{D1b} > G_{T1b}$ bindet. Als Referenz wurde asialo- G_{M1} verwendet, bei dem keine Wechselwirkungen festgestellt wurden.

* SPR-Surface Plasmon Resonance – eine optische Methode (siehe Kapitel 1)

7.2.4 Wechselwirkungen mit G_{M1} - und CT- Antikörpern

Um das Resonanzverhalten der Quarzmikrowaage bei Adsorption größerer Moleküle (z.B. Antikörper) an Sensoroberflächen zu untersuchen, wurden zunächst Experimente mit anti- G_{M1} Antikörpern durchgeführt. Überraschenderweise konnten Adsorptionen der Antikörper sowohl an G_{M1} -dotierten Sensoroberflächen als auch an reinen Phospholipidmembranen festgestellt werden. Unterschiede traten allerdings im Verlauf der Reaktion auf (Abbildung 57).

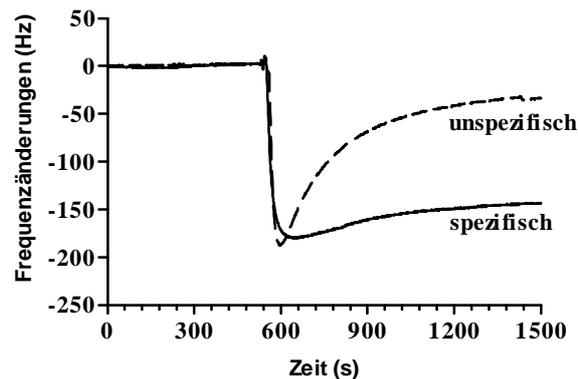


Abbildung 57: Änderung der Resonanzfrequenz bei Zugabe von anti G_{M1} -Antikörpern. Die gestrichelte Linie zeigt die unspezifische Wechselwirkung mit einer Phospholipidmatrix, in der zweiten Kurve wird die spezifische Adsorption an einer G_{M1} -modifizierten Lipidmatrix dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß nach der Abnahme der Frequenz (Massezunahme) bei Adsorptionen an einer Phospholipidmatrix die unspezifisch fixierten Antikörper desorbieren (Frequenzerhöhung). Im Gegensatz dazu wurden bei Experimenten mit G_{M1} -beschichteten Sensoren stabile Adsorptionen ohne deutliche Desorptionsprozesse beobachtet. Diese Prozesse wurden im stationären Zustand verfolgt. Wenn man nach dem Erreichen der Frequenzstabilität (ca. 30 min), die Meßzelle spült, erhält man statistisch auswertbare Frequenzdifferenzen. Vergleicht man diese Frequenzänderungen werden die Unterschiede zwischen spezifischer und unspezifischer Adsorption bestätigt. Nach dem Spülen wurden Frequenzänderungen von a : (bei spezifischer Adsorption an G_{M1} -Membranen) 81 Hz und b : (bei unspezifischer Adsorption) 20 Hz ermittelt.

Im letzten Abschnitt werden Experimente zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CT und anti-CT Antikörpern vorgestellt. Dazu wurde Cholera toxin zunächst, wie in Kapitel 7.2.3 beschrieben an G_{M1} -modifizierten Sensoroberflächen fixiert. In einem zweiten Schritt („Huckepack“) adsorbiert der spezifische Antikörper. Als Blindtest wurden Wechselwirkungen der Antikörper mit G_{M1} -modifizierten Sensoren, die nicht mit CT behandelt wurden durchgeführt.

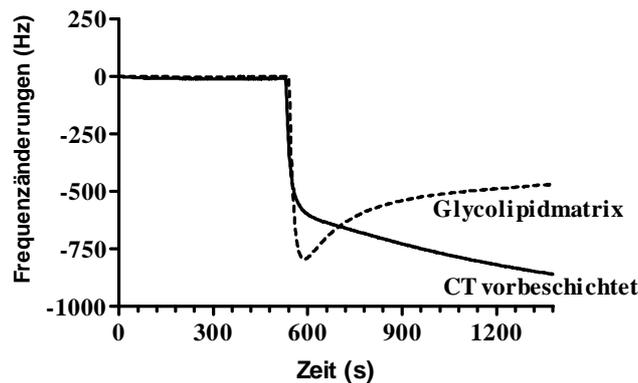


Abbildung 58: Frequenzänderungen nach Zugabe von anti-CT Antikörpern bei einem CT vorbeschichteten Schwingquarzes im Vergleich zu einem nicht mit CT behandelten Quarz (Glycolipidmatrix)

Abbildung 58 zeigt die Frequenzverschiebung von zwei Schwingquarzen. Der erste war mit einer G_{MI} enthaltenden Doppelschicht modifiziert und der andere Quarz war mit der gleichen Beschichtung versehen hat aber zusätzlich noch mit CT (β -Untereinheit) reagiert hat.

Wiederum wurden sowohl spezifische als auch unspezifische Adsorptionen festgestellt, wobei nur die mit CT vorbehandelten Sensoren stabile Bindungen mit den Antikörpern ausgebildet haben. Bei Verwendung reiner Glycolipidmatrices fanden Desorptionsprozesse statt, die durch den Frequenzanstieg nachgewiesen werden konnten. Nach Einstellen des Gleichgewichts (Frequenzstabilität nach ca. 30 min) wurden die Meßzellen gespült und Frequenzänderungen gemessen. Die ermittelten Frequenzdifferenzen von 746 Hz (vorbehandelt mit CT) im Vergleich zu 249 Hz (Glycolipidmatrix) lassen den Schluß zu, daß die spezifische Wechselwirkung zwischen CT (β -Untereinheit) und anti-CT Antikörpern ungefähr dreimal größer ist als die unspezifische Adsorption der Proteine an Lipiddoppelschichten.

7.3 Zusammenfassung

Die vorgelegte Studie zeigt eine Möglichkeit, um Adsorptionen von Gangliosid modifizierten Sensoren zu quantifizieren. Schwerpunkt war zunächst die Entwicklung einer geeigneten Beschichtung für derartige Untersuchungen. Darauf aufbauend konnten spezifische Toxinadsorptionen und schließlich auch Proteinadsorptionen in Realzeit verfolgt werden.

Im Hinblick auf die in Abbildung 56 zusammengefaßten Ergebnisse der Adsorption von CT (β -Untereinheit) an Ganglioside konnten die Wechselwirkungen in Abhängigkeit von der verwendeten Gangliosidfraktion qualitativ verglichen werden. Die hier ermittelte Sequenz der Affinität der Ganglioside stimmt mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen (SPR-Verfahren) überein [25]. Wenn man die maximal ermittelten Wechselwirkungen zwischen Cholera toxin und G_{MI} als 100% annimmt, lassen sich die Affinitäten der restlichen Gangliosidfraktionen vergleichen. Demzufolge hätte G_{D1a} eine Bindungsaffinität von 72%,

G_{D1b} von 33% und G_{T1b} von lediglich 19% der Affinität der Fraktion G_{M1} . Weiterhin war es möglich, den zeitlichen Verlauf der Reaktionen zu verfolgen. Im Vergleich zu den bereits bekannten Untersuchungen an Lipidsystemen (Kapitel 6) oder bei enzymatischen Reaktionen (Kapitel 7) fanden die hier untersuchten Wechselwirkungen in deutlich kürzerer Zeit statt.

Abschließend wurden Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Proteinen (Antikörper) durchgeführt. Es konnten vergleichende Studien zwischen spezifischen und unspezifischen Adsorptionsprozessen durchgeführt werden. Daraus geht hervor, daß zwischen Proteinen und den verwendeten Modellmembranen schwache zwischenmolekulare Wechselwirkungen existieren. Deutlich lassen sich diese unspezifischen Wechselwirkungen jedoch von spezifischen Antigen-Antikörper Wechselwirkungen unterscheiden. Anhand der Massenbilanz der an der Sensoroberfläche nach der Einwirkung von Scherkräften (Spülen) adsorbierten Substanz lassen sich reproduzierbar (Standardabweichungen 10-15%) spezifische und unspezifische Bindungsanteile differenzieren.

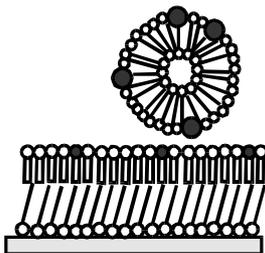
8 Adsorptionsverhalten supramolekularer Lipidsysteme

8.1 Sorptionsverhalten lectingekoppelter Liposomen

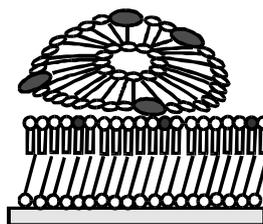
8.1.1 Zielstellung

Wechselwirkungen kohlenhydratbindender Proteine (Lectine) mit spezifischen Liganden (Monosaccharide) sind von Bedeutung für viele physiologische Prozesse. Zum Beispiel sind Wechselwirkungen zwischen sialyl-Lewis X Gruppen und Selectinen an Zelloberflächen die Ursache der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [185, 186]. Aufgrund der komplexen und ineinandergreifenden Mechanismen der dabei stattfindenden Adhäsionsprozesse ist es schwierig, die molekularen Einzelreaktionen der Selectin-Kohlenhydrat-Interaktionen separat zu untersuchen. Deshalb wurden Modellsysteme entwickelt, bei denen mit modifizierten Liposomen diese spezifischen Adhäsionsprozesse an Modellmembranen simuliert werden konnten [189]. Die dazu eingesetzten Liposomen wurden mit dem kohlenhydratbindenden Protein Concanavalin A (ConA) gekoppelt. ConA wurde ausgewählt, weil es das am intensivsten untersuchte Protein aus der Familie der Lektine ist. Seine Kristallstruktur ist ebenso wie die wesentlichsten Bindungseigenschaften bekannt [187]. In Abbildung 59 ist das Adhäsionsmodell nach Bendas et. al skizziert. Dementsprechend sollte es nach der Bindung der Vesikel, aufgrund von Lectin-Kohlenhydrat Interaktionen, zu einer Deformation der Vesikel kommen, die schließlich zur Fusion der Vesikelmembran an der trägerfixierten Matrix führt. Zum quantitativen Nachweis dieser Adhäsionsvorgänge an Modellsystemen hat sich die QMB-Technik als geeignetes Instrument erwiesen.

1. Molekulare Erkennung



2. Deformation der Vesikel



3. Fusion

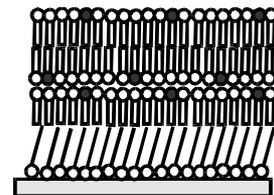


Abbildung 59: Modell der Fusion von Liposomen mit Modellmembranen nach Bendas et. al [189]

Ziel der Untersuchungen war es zu überprüfen, ob die rezeptorvermittelte Adhäsion von Liposomen an glycolipidbeschichteten Quarzoberflächen quantifizierbar ist, um daraus Rückschlüsse auf die Anteile der unspezifischen Interaktionen bei der Zelladhäsion ziehen zu können. Desweiteren sollte das Modell modifiziert werden, um den Anteil unspezifischer Interaktionen zu reduzieren.

8.1.2 Herstellung von Liposomen

Als Liposomen werden sphärisch in sich geschlossene Vesikel bezeichnet, die von einer oder mehreren Lipiddoppelschichten begrenzt werden und in deren Innern sich eine wässrige Phase befindet. Sie entstehen beim Schütteln oder durch Ultraschallbehandlung (mechanische Feinstverteilung) fester Phospholipide in Wasser mit anschließender Trennung an porösen Gelen. In die äußere Lipidschicht können Makromoleküle (z.B. ConA) eingebaut werden.

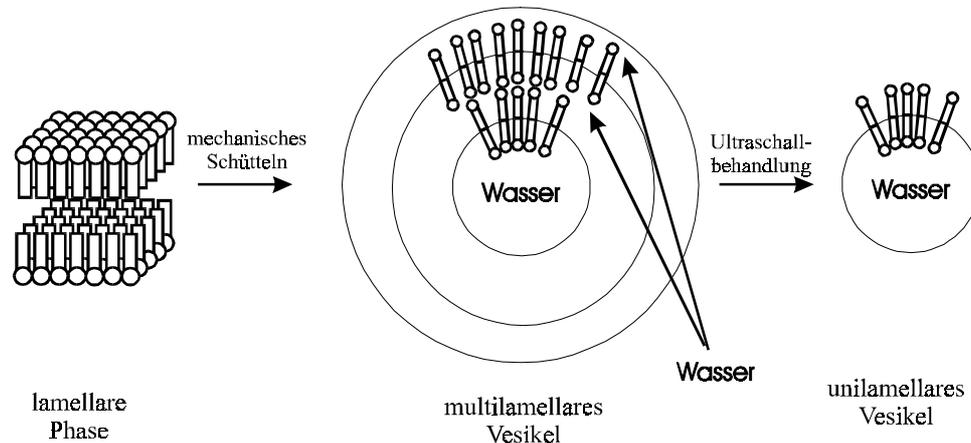


Abbildung 60: Bildung von unilamellaren Vesikeln durch Ultraschallbehandlung lamellarer Phospholipidstrukturen [188]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unilamellare Vesikel (LUV-large unilamellar vesicle) nach einem Verfahren von Bendas et.al [189] mit einem Vesikeldurchmesser von ca. 200 nm hergestellt. Die vesikulären Systeme setzen sich aus 50% Soja-Lecithin (SPC), 30% Cholesterin (Chol), 10% Ei-Phosphatidylglycerin und 10% N-Glutarylphosphatidylethanolamin (N-glut-PE) zusammen. Das Protein ConA wurde bei Raumtemperatur an den Lipidanker (N-glut-PE) nach Aktivierung mit dem Carbodiimid (EDC^{*}) gekoppelt.

Um die Liposomen hinsichtlich ihrer Elastizität zu verändern, wurden sie im Innern polymerisiert. Dazu stellt man Dispersionen der Lipide mit den entsprechenden Monomeren her. Als Monomere kamen Acrylamid und Acrylcholot zur Anwendung. Verwendet wurden 2,5 bzw. 5% Acrylamid (Acrylamid + MBA[†], (19:1)) und 10% Acrylcholot (Acryloxyethyltrimethylammoniumchlorid) mit verschiedenen Anteilen MBA. Riboflavin wurde als Radikalstarter eingesetzt. Nach der gelchromatographischen Trennung der äußeren Monomere kam es unter dem Einfluß von UV-Strahlung zur intravesikulären Polymerisation.

8.1.3 Adhäsion und Fusion von Liposomen an Schwingquarzen

In wässrigen Lösungen finden Wechselwirkungen zwischen Lipidsystemen und Grenzflächen (z.B. Sensoroberflächen) statt. Die Art der Wechselwirkungen kann durch die

* EDC – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

† MBA – N,N'-Methylenbis (acrylamid)

physikochemischen Eigenschaften der Grenzflächen und durch molekulare Erkennungsstrukturen beeinflusst werden. Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, trägerfixierte Modellmembranen zu entwickeln, an denen liposomale Systeme aufgrund spezifischer Wechselwirkungen (z.B. Kohlenhydrat/Lectin) adsorbiert werden und gleichzeitig unspezifische Reaktionen (Wechselwirkungen der Phospholipidkopfgruppen) zu minimieren. Verwendet wurden Schwingquarze mit reinen Goldelektroden, Hexadecanthiol-beschichtete Quarze und mit LB-Filmen belegte Sensoroberflächen. Durch Anwendung der QMB-Technik sollte es möglich sein, die Wechselwirkungen zwischen lectingekoppelten Liposomen und Modellmembranen (siehe Kapitel 4) unter verschiedenen Strömungsbedingungen zu quantifizieren.

Alle Untersuchungen wurden in Pufferlösungen (0,15 M Tris) bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durchgeführt. Für die Messungen wurde die in Kapitel 3 beschriebene, miniaturisierte Meßzelle verwendet, die es gestattet, sowohl unter Durchflußbedingungen als auch unter stationären Verhältnissen zu arbeiten.

Erste Untersuchungen wurden im Durchfluß (2 ml/min) an unbeschichteten Schwingquarzen durchgeführt (dynamische Methode). Beim Einspülen von ConA-gekoppelten Liposomen ($0,62 \mu\text{mol/ml}^*$) kommt es zum Absinken der Resonanzfrequenz um 285 Hz ($\pm 18\%$). Diese Frequenzänderungen werden durch Adsorption der Vesikel an die energiereiche Metalloberfläche hervorgerufen. Der Prozeß ist irreversibel, d.h. auch bei längerem Spülen der Meßzelle mit dem Puffer (bis zu 12 Stunden) stellte sich die ursprüngliche Resonanzfrequenz nicht wieder ein. Weitere Versuche wurden unter analogen Bedingungen mit hydrophobierten Sensoren durchgeführt. Dazu wurden die Quarze im SA-Verfahren (siehe Kapitel 4) mit Hexadecanthiol beschichtet (Kontaktwinkel: 97°) und anschließend deren Wechselwirkungen mit ConA-gekoppelten Liposomen ($0,62 \mu\text{mol/ml}$) untersucht. Es kam dabei nicht zu signifikanten Frequenzänderungen. Erwartungsgemäß gibt es keine Wechselwirkungen der vesikulären Lipidsysteme mit hydrophoben Matrices.

Aufbauend auf den bisher beschriebenen Untersuchungen, die sich mit der unspezifischen Adsorption der eingesetzten Vesikel beschäftigten, wurden im folgenden Messungen an trägerfixierten Doppelschichten mit Kohlenhydratstrukturen durchgeführt. Dazu wurden LB-Filme, bestehend aus DSPC und Mannosid III[†] (9:1), verwendet. An diese trägerfixierten Doppelschichten sollten, initiiert durch spezifische ConA/Mannoselipid-Wechselwirkungen, ConA-gekoppelte Liposomen binden. Unter Durchflußbedingungen wurden, analog den Untersuchungen an unbeschichteten Schwingquarzen, Frequenzänderungen um 300 Hz gemessen.

Die Durchführung der Untersuchungen in strömenden Medien bereitete wegen der Peristaltik der verwendeten Pumpen generelle technologische Probleme, die sich in der Frequenzstabilität und damit in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse niederschlugen. Aus

* bezogen auf den Proteinanteil

† Mannosid III: 1-O-(3,6,9-trioxapentacosyl)- α -D-mannopyranosid

diesem Grund wurden alle Untersuchungen unter analogen Bedingungen im stationären System wiederholt. Dabei wurden die Resonanzfrequenzen ausschließlich im stationären Zustand (kein Durchfluß) ermittelt und zwischen den „Phasen der Frequenzstabilisierung“ wurde die Meßzelle gespült. Mit dieser Vorgehensweise waren besser reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen als mit der dynamischen Methode.

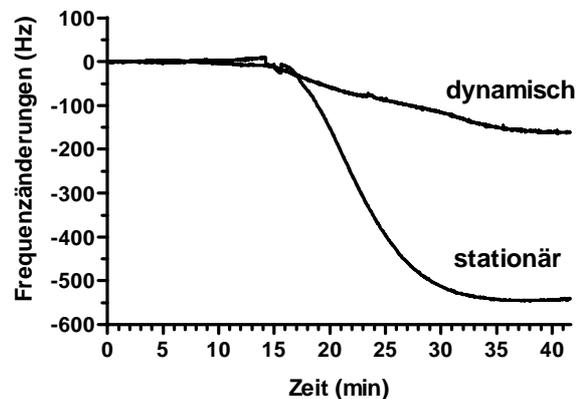


Abbildung 61: Frequenzverlauf bei Adsorption ConA-gekoppelter Liposomen an Modellmembranen, Vergleich zwischen dynamischen und stationären Bedingungen

Zunächst war festzustellen, daß in stationären Systemen, auch bei geringeren Analytkonzentrationen ($0,075 \mu\text{mol/ml}$), stärkere Frequenzänderungen auftreten. In Abbildung 61 sind typische Frequenzkurven bei der Adsorption ConA-gekoppelter Liposomen an mit Mannosid III modifizierten Modellmembranen dargestellt.

Diese Untersuchungen wurden ebenfalls an unbeschichteten, an hydrophobierten und an mit LB-Filmen beschichteten Quarzoberflächen durchgeführt.

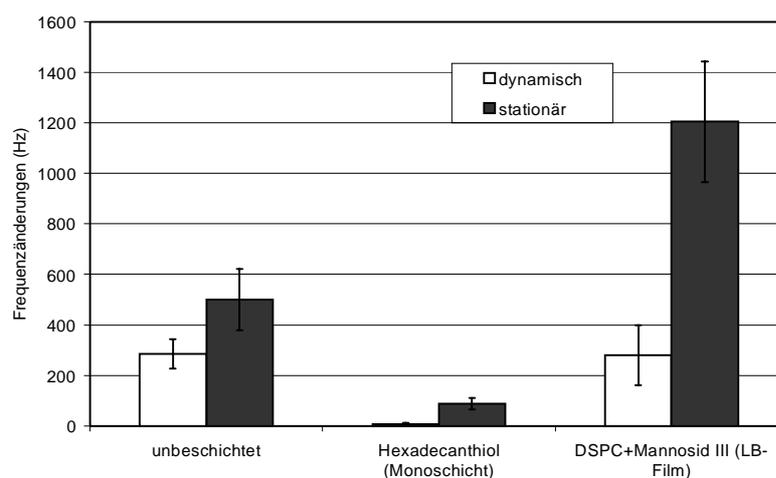


Abbildung 62: Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen mit verschiedenen Beschichtungen. Vergleich zwischen dynamischer und stationärer Methode

Wie in Abbildung 62 dargestellt, wurden unter stationären Bedingungen die Erkenntnisse der vorangegangenen Untersuchungen bestätigt. D.h., es traten signifikante Frequenzänderung bei der Adsorption von Liposomen an reinen Goldoberflächen und an mit LB-Filmen beschichteten Grenzflächen auf. Im Gegensatz dazu konnten auch im stationären Zustand keine signifikanten Masseanlagerungen an hydrophobierten Quarzsensoren (Hexadecanthiol) beobachtet werden. Die Wechselwirkungen an Mannosid-dotierten Modellmembranen sind in diesem Fall jedoch signifikant größer als die unspezifischen Interaktionen an reinen Goldoberflächen und an Lipiddoppelschichten (LB-Technik).

Um die Spezifität der beschriebenen Wechselwirkungen zu testen, wurden vergleichende Messungen zwischen ConA-gekoppelten und nicht gekoppelten Liposomen durchgeführt. Untersucht wurden Interaktionen an kohlenhydratmodifizierten Modellmembranen (DSPC/Mannosid III; 9:1). In Abbildung 63 ist der typische Verlauf eines derartigen Experiments dargestellt. Es ist zu erkennen, daß keine Adsorptionen der ungekoppelten Vesikel an Modellmembranen stattfinden. Die folgende Zugabe ConA-gekoppelter Liposomen führt jedoch zu einer deutlichen Frequenzabnahme bzw. zu einer Massenbeladung der Sensoroberfläche.

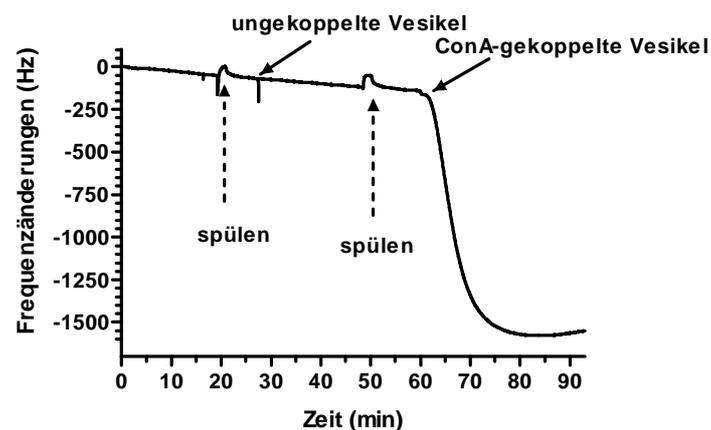


Abbildung 63: Frequenzverlauf bei der Adsorption von ConA-gekoppelten und ungekoppelten Liposomen an Modellmembranen (DSPC/Mannosid III; 9:1) unter stationären Bedingungen.

8.1.4 Zusammenfassung

In den dargestellten Untersuchungen haben wir uns mit generellen Problemen der Vesikeladsorption an modifizierten Schwingquarzen beschäftigt. Es war festzustellen, daß unspezifische Wechselwirkungen (z.B. mit unbeschichteten Goldelektroden oder mit Phospholipiden) eine wichtige Rolle spielen. Dennoch wurde nachgewiesen, daß spezifische Wechselwirkungen, zumindest im stationären Zustand, signifikant größere Frequenzänderungen hervorrufen. So wurden bei der Adsorption ConA-gekoppelter Vesikel an kohlenhydratmodifizierten LB-Filmen sechsmal stärkere Wechselwirkungen (1204 Hz) gefunden als an nicht modifizierten LB-Filmen (195 Hz).

Den wesentlichen Anstoß für die weitere Bearbeitung des Zelladhäsionsmodells gab jedoch der direkte Vergleich des Adsorptionsverhaltens von ungekoppelten Liposomen mit ConA-gekoppelten Liposomen (Abbildung 63). Die deutliche Unterscheidung zwischen Adsorptionen, initiiert durch spezifische Wechselwirkungen, und dem Fehlen jeglicher Wechselwirkung bei Injektion nicht gekoppelter Liposomen sollte uns die Möglichkeit geben, in weiteren Untersuchungen den Anteil unspezifischer Adsorptionen zu quantifizieren.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird im folgenden Kapitel die Abhängigkeit der Adsorptionen von den physikochemischen Eigenschaften der Liposomen und der LB-Filme untersucht.

8.2 Spezifische Adsorption an trägerfixierten Bilayern

8.2.1 Modifizierung der Beschichtung

Wie aus den oben beschriebenen Untersuchungen ersichtlich ist, sind neben der spezifischen Wechselwirkung zwischen den Mannoselipiden und ConA weitere unspezifische Wechselwirkungen für die Adsorption der Vesikel an den trägerfixierten Modellmembranen verantwortlich. Die Affinität der Phospholipidkopfgruppen (Vesikel \leftrightarrow Membran) spielt dabei eine entscheidende Rolle. In den folgenden Experimenten wurde versucht, durch Vergrößerung des Abstandes der Kopfgruppen von der Membranoberfläche die unspezifischen Interaktionen partiell zu unterdrücken. Sterische Effekte, d.h. die Vergrößerung der räumlichen Entfernung der Membranlipide, sollten durch Einbau eines Spacers mit längerer Ethoxykette erreicht werden. Deshalb wurde das Adsorptionsverhalten der Liposomen an mit Mannosid VIII* beschichteten Quarzoberflächen mit den Reaktionen an Mannosids III verglichen (Abbildung 64).

Mit Hilfe der Quarzmikrobalance war es möglich, die hierbei auftretenden Effekte zu quantifizieren. Die Frequenzänderungen betragen 987 ± 82 Hz (im Vergleich 1204 ± 238 Hz bei Mannosid III). Es wurde festgestellt, daß durch die Verwendung des längeren Spacers (5 Ethoxyeinheiten entspr. ca. 1,2 nm) die Massenbeladungen an der trägerfixierten Membran um ca. 20 % reduzierbar sind. Unter der Prämisse, daß die molekularen Wechselwirkungen zwischen ConA und Mannosid in beiden Fällen identisch sind, läßt sich schlußfolgern, daß der Anteil der Kopfgruppenwechselwirkungen mindestens 20 % der Gesamtreaktion betragen sollte.

In den folgenden Untersuchungen wurde Mannosid VIII als Erkennungsstruktur verwendet.

* Mannosid VIII: 1-O-(3,6,9,12,15,18,21,24-octaooxatetracontyl)- α -D-mannopyranosid

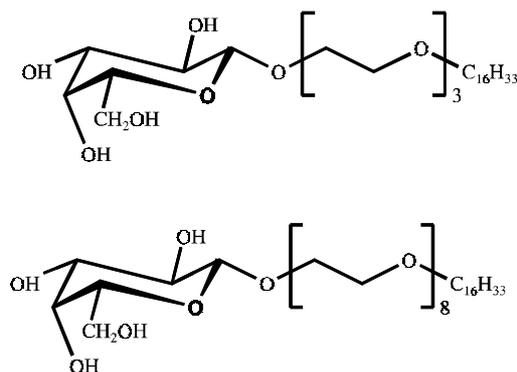


Abbildung 64: Strukturen der in trägerfixierte Doppelschichten eingebauten Kohlenhydrate

8.2.2 Einfluß der vesikulären Struktur auf das Bindungsverhalten

Neben der Möglichkeit, die Struktur der Sensorbeschichtung zu variieren, können die Eigenschaften der Liposomen verändert werden, um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren. Naheliegender ist der Einbau von Polyethylenglycol(PEG)-Lipiden in die Membran der Liposomen. Derart modifizierte Liposomen sind sterisch abgeschirmt und deshalb in biologischen Systemen stabil. Im Vergleich zu herkömmlichen Liposomen besitzen sie relativ lange Blutzirkulationszeiten [190]. Die Dimension dieser „künstlichen Glycocalix“ beträgt ca. 5 nm und liegt damit in der Größenordnung der ConA-Tetramere, die über N-glut-PE an den Vesikeln fixiert waren. Für die Untersuchungen wurden Mischungen mit 2,5 und 5 % PEG-PE im Lipidanteil verwendet. Durch die sterische Behinderung der unspezifischen Wechselwirkungen der Membranlipide konnten die Adsorptionen an Mannosid VIII enthaltenden trägerfixierten Membranen um 48 bzw. 78 % reduziert werden.

In natürlichen Systemen ist das Cytoskelett verantwortlich für die physische Struktur, für intrazelluläre Transportvorgänge und für die Beweglichkeit lebender Zellen. Im Sinne unseres Modellsystems erschien es sinnvoll, die vesikulären Systeme ähnlich zu stabilisieren. Geeignet waren synthetische Polymere, die sich intravesikulär polymerisieren ließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyacrylamid und Polyacrylcholat (Abschnitt: 8.1.2) eingesetzt. Die Polymerisierung erfolgte durch Herstellung einer Mischung der Lipide und der Monomeren, der chromatographischen Aufbereitung der Vesikellösung, um äußere Polymere zu entfernen (Kapitel 9) und schließlich der Polymerisation im Innern der Vesikel (UV-Strahlung). Die Vernetzung der Liposomen mit Polyacrylamid erfolgte bei Anteilen von 2,5 und 5 % des Monomeren. Im Ergebnis waren deutliche Unterschiede im Resonanzverhalten der Schwingquarze (im Vergleich zum Schwingungsverhalten bei Adsorption von nicht vernetzten Liposomen) festzustellen. Es konnten jedoch keine Abhängigkeiten vom Monomerenanteil ermittelt werden. Generell wurden die Wechselwirkungen durch intravesikuläre Polymerisation um ca. 80 % im Vergleich zur Adsorption von Standardliposomen reduziert.

Acrylcholate dienen als alternative Polymersubstanzen. Durch den Einsatz verschiedener Anteile des Copolymers MBA* (5%; 3% und 0%) konnte das Adsorptionsverhalten der vesikulären Systeme beeinflusst werden. Der Anteil des Monomers wurde mit 10 % höher gewählt als bei Liposomen mit Acrylamid, so daß die zwei Versuchsreihen nicht direkt vergleichbar sind. Man erkennt, daß der Anteil des Copolymers von Bedeutung für die Adsorption ist. Die Wechselwirkungen mit vernetzten Liposomen ohne MBA ergeben keine signifikanten Frequenzänderungen. Im Gegensatz dazu bestätigen die Versuche mit 5 % MBA die vorhergehenden Untersuchungen an Acrylamid-vernetzten Vesikeln (enthalten ebenfalls 5% MBA). Trotz des höheren Monomeranteils wurden ebenfalls Frequenzänderungen von ca. 150 Hz ermittelt.

Abbildung 65 gibt eine Übersicht über die Wechselwirkungen modifizierter Liposomen an trägerfixierten Modellmembranen (Mannosid VIII). Deutlich waren bei allen verwendeten Liposomen geringere Frequenzänderungen als bei Standardliposomen zu verzeichnen.

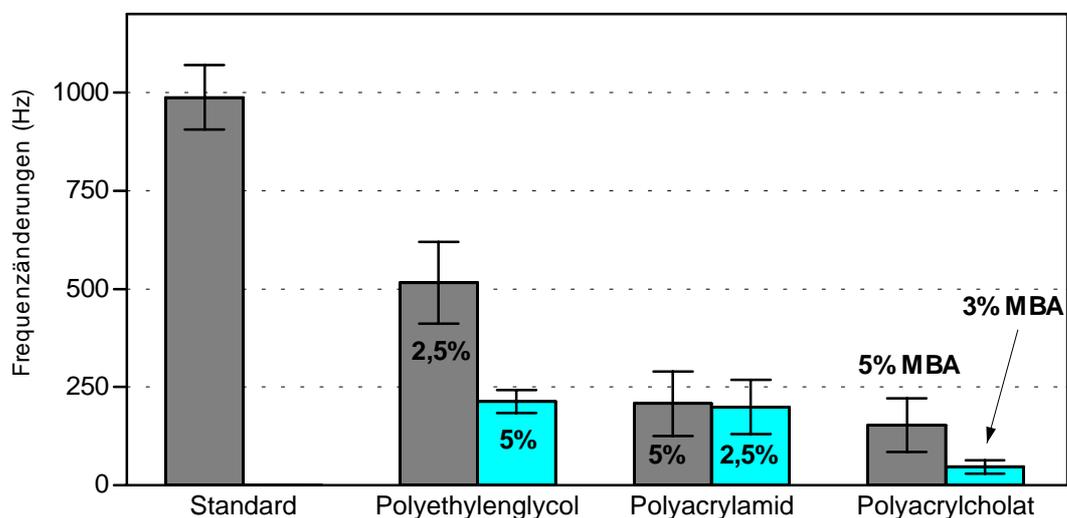


Abbildung 65: Frequenzänderungen bei Adsorption modifizierter Liposomen an Modellmembranen (im Vergleich zu nicht modifizierten (Standard) Liposomen)

8.2.3 Inhibierung der Liposomen

Um den Anteil der spezifischen Wechselwirkungen an der Vesikeladsorption zu bestimmen, wurden Versuche zur Inhibierung der Reaktionen durchgeführt. Als Modellvesikel wurden lektinegekoppelte, intravesikulär polymerisierte Liposomen verwendet, bei denen man davon ausgehen konnte, daß unspezifische Wechselwirkungen reduziert sind aber dennoch die spezifischen Lectin-Ligand-Interaktionen stattfinden.

Zur Inhibierung der Adsorptionen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, bei denen jeweils α -D-Methyl-mannopyranosid als kompetitives Reagens diente. Aus der Literatur ist

* N,N'-Methylen (bisacrylamid)

bekannt, daß α -D-Methyl-mannopyranosid mit gelösten ConA-Vesikeln reagiert [189]. Die erste Versuchsreihe wurde mit adsorbierten Liposomen durchgeführt. Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, wurden die Liposomen unter Vermeidung von Scherkräften (stationäres System) an der Modellmembran fixiert. Nach dem Spülen der Meßzelle konnte anhand der Frequenzänderung die Vesikelbeladung der Sensoroberfläche festgestellt werden. Entsprechend den Modellvorstellungen sind die Vesikel sowohl spezifisch (ConA/Glycolipid) als auch unspezifisch (Fusion) an der Modellmembran fixiert. Bei Zugabe von α -D Methyl-mannopyranosid sollten aufgrund kompetitiver Wechselwirkungen die spezifischen Bindungen gelöst werden. Unspezifisch fusionierte Liposomen sollten davon unbeeinflusst bleiben.

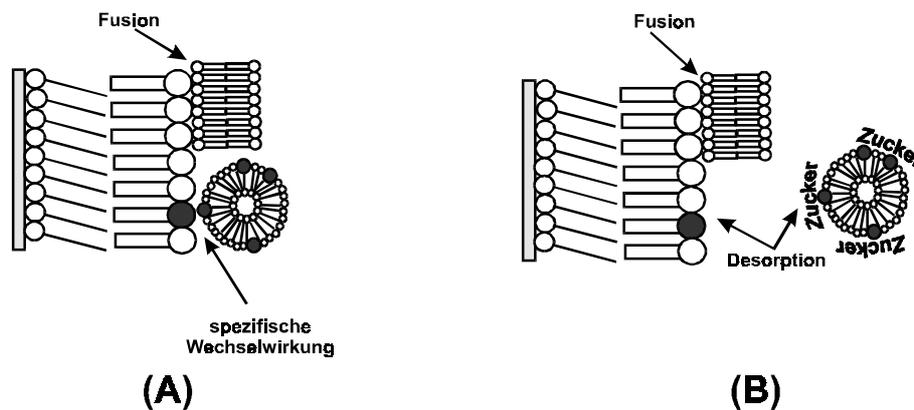


Abbildung 66: Modell zur Inhibierung der spezifischen Adhäsion von Vesikeln mit gelösten Zuckern (A - spezifische und unspezifische Adsorptionen, B - Desorption durch kompetitive Wechselwirkungen)

Während des Inkubierens mit α -D-Methyl-mannopyranosid in der QMB-Meßzelle war jedoch in keinem Fall eine Desorption der Vesikel zu beobachten. Nach der Inkubationszeit wurde die Meßzelle jeweils 2 min mit Pufferlösung (Tris, pH 7,4) gespült und nach 15 min erneut die Frequenz ermittelt. Auch dabei konnte kein signifikanter Anstieg der Frequenz festgestellt werden. (Abbildung 67 (A)).

Um dennoch Inhibierungen der ConA-gekoppelten Vesikel zu untersuchen, wurden diese Systeme in einer zweiten Versuchsreihe vor der Messung mit α -D-Methyl-mannopyranosid inkubiert.

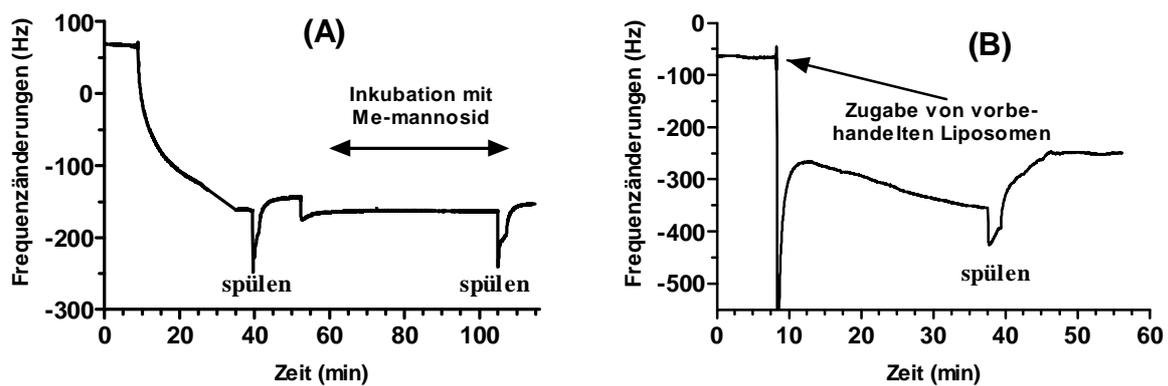


Abbildung 67: Frequenzverlauf nach Injektion (10 min) von polymerisierten Vesikeln und anschließender Behandlung mit α -D-Methyl-mannopyranosid (A) und α -D-Methyl-mannopyranosid vorbehandelten, polymerisierten Vesikeln (B)

Über einen Zeitraum von 1 Stunde wurden die Vesikellösungen mit 10 % α -D-Methyl-mannopyranosid bei Raumtemperatur vorbehandelt. Die Adsorptionsuntersuchungen der vorbehandelten Liposomen erfolgte ebenfalls im stationären System. (Abbildung 67 (B)). Nach vollständiger Sättigung der Oberfläche (Frequenzstabilität wird nach ca. 30 Minuten erreicht) und anschließendem Spülen konnte die Vesikelbeladung der Oberfläche anhand der Frequenzänderungen bestimmt werden. Der Vergleich der Desorption von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Liposomen verdeutlicht den kompetitiven Effekt. So desorbierten während des Spülers der Meßzelle 20 % der vorbehandelten Vesikel. Bei nicht vorbehandelten ConA-gekoppelten Liposomen konnte keine Ablösung der Vesikel beobachtet werden.

8.2.4 Zusammenfassung

Nachdem in einleitenden Untersuchungen (8.1.3) gezeigt werden konnte, daß mit Hilfe der QMB-Technik prinzipiell spezifische und unspezifische Adsorptionen supramolekularer Lipidsysteme detektierbar sind, wurden im folgenden Anstrengungen unternommen, das Modellsystem (Abbildung 59) zu variieren, um unspezifische Wechselwirkungen zu unterdrücken. Davon ausgehend gab es zwei Ansatzpunkte zur Modifizierung der Reaktionen. Im ersten Fall wurden die trägerfixierten Modellmembranen variiert und im zweiten Fall wurden die vesikulären Systeme modifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche unternommen, Vesikel und trägerfixierte Membranen sterisch abzuschirmen bzw. die Deformierbarkeit der Vesikel zu reduzieren.

Die Veränderung der Kettenlänge (Spacer) des in die trägerfixierte Lipidmatrix eingebauten Mannosids führte zu einer Reduzierung der Frequenzänderung ($f_3 - f_1$) um 18 %. Da weder die Struktur der Kohlenhydrate, noch die der Lectine verändert wurden, kann man davon ausgehen, daß der Anteil der Kopfgruppenwechselwirkungen um genau diesen Betrag zurückgedrängt wurde.

Weitere Reduzierung der Fusion wurde durch die Modifizierung der Vesikel erreicht. Ähnlich wie bei natürlichen Zellen wurde die Oberfläche sterisch abgeschirmt („künstliche Glycocalix“) und durch Einbau eines Polymergerüsts („künstliches Cytoskelett“) gegen Deformationen geschützt. So konnten durch den Einbau von PEG-Lipiden in die vesikuläre Membran die Adhäsionen um bis zu 78 % reduziert werden. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß Wechselwirkungen zwischen ConA und Mannosid, neben den unspezifischen Lipidinteraktionen, ebenfalls reduziert wurden (die Dimension der PEG-Lipide entspricht der Dimension der Proteine). Weitere Untersuchungen wurden mit polymerisierten Vesikeln durchgeführt. Versuche mit (Acrylcholol-) polymerisierten Vesikeln, ohne bzw. mit geringen Anteil an Copolymer, ergaben eine drastische Reduzierung der Wechselwirkungen. Die geringen Frequenzänderungen führen zu der Hypothese, daß die Deformierbarkeit der Vesikel Voraussetzung für die Bindung der Liposomen an trägerfixierte Membranen ist. Bei intravesikulärer Polymerisation mit einem Copolymer aus MBA und Polyacrylamid wurden die Frequenzänderungen um ca 80 % reduziert. Das bedeutet, daß hier vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden konnten wie bei den Untersuchungen mit PEG-Lipid modifizierten Liposomen. Die Vermutung liegt nahe, daß der Anteil der spezifischen Wechselwirkungen lediglich 1/5 der Gesamtreaktion ist und daß die Frequenzänderungen im wesentlichen durch unspezifische Reaktionen (Fusionen) an der Sensoroberfläche hervorgerufen werden.

Bestätigt werden sollte diese Vermutung schließlich durch Inhibierungsexperimente an adsorbierten Liposomen. Aus den vorhergehenden Messungen wurde deutlich, daß durch Veränderungen der Scherkräfte an der Membrangrenzfläche (Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit) keine Desorption der Vesikel erfolgt. Trotzdem sollten durch kompetitive Wechselwirkungen (α -D-Methyl-mannopyranosid) alle spezifisch gekoppelten Liposomen desorbiert werden. Fusionierte Liposomen können nach dieser Vorstellung nicht entfernt werden. Tatsächlich gelangen diese Experimente nicht. Es kam zu keiner Desorption der adsorbierten Vesikel. Aus diesem Grund wurden in einer letzten Versuchsreihe die Liposomen mit α -D-Methyl-mannopyranosid vorbehandelt. Der charakteristische Kurvenverlauf (Abbildung 67) bei vorbehandelten Proben ist auf eine Veränderung der viskoelastischen Verhältnisse der Probe zurückzuführen. Wichtig war die Desorption der Vesikel nach dem Spülvorgang. Es desorbierten 20 % der vesikulären Systeme.

Zusammenfassend soll festgestellt werden, daß die durchgeführten Untersuchungen das Adhäsionsmodell von Bendas et. al [189]. bestätigen. Offensichtlich kommt es nach einleitenden Wechselwirkungen zwischen ConA und Glycolipiden zur Fusion der Liposomen. Im Ergebnis der Untersuchungen werden folgende Thesen aufgestellt:

1. Unspezifische Adsorptionen der Liposomen finden an energiereichen Grenzflächen statt (Metallelektroden, hydrophile Oberflächen).
2. Liposomen fusionieren an trägerfixierten Phospholipidmembranen.

3. Die Fusion wird initiiert durch ConA-Glycolipidwechselwirkungen (räumliche Annäherung ist Bedingung).
4. Der Anteil der unspezifischen Wechselwirkungen am Adsorptionsprozeß (Fusion) beträgt ca. 80 %, wohingegen spezifische Interaktionen zu 20 % beteiligt sind.
5. Nichtelastische Liposomen besitzen keine Affinität zu trägerfixierten Modellmembranen, es finden weder spezifische noch unspezifische Wechselwirkungen statt.

8.3 Stabile Mischmicellen als Modellsysteme

8.3.1 Einleitung

Oberhalb einer bestimmten Konzentration bilden oberflächenaktive Substanzen (Tenside, Fettsäuren, Phospholipide, ...) in wässrigen Systemen Aggregate. Diese temperaturabhängige Konzentration bezeichnet man als „kritische Micellbildungskonzentration“ (CMC). Das Erreichen der CMC ist gekennzeichnet durch die Änderung physikalischer Eigenschaften der Lösung, wie Grenzflächenspannung, osmotischer Druck, elektrische Leitfähigkeit und Dichte. Beim Überschreiten der CMC bleibt die Monomerenkonzentration konstant, wohingegen sich die überschüssigen Moleküle zu Micellen verschiedener Gestalt (Kugeln, Stäbchen, Scheiben) aggregieren [191]. In Abbildung 68 ist die idealisierte Gestalt einer anionischen Micelle dargestellt. Die Ketten der Moleküle ordnen sich zu einem hydrophoben Zentrum, die hydrophilen Kopfgruppen bilden die Sternschicht, welche von hydratisierten Gegenionen (Doppelschicht) umgeben ist.

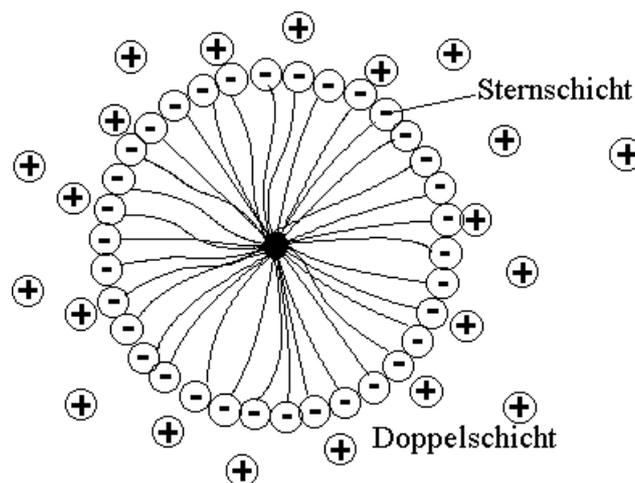


Abbildung 68: Schnitt durch eine kugelförmige anionische Micelle

Die Transporteigenschaften, die Geschwindigkeit der Aufnahme und das pharmakokinetische Verhalten oral applizierter Arzneistoffe hängt in großem Maße von der Löslichkeit und den Grenzflächeneigenschaften der Wirkstoffe und deren Wechselwirkungen mit Flüssigkeiten des Magen-Darmtrakts ab [192]. Unter diesen Flüssigkeiten besitzen beispielsweise die Gallensalze als Amphiphile, die sowohl gut wasserlöslich sind aber auch micellare Systeme

bilden können, eine herausragende Bedeutung. Gallensalze sind die vorwiegend in der Galle auftretenden, mit Glycin oder Taurin konjugierten Cholansäuren (5 β -Cholan-24-säure). Die Form, die Größe und die Ladung von Gallensalzmicellen werden durch intestinale Substanzen beeinflusst. Im folgenden werden Untersuchungen an diesen Aggregaten beschrieben. Mischmicellare Systeme, bestehend aus Gallensalzen, Phospholipiden und Fettsäuren (FS), stellen Modelle für die Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt dar. In früheren Untersuchungen wurden Wechselwirkungen zwischen ionischen Analyten und Micellen in Abhängigkeit von der Gestalt und der Ladung der micellaren Systeme ermittelt [193]. Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Fähigkeit dieser Systeme zur Haftung an trägerfixierten Modellmembranen.

8.3.2 Adsorption micellarer Systeme an Modellmembranen

Analog zu den Untersuchungen an vesikulären Systemen wurden Beschichtungen durch Kopplung von SA-Verfahren und LB-Technik verwendet. Allerdings wurden reine DSPC-Matrices als Modellmembranen eingesetzt. Demzufolge konnten lediglich unspezifische Wechselwirkungen der aggregierten Lipidsysteme (Membran – Micelle) verfolgt werden.

Zur Durchführung der Versuche wurde ein gekoppeltes Verfahren aus Durchfluß und stationären Messungen angewendet (siehe Kapitel 9), Damit konnte sowohl das Adsorptionsverhalten im Durchflußsystem verfolgt aber auch die (wegen des ungleichmäßigen Pumpenstromes) Frequenzinstabilitäten minimiert werden.

Die micellaren Systeme wurden in Tris-Puffer (pH 7,3) durch Rühren der Suspension bei 50°C hergestellt. Für die Untersuchungen wurde eine Gallensalzkonzentration oberhalb der kritischen Micellbildungskonzentration gewählt. Im Fettsäure(FS)-anteil der mischmicellaren Systeme wurden die gesättigten Säuren Laurin-, Palmitin- und Stearinsäure sowie Ölsäure als ungesättigte Verbindung verwendet.

Zunächst wurde das Adsorptionsverhalten reiner Gallensalzmicellen an DSPC-Membranen untersucht. Die Zugabe von Na-Desoxycholat (NaDC) führte, ebenso wie die Zugabe von Na-Cholat (NaC), nicht zu signifikanten Frequenzänderungen. Geringe Adsorptionen konnten bei Wechselwirkungen zwischen binären Systemen aus DPPC und Gallensäuren festgestellt werden. Mischungen aus NaDC und DPPC ergaben geringe aber signifikante Frequenzänderungen von 21 Hz. Untersuchungen an binären Mischungen aus NaC (20 mM) und DPPC (5 mM) ergaben keine signifikanten Wechselwirkungen.

Bei Adsorptionsuntersuchungen ternärer micellarer Systeme, bestehend aus NaDC, DPPC und Fettsäuren, wurden relativ große Frequenzänderungen ermittelt. Anhand der Ergebnisse erkennt man deutlich, daß die Wechselwirkungen der micellaren Systeme mit trägerfixierten Phospholipiden vom Einfluß der FS abhängig sind. Der Einfluß auf die Adsorptionsfähigkeit dieser Systeme steigt mit zunehmender Länge der Kohlenstoffketten. In Durchflußuntersuchungen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Frequenzänderungen und der Kettenlänge der gesättigten FS ($R = 0,9998$) festgestellt.

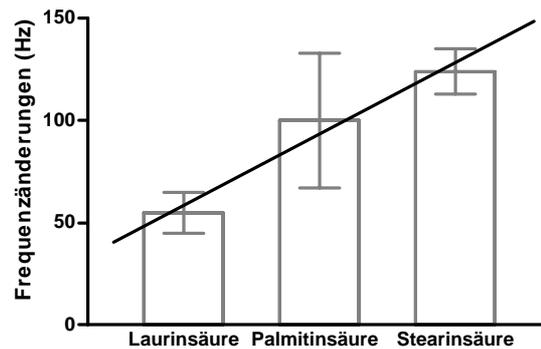


Abbildung 69: Frequenzänderungen bei Adsorption ternärer micellarer Systeme (NaDC, DPPC und Na-salze verschiedener FS) an DSPC-Modellmembranen im dynamischen System

Der Einfluß von Desorptionen tritt jedoch deutlicher bei ternären Systemen mit Laurinsäure auf. In diesen Untersuchungen desorbierten ca. 75% der Micellen von der Oberfläche, im Vergleich zu Systemen mit C₁₆- bzw. C₁₈-FS bei denen keine signifikanten Abnahmen der Massebeladung des Sensors zu beobachten waren. Geringere Frequenzänderungen treten bei Wechselwirkungen mit einfach ungesättigten FS auf. Bei Verwendung von ternären Mischmicellen mit Ölsäure im FS-Anteil wurden die Interaktionen der micellaren Systeme mit Phospholipiden um ein Drittel (im Vgl. zu Stearinsäure) reduziert.

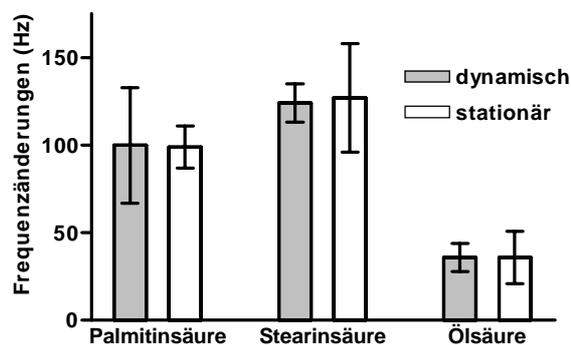


Abbildung 70: Frequenzänderungen bei Adsorption ternärer Mischmicellen (mit gesättigten und ungesättigten FS) an DSPC-Membranen

8.4 Beurteilung der Nachweisbarkeit von Lipidadsorptionen

Dem Nachweis von supramolekularen Strukturen, d.h. von Substanzen die aus mehreren monomolekularen Einheiten bestehen, wird in letzter Zeit immer größere Aufmerksamkeit zuteil [194]. Schwerpunkt der Forschungstätigkeit sind Untersuchungen von flüssigen Kristallen, Membranen, Micellen oder Vesikeln, die Entwicklung organischer Halbleiter, Leiter und Supraleiter, das Gebiet der „Molekularen Elektronik“ oder die gezielte Entwicklung supramolekularer Katalysatoren.

In diesem Kapitel wurde das Adsorptionsverhalten von Liposomen und Micellen an Grenzflächen beschrieben, die mit Bilayern beschichtet waren, um biologische Membranen zu simulieren. Liposomen und Micellen sind zwar prinzipiell verschieden, ähneln sich jedoch in

ihrer physischen Struktur und in ihrem Adsorptionsverhalten. Besonders die QMB-Technik eignet sich zum Nachweis von Adsorptionen dieser supramolekularen Systeme, weil sowohl Massebeladungen als auch viskoelastische Änderungen an der Sensoroberfläche (z.B. Deformierbarkeit der Liposomen) erfaßt werden. Probleme treten bei diesen Untersuchungen vor allem durch Nebeneffekte auf. So waren Einflüsse durch die Peristaltik der Pumpen, durch Temperatureinflüsse und andere technologische Probleme nicht vollständig auszuschließen. Desweiteren spielten systemische Einflüsse (Ordnungszustand der trägerfixierten Modellmembran, Liposomenfusion, oberflächenaktive Verbindungen,...) eine Rolle. Daraus erklären sich relativ hohe Standardabweichungen. Durch Modifizierungen des Systems sollte es in der zukünftigen Arbeit mit vesikulären und micellaren Systemen möglich sein, diese Resultate zu verbessern. Die vorliegenden Ergebnisse bieten eine Grundlage für die weitere Entwicklung der verwendeten Modellsysteme und zeigen die Möglichkeit der Untersuchung von Wechselwirkungen supramolekularer Systeme mit trägerfixierten Modellmembranen.

9 Experimenteller Teil

Das für die QMB-Untersuchungen verwendete Meßsystem basiert auf einer optimierten Oszillatorschaltung, die in Kapitel 2 dieser Arbeit beschrieben wurde. Es kamen drei Typen von Meßzellen (Tauchkopfzellen, Edelstahldurchflußzellen und miniaturisierte Meßzellen) zum Einsatz.

Die verwendeten AT geschnittenen Quarzscheiben wurden von der Quarzkeramik GmbH, Stockdorf bezogen. Sie haben einen Durchmesser von 15 mm und sind beidseitig mit Goldelektroden (\varnothing 6 mm) bedampft.

9.1 Verfahren zur Beschichtung von Schwingquarzen

Chemikalien:

Wasserstoffperoxid (30%ig, Riedel-de-Häen, Seelze, 18204); Schwefelsäure (VEB Feinchemikalien, Apolda); Chloroform (HPLC-grade, Aldrich, Heidenheim, 36,692-7); Methanol (HPLC-grade, Baker, Gross-Gerau, 8402); Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Isocommerz, VE Außen- und Binnenhandelsbetrieb, BT Herzberg); Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, 4873); (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (Sigma, Deisenhofen, A3648); Glutardialdehyd (Sigma, Deisenhofen, G7526); Immunoglobulin G (Sigma, Deisenhofen, I5385); Protamin (Sigma, Deisenhofen, P4005); Hexadecanthiol (Fluka, Neu Ulm, 52270); Liponsäure (Fluka, Neu Ulm, 62320); Mercaptobernsteinsäure (Aldrich, Heidenheim, M 618-2); Thioglycolsäure (Sigma, Deisenhofen, T 3758), 2-Mercaptoethanol (Pierce, Rockford, USA, 35600), Thiouracil (Sigma, Deisenhofen, T 7750); 11-Mercaptooundecan-1-ol^{*}; Thiolipide I – IV[†]; filtriertes Wasser (Milli-Q, R = 18,2 m Ω); DL-1,2 Distearyl-sn-glycero-phosphatidylcholin *DSPC* (Sigma, Deisenhofen, P 8180)

Geräte:

Zerstäuber *Air-Brush AB-350* (Conrad-Electronic GmbH, Hirschau); Mikroliterspritzen (Hamilton-GC-syringe, Sigma); Wilhelmy-Meßsystem (Riegler und Kirstein, Berlin); Filmwaagetrog (Mechanische Werkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg); Wasserfilter Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, USA)

9.1.1 Reinigung der Sensoren

Es ist notwendig, vor jeder Beschichtung der Sensoren eine einheitliche Reinigungsprozedur einzuhalten. Das ist auch bei der Verwendung fabrikneuer Schwingquarze zu empfehlen.

Das Reinigungsverfahren verläuft in drei Schritten. Man oxidiert die Goldelektroden zunächst mit *Piranha-Lösung* (30%ige Wasserstoffperoxidlösung und konzentrierte Schwefelsäure im Verhältnis 1:3) über einen Zeitraum von nur 15 s. Anschließend werden die Quarzscheiben zehn Minuten in Chloroform gereinigt und zuletzt mit Methanol gespült. Nach jedem Reinigungsschritt werden die Quarzscheiben mit dest. Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet. Die QMB-Technik ermöglicht, die Reinigung der Sensoroberfläche schrittweise

^{*} zur Synthese siehe 9.7.1

[†] zur Verfügung gestellt von U. Bakowski, zur Struktur siehe 9.7.2

nachzuvollziehen. Die einzelnen Arbeitsgänge sind dann beendet, wenn nach dreimaliger Wiederholung identische Frequenzen gemessen werden.

9.1.2 Auftropfmethode

Die Auftropfmethode kann zur Beschichtung der Quarzsensoren mit allen in leichtflüchtigen Lösungsmitteln löslichen Verbindungen verwendet werden. Man stellt sich 10^{-3} – 10^{-2} %ige Lösungen in dem entsprechenden Lösungsmittel her (z.B. Chloroform). Anschließend werden mit einer Mikroliterspritze (Hamilton) bis zu 10 μ l der Lösung aufgetragen. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt.

Wegen der Reproduzierbarkeit der Beschichtung ist es notwendig, möglichst exakt in das Zentrum der Quarzscheibe (höchste Sensitivität) zu tropfen.

9.1.3 Air-Brush Verfahren

Man stellt 50 ml einer 0,05%igen Chloroformlösung der entsprechenden Verbindung her. Davon werden ca. 30 ml in den Vorratsbehälter eines Zerstäubers gegeben. Der Zerstäuber erzeugt mit Hilfe eines konstanten Stickstoffstroms ein feines Aerosol, das in definierten Schritten auf die Elektrode der Quarzscheibe übertragen wird. Das Gehäuse wird mit einer Aluminiumschablone abgeschirmt. Mit dieser Methode lassen sich Substanzen im Bereich von ca. 50 Hz bis 5000 Hz reproduzierbar auftragen.

9.1.4 Silanisierung nach Suri et al. [195]

Die Beschichtung mit Alkoxysilanen kann nur an oxidierten Oberflächen erfolgen. Man verwendet zur Oxidation *Piranha-Lösung* und behandelt die Quarzscheiben über einen Zeitraum von 60 s. Anschließend wird mit dest. Wasser gespült, unter Stickstoff getrocknet und in eine 5%ige Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan (in Chloroform) über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur getaucht. Danach trocknet man die Quarzscheiben eine weitere Stunde im Trockenschrank bei 50°C. Die Beschichtung mit Glutardialdehyd erfolgt bei Raumtemperatur in einer 2,5%igen wässrigen Lösung (Phosphatpuffer pH 7 [196]) über 1,5 Stunden. Proteine werden anschließend durch Eintauchen in die entsprechende Lösung an den freien Aldehydgruppen fixiert. Beschichtungen erfolgten mit Protamin* in einer 0,5%igen Lösung (Phosphatpuffer 8,2) bei 4°C über Nacht und mit ImmunoglobulinG in einer ebenfalls 0,5%igen Lösung bei Raumtemperatur über eine Stunde. Nach der Beschichtung wird mit Phosphatpuffer (pH 7) und dest. Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet.

Ergebnisse (Frequenzänderungen an Luft, vorher/nachher):

- ΔF (Protamin): 191 Hz \pm 53 Hz
- ΔF (IgG): 1560 Hz \pm 428 Hz

* Protamin – ein stark basisches Polypeptid; bildet Salze mit verdünnten Säuren

9.1.5 Beschichtung mit Polyethylenimin

Man läßt 5µl einer 0,05%igen methanolischen Polyethyleniminlösung auf der Elektrode eintrocknen. Nach 30 min wird mit dest. Wasser gespült, und anschließend bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1,5 Stunden durch Tauchen mit Glutardialdehyd (2,5%ig in Phosphatpuffer pH 7, $1/15$ M, [197]) vernetzt. Beschichtungen mit Protamin erfolgten über Nacht in einer 0,5%igen Lösung (Phosphatpuffer, pH 8,2, [196]). Nach dem Spülen (Puffer und dest. Wasser) wird der Quarz unter Stickstoff getrocknet.

Ergebnisse (Frequenzänderungen an Luft, vorher/nachher):

- ΔF (Protamin): 366 Hz \pm 72 Hz

9.1.6 Self-Assembling (SA) Verfahren

Die nach 9.1.1 vorbehandelten Quarzscheiben werden bei Raumtemperatur in eine 1 mM Lösung (Chloroform) von 1-Hexadecanthiol getaucht. Um das zeitabhängige Adsorptionsverhalten der Substanzen zu verfolgen, wird der Quarz halbstündig aus der Lösung genommen, mit Chloroform gespült und unter Stickstoff getrocknet. Anschließend zeichnet man die Frequenz auf. Zur routinemäßigen Beschichtung mit Alkanthiolen verweilt der Quarz über einen Zeitraum von 4 Stunden in der Lösung.

Analog verfährt man bei Beschichtungen mit Liponsäure, Mercaptobernsteinsäure, Thioglycolsäure, 2-Mercaptoethanol, Thiouracil, 11-Mercaptoundecan-1-ol und den Thiolipiden I – IV.

Außerdem wurden Versuche zur Adsorption von 1-Hexadecanthiol in ethanolischer Lösung unter den gleichen Bedingungen aber über einen Zeitraum von bis zu 12 Stunden durchgeführt.

Ergebnisse:

- siehe Tabelle 3 (Seite 44)

9.1.7 Filmwaage (LB) Technik

Die verwendete Filmwaage besteht aus einem Teflontrog (34,8 x 13,9 cm) mit Vertiefung, zwei Wilhelmy-Meßsystemen zur Ermittlung der Oberflächenspannung sowie einer beweglichen Barriere, die über einen Schrittmotor gesteuert wird (Abbildung 71). Zur Auswertung und Ansteuerung der Filmwaage wurde eine an der Medizinischen Fakultät der Universität Halle entwickelte Software genutzt.

Um Monoschichten zu erzeugen, werden 0,3 mM Lösungen der zu untersuchenden Lipide bzw. Lipidgemische (in Chloroform) auf der Wasseroberfläche gespreitet. Es hat sich günstig erwiesen, 25 µl dieser Spreitlösung mit Hilfe einer Mikroliterspritze auf die Wasseroberfläche aufzutropfen. Anschließend wartet man ca. 15 min bis das Lösungsmittel verdunstet ist. Die so erzeugten Filme werden dann durch Verkleinerung der filmbedeckten Wasseroberfläche komprimiert.

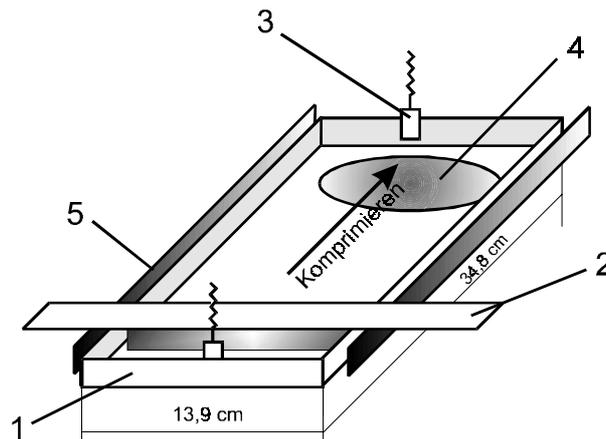


Abbildung 71: Langmuir-Filmwaage (1 Teflontrog, 2 bewegliche Barriere, 3 Wilhelmy-Meßsystem, 4 Vertiefung, 5 Führungsschienen)

Dazu wird die Barriere mit einer Geschwindigkeit von $1,2 \cdot 10^{-1} \text{ mm}^2/\text{s}$ bewegt. Beim Erreichen des Übertragungsdrucks (30 mN/m) stoppt man diese Bewegung und wartet ca. 15 min zur Relaxation des Films. Anschließend wird das hydrophobe Substrat mit einem Filmlift durch die Grenzfläche getaucht (Vorschubgeschwindigkeit $0,5 \text{ mm/min}$). Während der Relaxation und der Übertragung der Monoschichten wird der Lateraldruck automatisch nachgeregelt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Filme wurden bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m und bei Raumtemperatur übertragen.

Ergebniss (Frequenzänderung an Luft, vorher/nachher):

- ΔF (DSPC-Film): $115 \pm 7 \text{ Hz}$

9.2 Analytische Verfahren zur Untersuchung von dünnen Schichten

Chemikalien:

Goldplättchen ($6 \times 12 \times 0,1 \text{ mm}$, STREM ABCR GmbH & Co.KG, Karlsruhe, 79-0050); Hexadecanthiol (Fluka, Neu Ulm, 52270); Liponsäure (Fluka, Neu Ulm, 62320); Mercaptobernsteinsäure (Aldrich, Heidenheim, M 618-2); 2-Mercaptoethanol (Pierce, Rockford, USA, 35600); Thiolipid (I und IV)*; 1-Hexadecanoyl-2-[N-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]amino-hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine *NBD-PC* (Sigma, Deisenhofen, P3412); filtriertes Wasser (Milli-Q, $R = 18,2 \text{ m}\Omega$)

Geräte:

Atomkraftmikroskop *Autoprobe CP* (Park Scientific Instruments, Carouge, Schweiz); Ringtensiometer *TE 1C-CA* (Lauda-Instruments, Lauda-Königshofen), Wilhelmy-Meßsystem (Riegler und Kirstein GmbH, Berlin), Tischellipsometer *SE 400* (Sentech GmbH, Berlin), Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Proxy Cam 200), Wasserfilter Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, USA)

* zur Verfügung gestellt von U. Bakowski, zur Struktur siehe 9.7.2

9.2.1 Atomkraftmikroskopie

Mit der Atomkraftmikroskopie (AFM) können Materialoberflächen in molekularen Dimensionen visualisiert werden. Im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie (STM^{*}) werden auch nichtleitfähige Oberflächen abgebildet. Bei dieser Technik bringt man die Spitze (meist Siliziumnitrid) eines Cantilevers[†] in unmittelbare Nähe der zu untersuchenden Oberfläche. Durch zwischenmolekulare Kräfte (van der Waals, magnetische, elektrostatische) kommt es zur Biegung des Cantilevers, die anhand der Auslenkung eines reflektierten Laserstrahls detektierbar ist (Abbildung 72).

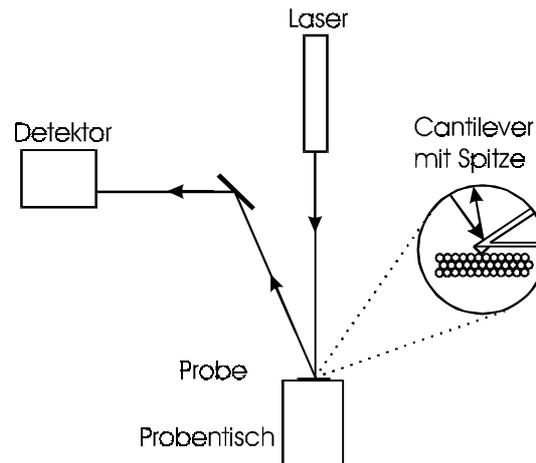


Abbildung 72: Prinzipskizze eines Atomkraftmikroskops nach [197]

AFM-Untersuchungen können in verschiedenen Modi durchgeführt werden. Man unterscheidet Verfahren, bei denen die Spitze direkt auf der Oberfläche der Probe sitzt (*contact-mode*) von berührungslosen Verfahren (*non-contact-mode*). Desweiteren werden AFM-Untersuchungen im sogenannten *tapping-mode*, bei dem die Spitze während des Abrasterns der Oberfläche schwingt durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden AFM-Aufnahmen von unbeschichteten Quarzoberflächen im *non-contact-mode* hergestellt. Verwendet wurde ein AFM-Gerät vom Typ *Autoprobe CP* (Park Scientific Instruments).

9.2.2 Kontaktwinkelmessungen

Als Substrate wurden bei den Randwinkeluntersuchungen Goldplättchen (6 mm x 12 mm) mit einer Dicke von 100 μm verwendet. Diese Plättchen sollten möglichst nicht deformiert sein, vorsichtiges Auswalzen ist möglich. Die Beschichtung mit selbstordnenden Thioalkoholen erfolgt wie beschrieben (9.1.5).

Zur Ermittlung der Randwinkel wurde ein Ringtensiometer verwendet. In einem Meßbecher mit Abdeckglocke werden 100 ml Wasser vorgelegt. Vor Beginn der Messungen temperiert man die gesamte Meßzelle ca. 15 min. Über einen Kraftaufnehmer wird anschließend das

^{*} STM – scanning tunnel microscopy

[†] Cantilever – elastischer Ausleger, Zunge

Goldplättchen unmittelbar über der Wasseroberfläche fixiert. Durch Auf- und Abwärtsbewegung des Meßtisches (Vortrieb: 2 mm/min) wird das Goldplättchen in die Flüssigkeit eingetaucht bzw. langsam im benetztem Zustand wieder herausgezogen. Die Auswertung der Hysteresekurve erfolgt über geräteeigene Software (LAUDA Tensiometer TE 1 CA, Version 1.1).

Alle Messungen wurden bei 20,0°C durchgeführt. Jeweils vor und nach der Messung wurde die Oberflächenspannung des Wassers mit der Ringmethode [198] ermittelt (vorher: $72,18 \pm 0,12$ mN/m; nachher $72,04 \pm 0,15$ mN/m).

Tabelle 7: Fortschritt(θ_{ADV})- und Rückzugsrandwinkel (θ_{REC}) von beschichteten Goldplättchen

Verbindung	θ_{ADV}	θ_{REC}
Hexadecanthal	$97,06 \pm 0,14$	$61,92 \pm 0,12$
Liponsäure	$84,66 \pm 2,8$	$40,63 \pm 0,76$
Mercaptobernsteinsäure	$50,34 \pm 1,46$	$21,86 \pm 0,18$
2-Mercaptoethanol	$74,01 \pm 0,32$	$34,24 \pm 0,24$
Thiolipid (I)	$89,56 \pm 0,04$	$60,89 \pm 0,29$
Thiolipid (IV)	$94,23 \pm 1,80$	$60,11 \pm 0,32$

9.2.3 Schichtdickenbestimmung

Für die Bestimmung der Schichtdicken von SA-Filmen auf goldbeschichteten Quarzen wurde ein ellipsometrisches Meßverfahren angewendet. Bei dieser Methode bestimmt man den Polarisationszustand von linear polarisiertem Licht infolge der Reflexion oder Transmission an einer festen Oberfläche. Mit Hilfe eines mathematischen Modells lassen sich Rückschlüsse auf die Schichtdicke der Probe ziehen.

Die Untersuchungen wurden mit einem Tischellipsometer SE 400 mit in X-Y-Richtung veränderbarer Probenhalterung durchgeführt. Die optischen Parameter werden bei einer konstanten Wellenlänge (He/Ne-Laser $\lambda=632,8$ nm) und Einfallswinkeln (Φ) zwischen 40° und 80° gemessen. Das Licht wird über einen rotierenden Polarisator auf die Probe eingestrahlt. Nach der Reflexion an der Oberfläche wird es durch einen Monochromator geleitet und die Intensität mit einer Photodiode bestimmt. Durch eine spezielle Fourieranalyse [199] werden die Phasendifferenz (Δ) und das Intensitätsverhältnis (ψ) der sinusförmigen Welle numerisch berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mapping Ellipsometrie angewandt, die die Möglichkeit bietet, Substratoberflächen durch Bewegung des Meßtisches bis zu 30 cm² abzurastern. Die Größe der einzelnen Meßpunkte kann zwischen 4 µm² und 0,5 mm² eingestellt werden. Durch das Analysenprogramm wird eine mittlere Schichtdicke und deren Standardabweichung (95%) berechnet. Die exakten optischen Konstanten (Brechzahl, Adsorptionskonstante) der untersuchten Schichten sind nicht bekannt und können bei dünnen Schichten (< 5 nm) auch

nicht empirisch ermittelt werden. Durch Simulationsrechnungen (Simulationssoftware „Netz“ der Fa. Sentech) lassen sich die daraus resultierenden Fehler abschätzen. Der allgemeine Fehler der Methode kann somit mit 15% angegeben werden.

Tabelle 8: Ellipsometrische Bestimmung der Dicke von Alkanthiolschichten

Verbindung	Schichtdicke (gemessen)	Schichtdicke (theoret. [156])
2-Mercaptoethanol	0,3 nm	0,28 nm
Mercaptobernsteinsäure	0,5 nm	0,30 nm
Thioglycolsäure	1,9 nm	0,27 nm
1-Hexadecanthiol	2,8 nm	2,20 nm
Liponsäure	2,9 nm	0,84 nm

9.2.4 Fluoreszenzuntersuchungen

Mit fluorimetrischen Untersuchungen kann die Morphologie der Monoschichten auf der Wasseroberfläche während der Kompression veranschaulicht werden. Diese Methode ermöglichte uns, das Ausmaß und die Struktur der gebildeten kristallinen Domänen zu ermitteln. Das Gerät besteht aus der Kombination einer Langmuir-Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 73).

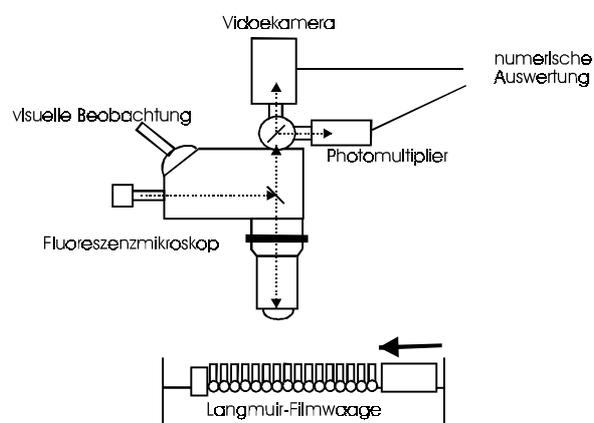


Abbildung 73: Versuchsaufbau, Kopplung einer Langmuir-Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde NBD-PC (0,1-1 mol%) verwendet. Da der Farbstoff sich vorwiegend in der flüssig-analogen Phase befindet, kann man anhand der hellen und dunklen Areale deutlich zwischen kristallinen Domänen und flüssig-analoger Umgebung differenzieren. Die Fluoreszenzaufnahmen werden in einer Vergrößerung von 1:775 bei 25°C erstellt.

9.3 Makrocyclische Modellrezeptoren

Chemikalien:

5,17-Bis[(N'-Phenylureido)methyl]25,26,27,28-tetrakis(1-propyloxy)calix[4]aren *Calix[4]aren*^{*} [200]; *Cavitanden*[†] I, II.1, II.2, III.1 und III.2 [201]; Dinatrium-hydrogenphosphat-Dihydrat (Isocommerz, VE Außen- und Binnenhandelsbetrieb, BT Herzberg); Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt) Chloroform (HPLC-grade, Aldrich, Heidenheim); Tetrabutylammoniumacetat; Ammoniumacetat; Tetrabutylammoniumbromid; Ammoniumbromid; Tetrachlorethan; Tetrachlorkohlenstoff; Tetrachlorethylen; Toluol; Acetonitril; Nitromethan; Ethylacetat; Phenol; 2-Butanon; Anisol; n-Heptan; Benzen; Harnstoff

Geräte:

Tauchkopfszellen (Mechanische Werkstatt, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg); Edelstahldurchflußzellen (BSL-Olefinverbund, Schkopau); Zerstäuber *Air-Brush AB-350* (Conrad-Electronic GmbH, Hirschau); Schlauchpumpe *System 303* (RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf); Labornetzgerät (RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf)

9.3.1 Beschichtung mit Calix[4]aren

Man löst 50 mg (0,03 mol) Calix[4]aren in 50 ml Chloroform. Ein Zerstäuber wird mit ca. 25 ml dieser Lösung gefüllt. Anschließend werden die unbeschichteten Quarze gleichmäßig mit dem Aerosol besprüht. Um eine Frequenzänderung von 800 Hz (entspr. 1000 ng) zu erzeugen, werden 5 bis 10 Sprühvorgänge benötigt. Die Auftragung der Beschichtungen erfolgte mit einer Standardabweichung von ca. 10% (812 ± 73 Hz).

9.3.2 Versuchsdurchführung

Für die Experimente verwendet man in PVC-Tauchkopfszellen gefaßte 10 MHz Quarzscheiben (Tauchköpfe, siehe Kapitel 4). Diese Tauchköpfe werden nach dem Air-Brush-Verfahren beschichtet. Als Referenz dient ein unbeschichteter Quarz. Beide Schwingquarze werden in 100 ml Phosphatpuffer, (pH 7) [196] getaucht. Die Meßkammer (doppelwandiges Becherglas) wird auf 25°C temperiert. Nach ca. 30 min wird eine Frequenzstabilität erreicht und die Basisfrequenz festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt unter Rühren die Zugabe von 4 ml einer 0,1 M Pufferlösung des Ammoniumsalzes. Nach 5 min werden die Frequenzänderungen ermittelt. Zur Auswertung bildet man die Differenz $\Delta F = \Delta f(\text{beschichtet}) - \Delta f(\text{Referenz})$.

^{*} zur Verfügung gestellt von Prof. Ungaro (Parma, Italien), zur Struktur siehe Kapitel 5

[†] zur Verfügung gestellt von Prof. Dalcanale (Parma, Italien)

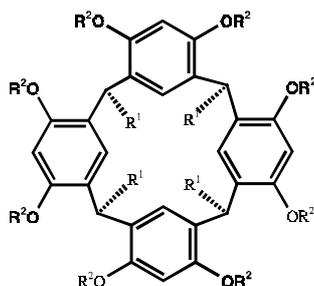
Tabelle 9: Frequenzänderungen bei Wechselwirkung Calix[4]aren beschichteter Quarze mit Ammoniumsalzen

Analyt	ΔF
Tetrabutylammoniumacetat	10 ± 3 Hz
Ammoniumacetat	74 ± 22 Hz
Tetrabutylammoniumbromid	23 ± 5 Hz
Ammoniumbromid	140 ± 39 Hz

9.3.3 Beschichtung mit Cavitanden

Die Beschichtung der Quarze erfolgt mit der Air-Brush-Technik (siehe 9.3.2). Zunächst stellt man sich 0,05%ige Lösungen der Verbindung in Chloroform her. Anschließend wird das Gemisch in einem feinen Nebel auf die gereinigten Quarze verteilt. Für die Untersuchungen wurden jeweils 5000 ng (entspricht ca. 4000 Hz) aufgetragen.

Tabelle 10: Bezeichnung und Strukturelemente der untersuchten Cavitanden



Bezeichnung	R ¹	Brückenstruktur (R ²)
Cavitand I	C ₆ H ₁₃	unverbrückt (H)
Cavitand II.1*	C ₆ H ₁₃	diazanaphtalen
Cavitand II.2	C ₉ H ₁₉	diazanaphtalen
Cavitand III.1	C ₆ H ₁₃	methylen
Cavitand III.2	C ₉ H ₁₉	methylen

9.3.4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Es werden Edelstahldurchflußzellen verwendet, in denen vier Quarze unabhängig voneinander betrieben werden können. Auf der Rückseite der Zellen sind vier Oszillatoren fixiert. Die Quarzscheiben werden mit Silicon eingepaßt. Jeweils drei Quarze werden mit Cavitand beschichtet und ein Quarz wird blank vermessen.

* IUPAC-Nomenklatur: r-9,c-11,c-13,c-15-Tetrahexyl-7,17:8,16-dimethen-9H,11H,13H,15H-chinoxalin-[2''',3''':2''',3''']-[1,4]-benzodioxo-[10''',9''':5,6]-chinoxalin[2'',3'':2'',3'']-chinoxalin[2'',3'':2'',3'']-dioxo[6'',5'':9',10']-[1,4]benzodioxo-[6',5':9,10]- [1,4]benzodioxo[2,3-b]-chinoxalin

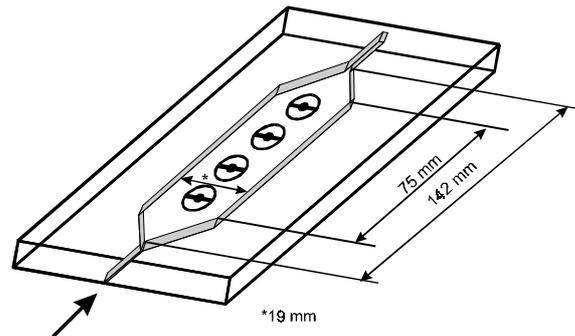


Abbildung 74: Schematische Darstellung einer Edelstahldurchflußzelle, bestehend aus einer Anordnung von vier Sensoren.

Die Experimente führt man im Durchfluß bei einer Fließgeschwindigkeit von 3,2 l/h und bei 25°C durch. Zunächst wird die Meßzelle ca. 30 min bis zum Erreichen der Frequenzstabilität mit dest. Wasser gespült (Basisfrequenz f_1). Anschließend spült man die Analytlösung (100 ppm in dest. Wasser) unter gleichen Strömungsbedingungen ein und wartet erneut die Frequenzstabilität ab (Frequenz f_2). Das Umschalten erfolgt über einen 3-Wegehahn. Als Pumpe verwendet man eine Schlauchpumpe, die über ein Labornetzgerät stufenlos regulierbar ist.

Zur Auswertung bildet man die Differenzen aus Basisfrequenz und Frequenz nach Analytzugabe ($f_2 - f_1$), für alle vier parallel untersuchten Quarze. Die Frequenzdifferenz (ΔF) setzt sich aus den Mittelwerten der Frequenzänderungen der drei beschichteten Quarze (ΔF_i) und der Frequenzänderung des blanken Quarzes (ΔF_{blank}) zusammen.

$$\Delta F = \Delta \bar{F}_i - \Delta F_{\text{blank}} \quad (9.1)$$

Tabelle 11: Frequenzänderungen bei Wechselwirkung von Cavitanen mit verschiedenen Analyten (je 100 ppm)

Analyt	Frequenzänderungen (Hz)				
	Beschichtung				
	I	II.1	II.2	III.1	III.2
Chloroform	59	27	34	14	48
Tetrachlorethan	161	7	151	51	70
Tetrachlorkohlenstoff	109	3	93	45	26
Tetrachlorethylen	87	18	100	41	16
Toluen	40	103	70	27	10
Anisol	76	97	55	30	10
Benzen	24	/	/	/	/
Phenol	/	5	/	0	/
Acetonitril	0	0	0	0	/
Nitromethan	0	0	0	0	/
Ethylacetat	0	7	0	0	/
2-Butanon	/	0	/	/	/
n-Heptan	/	/	0	0	/
Harnstoff	15	/	/	/	/

9.4 Enzymatische Reaktionen

Chemikalien:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan *TRIS* (Fluka, Neu Ullm, 93350), Phospholipase A₂ (Sigma Chemie, Deisenhofen, P3770), DL- 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin *DPPC* (Sigma, Deisenhofen, P5911); L- 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin *L-DPPC* (Sigma, Deisenhofen, P6267); 1-Hexadecyl-2-octadecanoyl-sn-glycerin-phosphatidylcholin* [202], 1-Hexadecyl-2-octadecanoyl(4-methyl)-sn-glycerin-phosphatidylcholin* [202], 1-Hexadecyl-2-octadecanoyl(4-tetradecyl)-sn-glycerin-phosphatidylcholin* [202]

Geräte:

Mikroliterspritzen (Hamilton-GC-syringe, Sigma); Wilhelmy-Meßsystem (Riegler und Kirstein, Berlin); Filmwaagetrog (mechanische Werkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), QMB-Meßzelle (mechanische Werkstatt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), STAT Titrino 718 (Metrohm, Herisau, Schweiz)

9.4.1 Beschichtungen

Referenzuntersuchungen wurden an ungeordneten DPPC-Schichten (Auftropfmethode 9.1.2), an selbstordnenden Thiolipidfilmen (SA-Verfahren 9.1.6) und an geordneten DPPC Schichten (LB-Technik 9.1.7) durchgeführt. Die derivatisierten Verbindungen (Kapitel 7) wurden vom Institut für Pharmazeutische Chemie zur Verfügung gestellt [202]. Geordnete Schichten dieser Phospholipidderivate wurden ebenfalls mit der LB-Technik erzeugt. Alle Messungen wurden in Tris-Puffer (pH 8,0; 10 mM Tris; 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) durchgeführt. Als Enzym wurde PL-A₂ von *Crotalus atrox*, gelöst in 5 mM CaCl₂ (2,5 U/μl), verwendet.

9.4.2 Durchführung der QMB-Untersuchungen

Die Experimente werden bei 40°C im stationären Zustand durchgeführt. Folgende Meßprozedur wird angewendet:

- 2 min Spülen mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0);
- 60 min im stationären Zustand, definieren der Frequenz f_1 ;
- Injektion von 5 μl PL-A₂, nach 30 min Frequenz f_2 ;
- Verfolgung des Reaktionsverlaufs über bis zu 12 Stunden.

Ausgewertet wird anhand der Frequenzdifferenz $f_2 - f_1$:

Tabelle 12: Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen zwischen PL-A₂ und trägerfixierten Phospholipiden

Beschichtung	Temperatur	$\Delta F (f_2 - f_1)$
L-DPPC (Auftropfmethode)	Raumtemperatur	keine Reaktion
Thiolipid II (SA-Verfahren)	Raumtemperatur	89 ± 7 Hz
DSPC	Raumtemperatur	keine Reaktion
L-DPPC	Raumtemperatur	keine Reaktion

* zur Verfügung gestellt von J. Jakob, zur Struktur siehe Kap. 6

L-DPPC	40°C	80 ± 16 Hz
D-1C ₁₆ 2C ₁₈	40°C	46 Hz*
D-1C ₁₆ 2(4C ₁)C ₁₈	40°C	28 Hz*
D-1C ₁₆ 2(4C ₁₄)C ₁₈	40°C	66 Hz*
L-1C ₁₆ 2C ₁₈	40°C	25 Hz*
L-1C ₁₆ 2(4C ₁)C ₁₈	40°C	12 Hz*
L-1C ₁₆ 2(4C ₁₄)C ₁₈	40°C	43 Hz*

*Durchschnittswerte aus je zwei Messungen

9.4.3 Durchführung der pH-stat Messungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die pH-stat Methode zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit der PL-A₂-Hydrolyse von L-DPPC durch die in Kapitel 7 aufgeführten Verbindungen eingesetzt. Die Untersuchungen wurden an einem STAT Titrino 718 (Metrohm, Herisau, Schweiz) durchgeführt. Das Meßgerät besteht aus einem Vorratsgefäß für den Titrator (KOH-Lösung), einem temperierbaren Reaktionsgefäß, einer Glaselektrode sowie einem Steuerelement, verbunden mit einem Personalcomputer. Während der Messungen wird der pH-Wert des Mediums durch die Zugabe des Titrators (5 mM KOH) konstant gehalten. Durch Registrierung der dabei verbrauchten Volumina an Titrator pro Zeiteinheit lassen sich Reaktionsumfang und -verlauf auswerten. Eine Beeinflussung des pH-Wertes der Reaktionslösung durch CO₂ wird durch die Erzeugung einer N₂-Atmosphäre im Reaktionsgefäß ausgeschlossen. Für jeden Versuch wurden 2 ml Vesikellösung (L-DPPC) und 2 ml Vesikellösung (synthetische Lipide) vorgelegt* und mit 6 µl der Enzymlösung versetzt. Die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 13: Ergebnisse der pH-stat-Titrationen zur Verfolgung der Hydrolyse von Phospholipiden

	KOH-Verbrauch (ml)		
	500 s	1000 s	2000 s
1. Versuchsreihe			
L-DPPC	0,139	0,238	0,282
D-1-C ₁₆ 2(4C ₁)C ₁₈ PC	0,126	0,220	0,263
D-1-C ₁₆ 2-C ₁₈ PC	0,112	0,205	0,255

* Vesikelpräparation:

Eine Lipidlösung, bestehend aus PC und 1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin (1:1), wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Anschließend wird 100 mM Kochsalzlösung bis zum Erreichen einer Konzentration von 5 mM PC zugegeben, 5 min bei 55°C gerührt und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Vor Versuchsbeginn wird die Vesikellösung bis zu einer Zusammensetzung von 0,5 mM Lipid, 100 mM NaCl und 50 mM CaCl₂ verdünnt. Die Vesikel besitzen eine Größe von 80 nm (Malvern Autosizer II)

D-1-C ₁₆ 2(4C ₁₄)C ₁₈ PC	0,106	0,174	0,229
2. Versuchsreihe			
L-DPPC	0,161	0,253	0,284
L-1-C ₁₆ 2(4C ₁)C ₁₈ PC	0,160	0,238	0,270
L-1-C ₁₆ 2-C ₁₈ PC	0,156	0,232	0,278
L-1-C ₁₆ 2(4C ₁₄)C ₁₈ PC	0,137	0,220	0,253

9.5 Wechselwirkungen an Gangliosid-modifizierten Oberflächen

Chemikalien:

Hexadecanthiol (Fluka, Neu-Ulm, 52270); DL-1,2-Distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin *DSPC* (Sigma, Deisenhofen, P8180), Gangliosidfraktionen G_{M1}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{T1b} (Pallmann GmbH, München); Cholera toxin (β-Untereinheit) (Sigma, Deisenhofen, C7771); G_{M1}-Antikörper* [203]

Geräte:

Wilhelmy-Meßsystem (Riegler und Kirstein, Berlin); Filmwaagetrog (mechanische Werkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg); Wasserfilter Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, USA), QMB-Meßzelle (mechanische Werkstatt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

9.5.1 Beschichtung

Die Beschichtung der Quarzoberflächen erfolgt wie beschrieben durch Kopplung von SA- und LB-Technik. Bei der Übertragung der Monoschichten wurde aufgrund der geringen Materialübertragung auf die Bestimmung der Übertragungsverhältnisse verzichtet. Die Massebilanz bei der Übertragung von 10 und 30% Gangliosid enthaltenden *DSPC*-Monofilmen ist nicht signifikant verschieden von der bei reinem *DSPC* (115 Hz bzw. 92 ng). Es wurden gemischte LB-Filme im molekularen Verhältnis von 9:1 (*DSPC*/Gangliosid) und von 7:3 (*DSPC*/Gangliosid G_{M1}) übertragen.

Verwendet wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Gangliosidfraktionen.

Tabelle 14: Übersicht über die als Toxinrezeptoren eingesetzten Glycolipide

Glycolipid	Oligosaccharidstruktur	Molmasse
asialo-G _{M1}	Gal-GalNac-Gal-Glc	1,242 kDa
G _{M1}	Gal-GalNac-[NeuAc]-Gal-Glc	1,519 kDa
G _{D1a}	NeuAc-Gal-GalNac-[NeuAc]-Gal-Glc	1,796 kDa
G _{D1b}	Gal-GalNac-[NeuAc-NeuAc]-Gal-Glc	1,796 kDa
G _{T1b}	NeuAc-Gal-GalNac-[NeuAc-NeuAc]-Gal-Glc	2,074 kDa

* zur Verfügung gestellt von Dr. J. Müthing, Uni Bielefeld

9.5.2 Durchführung

Die Quarzscheiben werden vor jedem Experiment gereinigt und neu beschichtet. Nach der Beschichtung werden sie unter Wasser in die Meßzelle (miniaturisierte Meßzelle) eingebaut und das Medium (Phosphatpuffer, pH 7, $1/15$ M, [196]) eingespült. Nach ca. 30 min stellt sich eine konstante Frequenz ($\Delta F < 5$ Hz/10 min) ein und man kann mit den Messungen beginnen. Alle Untersuchungen werden nach dem folgenden Verfahren durchgeführt:

- 2 min Durchfluß der Pufferlösung (2 ml/min);
- 15 min ohne Durchfluß (im stationären Zustand wird die Basisfrequenz f_1 ermittelt);
- Injektion von 2,5 μ l einer 0,1%igen Cholera-toxin-Lösung und warten bis zur Sättigung (Frequenzstabilität);
- 2 min Spülen mit Phosphatpuffer ($1/15$ M), um unspezifisch gebundenes Material zu entfernen;
- 15 min im stationären Zustand (ermitteln der Frequenz f_2):
- Injektion von 1 μ l anti-CT Antikörpern (Sättigungszeit ca. 30 min);
- 2 min Spülen mit Phosphatpuffer ($1/15$ M);
- 15 min im stationären Zustand (ermitteln der Frequenz f_3).

Diese Prozedur wird als Standardverfahren zum Nachweis von CT bzw. von Antikörpern eingesetzt. Um Tests mit G_{M1} -Antikörpern durchzuführen kann das Verfahren entsprechend modifiziert werden.

Tabelle 15: Frequenzänderungen bei Wechselwirkungen zwischen G_{M1} -beschichteten Sensoren und Toxin

Beschichtung	Analyt	ΔF^*
DSPC (LB-Film)	CT (β -Untereinheit)	keine Reaktion
G_{M1} (LB-Film)	CT (β -Untereinheit)	41 Hz
DSPC/ G_{M1} (7:3)	CT (β -Untereinheit)	37 Hz
DSPC/asialo G_{M1} (9:1)	CT (β -Untereinheit)	4 Hz
DSPC/ G_{M1} (9:1)	CT (β -Untereinheit)	58 Hz
DSPC/ G_{D1a} (9:1)	CT (β -Untereinheit)	42 Hz
DSPC/ G_{D1b} (9:1)	CT (β -Untereinheit)	19 Hz
DSPC/ G_{T1b} (9:1)	CT (β -Untereinheit)	11 Hz
DSPC (LB-Film)	G_{M1} -Antikörper	20 Hz
DSPC/ G_{M1} (9:1)	G_{M1} -Antikörper	81 Hz
DSPC/ G_{M1} (9:1)	CT-Antikörper	249 Hz
DSPC/ G_{M1} (9:1) & CT (β -Untereinheit)	CT-Antikörper	746 Hz

*Durchschnittswerte aus je drei Messungen

9.6 Adsorptionen supramolekularer Lipidsysteme

Chemikalien:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan *TRIS* (Fluka, Neu Ulm, 93350); Soja-Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen, P7443); Ei-Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen, P7318); N-Glutarylphosphatidylethanolamin *Nglut-PE** [204]; Gelsäulen *Sephadex G 50 und 4B* (Pharmacia, Uppsala, Schweden); ConcanavalinA (Sigma, Deisenhofen, C2631); 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid *EDC* (Pierce, Rockford, USA, 22980); Polyethylenglycol *PEG-PE 2000* (Avanti Polar Lipids, USA); Acrylamid (Sigma, Deisenhofen, A 8887); Acryloxyethyl-trimethylammoniumchlorid *Acrycholot* (Polyscience Inc. Warrington, USA); N,N'-Methylenbis(acrylamid) *MBA* (Sigma, Deisenhofen, M 7256); Riboflavin *Vitamin B₂* (Sigma, Deisenhofen, R 4500); Methyl- α -D-mannopyrannosid (Sigma, Deisenhofen; M-6882); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen, P 5911); 1,2-Distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen, P 8180); Laurinsäure, Na-Salz (Fluka, Neu Ulm, 61715); Palmitinsäure, Na-Salz (Sigma, Deisenhofen, P 9767); Stearinsäure, Na-Salz (Sigma, Deisenhofen, S 3381); Ölsäure, Na-Salz (Sigma, Deisenhofen, O 3880); Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Isocommerz, VE Außen- und Binnenhandelsbetrieb, BT Herzberg); Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt),

Geräte:

Extruder (Lipex Biomembrane, Vancouver, Canada); Malvern Autosizer IIc (Großbritannien); BCA (protein assay reagent, Pierce, USA, 23225, [205]); Schlauchpumpe (System 303, RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf); QMB-Meßzelle (mechanische Werkstatt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg); Wilhelmy-Meßsystem (Riegler und Kirstein, Berlin); Filmwaagetrog (mechanische Werkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

9.6.1 Herstellung von Liposomen

Unilamellare Vesikel werden nach einem Verfahren von Bendas et.al [206] hergestellt. Dazu suspendiert man Lipidfilme (15 μ mol) in 1 ml Tris-Puffer (0,15 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, pH 7,4 [196]) bei 60°C. Die dabei entstehenden multilamellaren Vesikel werden sechsmal durch eine 400 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung konnte die Größe der Vesikel bestimmt werden.

Die Zusammensetzung der Lipide wurde wie folgt gewählt:

• Soja-Lecithin (SPC)	50%
• Cholesterin (Chol)	30%
• Ei-Phosphatidylglycerin	10 %
• N-Glutaryl-phosphatidylethanolamin (N-glut-PE)	10%

N-glut-PE verwendet man als hydrophoben Anker für ConcanavalinA (ConA). Als Aktivierungsreagenz dient 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Eine

* zur Verfügung gestellt von A. Krause

Suspension von 15 μmol der Liposomen reagiert mit EDC über einen Zeitraum von 6 Stunden bei Raumtemperatur. Überschüssiges EDC wird chromatographisch abgetrennt (Sephadex G 50). Anschließend inkubiert man die Suspension mit 10 mg ConA über Nacht bei Raumtemperatur. Die lektin gekoppelten Liposomen können ebenfalls chromatographisch aufgearbeitet werden (Sephadex 4 B). Man erhält Kopplungsausbeuten von ca. 35% (BCA).

- Der Einbau von Polyethylenglycol (PEG) erfolgt durch Herstellung einer Suspension der Lipide mit 2,5% und 5% PEG. Die weitere Aufarbeitung wird wie beschrieben durchgeführt.
- Zur Herstellung von polymerisierten Liposomen suspendiert man die Lipide in Tris-Puffer (pH 3,5). Als Monomere wurden:
 - a) PAA: 2,5 bzw. 5% Acrylamid (Acrylamid + MBA^{*}, (19:1)) und
 - b) PAC: 10% Acrylcholat[†] (5%, 3% und 0% MBA) verwendet.0,5 mg Riboflavin wurde als Radikalstarter eingesetzt. Die Abtrennung der äußeren Monomere erfolgte mit der Sephadex 4 B. Unter dem Einfluß von UV-Strahlung (12 Stunden) wurden die Vesikel polymerisiert.

9.6.2 Herstellung von Mischmicellen

Die Herstellung micellarer Systeme erfolgt bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in Phosphatpuffer (pH 7,3, $1/15$ M, [196]). Die micellaren Lösungen werden durch Zugabe von 5 mM 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholin (DPPC) und 10 mM Fettsäuren zu 20 mM Lösungen der Gallensäuren hergestellt. Im Fettsäureanteil werden jeweils Lösungen der Natriumsalze von Laurin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure verwendet. Die Lösungen werden bei 50°C über einen Zeitraum von 2 Stunden gerührt.

9.6.3 Adsorptionen vesikulärer Systeme

a) Dynamische Methode

Vor jeder Messung werden die Quarzscheiben wie beschrieben (9.1.1) gereinigt und neu beschichtet. Alle Experimente werden bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durchgeführt.

Zur Durchführung der Adsorptionsuntersuchungen wird die miniaturisierte Meßzelle mit einer Schlauchpumpe gekoppelt. Man mißt bei einem konstanten Volumenstrom von 2ml/min. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 75 skizziert.

In zwei Vorratsgefäßen werden jeweils die Vesikellösungen (0,62 $\mu\text{mol/ml}$) und der Puffer (0,15 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 , pH 7,4 [196]) vorgelegt. Nach dem Erreichen einer konstanten Ausgangsfrequenz (f_1) spült man die Vesikel in die Zelle ein. Zum Umschalten wird ein Dreiwegehahn verwendet.

* MBA – N,N'-Methylenbis (acrylamid)

† Acrylcholat – Acryloxyethyl-trimethylammoniumchlorid

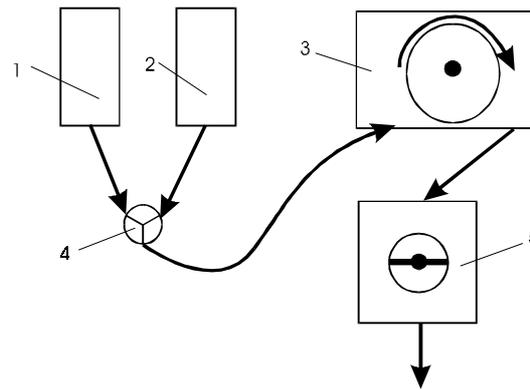


Abbildung 75: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung von Durchflußuntersuchungen (1 Vorratsgefäß mit Puffer, 2 Vorratsgefäß mit Analyt, 3 Schlauchpumpe, 4 Dreiwegehahn, 5 Meßzelle)

Bei gleichbleibender Durchflußgeschwindigkeit wird die Analytlösung 5 min durch die Meßzelle geleitet. Anschließend stellt man das System um und spült die Zelle erneut mit Pufferlösung bis zum Erreichen einer konstanten Frequenz (f_2).

Zur Auswertung der Untersuchungen wird die Frequenzdifferenz ($\Delta F = f_2 - f_1$) gebildet.

Tabelle 16: Frequenzänderungen bei Adsorption lektینگekoppelter Liposomen nach der dynamischen Methode

Beschichtung	$\Delta F (f_2 - f_1)$
unbeschichtet	285 ± 57 Hz
Hexadecanhiol (Monoschicht)	8 ± 5 Hz
DSPC+Mannosid III (Doppelschicht)	280 ± 118 Hz

b) Stationäre Methode

Vor jeder Messung werden die Quarzscheiben wie beschrieben gereinigt und neu beschichtet. Die Experimente werden bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durchgeführt.

Der Versuchsaufbau vereinfacht sich gegenüber der dynamischen Methode, weil der Analyt direkt in die Meßzelle injiziert wird. Demzufolge verwendet man lediglich ein einziges Vorratsgefäß mit der entsprechenden Pufferlösung (0,15 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 , pH 7,4 [196]) und es entfällt der Dreiwegehahn.

Die folgende Meßprozedur wurde angewandt:

- 2 min spülen mit Pufferlösung (Durchfluß: 2 ml/min)
- 15 min im stationären Zustand (d.h. kein Durchfluß) (definieren der Basisfrequenz f_1);
- Injektion von 5 μl der 3mM Vesikellösung (warten bis zur Sättigung, Frequenz f_2);
- 2 min spülen mit Pufferlösung (Durchfluß: 2 ml/min);
- 15 min im stationären Zustand (Frequenz f_3).

Die angegebenen Frequenzdifferenzen beziehen sich auf die Ergebnisse nach dem Spülen der Meßzelle ($f_3 - f_1$)

Tabelle 17: Frequenzänderungen bei Adsorption lektiningekoppelter Liposomen nach der stationären Methode

Beschichtung	Analyt	$\Delta F (f_3 - f_1)$
unbeschichtet	ConA-gekoppelte Liposomen	500 ± 122 Hz
Hexadecanthiol (Monoschicht)	ConA-gekoppelte Liposomen	88 ± 23 Hz
DSPC (LB-Film)	ConA-gekoppelte Liposomen	195 ± 43 Hz
DSPC + Mannosid III (LB-Film)	ConA-gekoppelte Liposomen	1204 ± 238 Hz
DSPC + Mannosid III (LB-Film)	ungekoppelte Liposomen	keine Ww.
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA-gekoppelte Liposomen	987 ± 82 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ungekoppelte Liposomen	keine Ww.
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (2,5% PEG-PE)	516 ± 104 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (5% PEG-PE)	213 ± 9 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (2,5% PAA)	199 ± 69 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (5% PAA)	208 ± 82 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (PAC; 5% MBA)	153 ± 69 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (PAC; 3% MBA)	47 ± 17 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	ConA Liposomen (PAC; 0% MBA)	45 ± 20 Hz

c) Inhibierung

Die Inhibierung adsorbierter Vesikel erfolgt durch Injektion (5 μ l) einer 10%igen Lösung von α -D Mannopyrannosid in Tris-Puffer (pH 7,4). Anschließend wird der Frequenzverlauf verfolgt und nach einer Inkubationszeit von bis zu 2 Stunden die Meßzelle erneut gespült. Schließlich registriert man die Frequenz f_4 und bildet die Differenz $f_4 - f_3$.

Um ConA-gekoppelte Liposomen vorzubehandeln, gibt man zu 1 ml der Vesikellösung (3 μ mol/ml) 0,1 g α -D Mannopyrannosid und läßt die Mischung bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1 Stunde rühren. Von den derart vorbehandelten Liposomen gibt man ebenfalls 5 μ l im stationären System zu und verfährt wie unter 9.6.2 b) beschrieben.

Für alle Inhibierungsversuche werden intravesikulär polymerisierte (2,5% PAA), ConA-gekoppelte Liposomen verwendet.

Tabelle 18: Frequenzänderungen nach Inhibierung der Vesikel

Beschichtung	Analyt	$\Delta F (f_4 - f_3)$
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	10% α -D Mannopyrannosid	7 ± 10 Hz
DSPC + Mannosid VIII (LB-Film)	vorbehandelte Vesikel	40 ± 15 Hz

9.6.4 Adsorptionen micellarer Systeme

Vor jeder Messung werden die Quarzscheiben wie beschrieben gereinigt und neu beschichtet. Die Experimente werden bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in Tris-Puffer (0,15 M; pH 7,3;

[196]) durchgeführt. Der Versuchsaufbau entspricht dem im vorhergehenden Kapitel beschriebenen.

Einheitlich wird bei allen Untersuchungen an micellaren Systemen nach der folgenden Prozedur verfahren:

- 20 min spülen mit Pufferlösung (1 ml/min) (definieren der Basisfrequenz f_1);
- min im „stand by“ Modus (definieren der Basisfrequenz f_2);
- min Durchfluß (f_3 entspr. f_1);
- Einspülen der Analytlösung (2 ml Vorlauf wird verworfen), Zirkulation des Mediums im Kreislauf bis zur Frequenzstabilität (f_4);
- min im „stand by“ Modus (Frequenz f_5);
- min spülen mit Pufferlösung (ermitteln der Endfrequenzen im Durchfluß (f_6) und stationär (f_7)).

Zur Auswertung der Experimente wurden sowohl die Frequenzänderungen im dynamischen System (f_6-f_1) als auch im stationären System (f_7-f_2) miteinander verglichen.

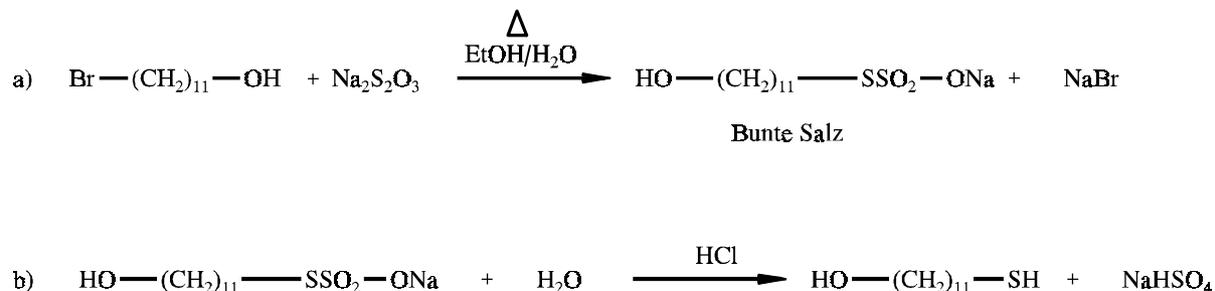
Tabelle 19: Frequenzänderungen bei Adsorption micellarer Systeme

Analyt	dynamisch, f_6-f_1	stationär, f_7-f_2
Na-Desoxycholat	keine Reaktion	keine Reaktion
Na-Cholat	keine Reaktion	keine Reaktion
Na-Desoxycholat/DPPC	18 ± 4 Hz	21 ± 10 Hz
Na-Cholat/DPPC	keine Reaktion	keine Reaktion
Na-Desoxycholat/DPPC/Laurinsäure-Na	55 ± 8 Hz	14 ± 2 Hz
Na-Desoxycholat/DPPC/Palmitinsäure-Na	100 ± 11 Hz	99 ± 12 Hz
Na-Desoxycholat/DPPC/Stearinsäure-Na	124 ± 33 Hz	127 ± 31 Hz
Na-Desoxycholat/DPPC/Ölsäure-Na	36 ± 10 Hz	36 ± 15 Hz

9.7 Herstellung von Thioalkoholen [207]

9.7.1 Mercaptoundecanol

Thiole lassen sich durch Umsetzung von Alkylhalogeniden mit Natriumthiosulfat und anschließende Hydrolyse darstellen. Reaktive Zwischenprodukte bei dieser Umsetzung sind Thioschwefelsäure-S-ester (Bunte Salze), die unmittelbar weiterverarbeitet werden.



Schema 1: Darstellung von 11-Mercaptoundecan-1-ol

a) Darstellung des „Bunte Salzes“ [208]

Man löst 10g (0,038 mol) 11-Bromundecanol in 30 ml Methanol. Unter Rühren gibt man 10 ml Wasser dazu, wobei ein weißer Niederschlag entsteht, der beim Erhitzen auf 85°C verschwindet. Über einen Zeitraum von 30 min tropft man in der Siedehitze eine gesättigte Lösung von 0,04 mol Natriumthiosulfat-Pentahydrat zu und läßt das Reaktionsgemisch anschließend 3 Stunden am Rückfluß kochen. Beim Abkühlen fällt ein weißer, voluminöser Niederschlag aus der abfiltriert und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert wird.

Ausbeute: 8,7 g (75 % d. Theorie)

b) 11-Mercaptoundecan-1-ol

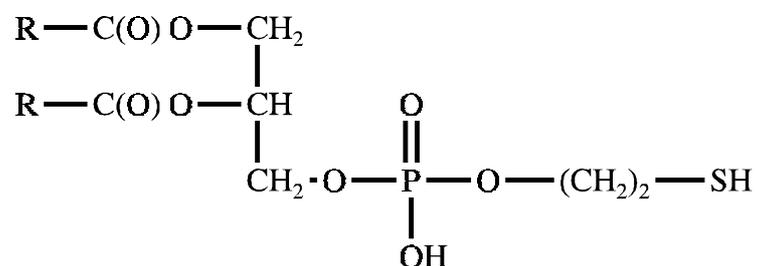
5 g des „Bunte Salzes“ (0,016 mol) werden in 50 ml Ethanol suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml HCl_{konz.} wird 3 Stunden am Rückfluß erhitzt. Anschließend läßt man den Reaktionsansatz abkühlen und versetzt ihn mit Wasser. Der beim Abkühlen entstehende Niederschlag wird mehrfach mit Ether extrahiert anschließend werden die vereinigten organischen Extrakte mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Produkt aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 0,7 g (20 % d. Theorie)

Summenformel	Molmasse	Fp.	C _{ber.} [%]: 64,65	H _{ber.} [%]: 11,84	S _{ber.} [%]: 15,69
C ₁₁ H ₂₄ OS	204,36	73-75°C	C _{gef.} [%]: 64,45	H _{gef.} [%]: 10,59	S _{gef.} [%]: 16,47

9.7.2 Thiolipide

Die in dieser Arbeit verwendeten Thiolipide wurden von Dr. U. Bakowski zur Verfügung gestellt (zur Synthese siehe [209]).



Thiolipid (I): $\text{R} = \text{C}_{13}\text{H}_{27}$ *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanethiol*

Thiolipid (II): $\text{R} = \text{C}_{14}\text{H}_{29}$ *1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanethiol*

Thiolipid (III): $\text{R} = \text{C}_{15}\text{H}_{31}$ *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanethiol*

Thiolipid (IV): $\text{R} = \text{C}_{17}\text{H}_{35}$ *1,2-distearyl-sn-glycero-3-phosphoethanethiol*

10 Zusammenfassung

Der direkte Nachweis von Adsorptionsvorgängen an der Oberfläche speziell beschichteter Signalwandler ermöglicht die Darstellung von Bindungsereignissen in Realzeit. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein umfassendes Konzept zur Anwendung der Quarzmikrobalance als Sensorprinzip zur Charakterisierung supramolekularer bzw. biologischer Strukturen erarbeitet. Schwerpunkt war die Untersuchung von Adsorptionsprozessen an trägerfixierten Lipidschichten. Dabei wurden Wechselwirkungen zwischen supramolekularen Systemen in Realzeit verfolgt und ausgewertet.

Die Entwicklung einer geeigneten Technologie zur Anwendung der QMB-Technik war die Basis der Untersuchungen. Das erforderte einerseits neue Gehäusungstechniken und andererseits die Anwendung geeigneter Beschichtungsverfahren. Mit den im Kapitel 2 vorgestellten Meßzellen war es möglich, eine Vielfalt verschiedener Fragestellungen zu untersuchen. Die neuentwickelten (miniaturisierten) Zellen zeichnen sich vor allem dadurch aus, daß die Quarzscheiben beliebig ausgetauscht werden können. Damit wurde eine Voraussetzung für die Anwendung spezieller Beschichtungsverfahren erfüllt. Durch die Austauschbarkeit der Quarzscheiben war es weiterhin möglich, bei jeder Messung neu hergestellte Schichten zu verwenden. Das erhöht zwar den Arbeitsaufwand beträchtlich, verbessert jedoch gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Mit Untersuchungen zum Impedanzverhalten und zum Phasenverlauf (Kapitel 2) konnte gezeigt werden, daß die akustischen Eigenschaften der Resonatoren durch die verwendete Fixierung unbeeinträchtigt sind. Ein weiterer Vorteil der neu entwickelten Meßzelle besteht in einer Reduzierung des Totvolumens. Damit eignet sich die Konstruktion auch für biochemische Anwendungen, um beispielsweise Analyte in geringen Konzentrationen nachzuweisen. Die neu entwickelte Meßzelle ist wegen des einseitigen Kontakts mit dem Untersuchungsmedium speziell für Applikationen in Flüssigkeiten geeignet. Man kann Untersuchungen sowohl im Durchfluß als auch stationär durchführen. Die Entwicklung der miniaturisierten Meßzelle war Schwerpunkt in der Anfangsphase der experimentellen Tätigkeit.

Ein zweiter Schwerpunkt war die Entwicklung geeigneter Beschichtungstechniken, um biologische Wechselwirkungen erfassen zu können. Im Sinne der Zielstellung waren Untersuchungen an zweidimensional geordneten supramolekularen Strukturen Thema der Arbeiten. Deshalb wurde darauf verzichtet, herkömmliche Proteinbeschichtungen (Kapitel 4) zu verwenden. Einfache Beschichtungstechniken (Auftropfmethode, Air-Brush-Verfahren) wurden eingesetzt, um makrocyclische Modellrezeptoren auf Quarzsensoren zu fixieren. Mit diesen Verfahren wurden ungeordnete Schichten erzeugt, die verschiedene reaktive Zentren (π -elektronenreiche Systeme, polare Gruppen oder Alkylketten) an der Oberfläche ausbilden und in der Lage sind, zwischenmolekulare Wechselwirkungen einzugehen. Demgegenüber konnten durch Fixierung hochgeordneter supramolekularer Schichten auf Sensoroberflächen,

bestimmte Bindungsstellen hervorgehoben und damit Voraussetzungen für spezifische Adsorptionsvorgänge geschaffen werden. Durch die Kopplung von SA-Verfahren und LB-Technik gelang es, „maßgeschneiderte“ Strukturen zu erzeugen. Bei diesem Verfahren wurden Lipidmonoschichten auf Alkanthiol-beschichtete Schwingquarze übertragen. Die Bedeutung dieser Vorgehensweise bestand insbesondere darin, daß die Eigenschaften der Membranschichten in definierter Weise festgelegt werden konnten. So war es möglich, durch die eingebauten Erkennungsstrukturen biologische bzw. biochemische Adsorptionsprozesse in-vitro zu verfolgen. Adsorptionen, die an diesen Schichten stattfanden, wurden durch spezifische Wechselwirkungen (Enzym – Substrat, Kohlenhydrat – Lectin, Kohlenhydrat – Toxin) hervorgerufen. In der Arbeit konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Modellmembranen sowohl mit guter Reproduzierbarkeit auf den Sensoroberflächen fixierbar waren, als auch, daß die Membranen keine viskoelastischen Einflüsse auf das resonante Sensorsystem ausüben.

Die verwendeten Schichtmodelle ermöglichten die Untersuchung folgender Reaktionen:

- 1) Wirt-Gast-Wechselwirkungen wurden mit makrocyclischen Modellrezeptoren untersucht. Dabei kamen Calixaren- und Cavitandbeschichtungen zum Einsatz die aufgrund ihrer speziellen sterischen Form geeignet sind, niedermolekulare Verbindungen zu adsorbieren. Zur Beschichtung wurde das Auftropf- und das Air-Brush-Verfahren verwendet. Dabei entstanden ungeordnete Schichtstrukturen, d.h. die Moleküle besitzen keine Vorzugsorientierung. So treten neben Wechselwirkungen mit den Käfigen zusätzliche Wechselwirkungen, beispielsweise mit den Alkylketten der Verbindungen, auf. Außerdem waren Effekte zu beobachten, die auf Schichteigenschaften (Packungsdichte, Quellverhalten) zurückzuführen sind. Im Ergebnis wurden dennoch selektive Wechselwirkungen zwischen Analyten und Schicht festgestellt, die als Signalmuster mit numerischen Methoden auswertbar sind. Das eigentliche Ziel, d.h. Wechselwirkungen zwischen definierten supramolekularen Strukturen (in diesem Fall Käfigstrukturen) und den Analyten wurde wegen dem geringen Ordnungszustand nicht erreicht. Deshalb sollten nachfolgende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Makromolekülen und supramolekularen Systemen an komplex aufgebauten Lipidschichten neue Erkenntnisse bringen.
- 2) In einem weiteren Schwerpunkt wurden Studien zur Bildung von Enzymbindungen an Modellmembranen durchgeführt. Einleitend wurde das Adsorptionsverhalten von Phospholipase A₂ (PL-A₂) an DSPC und DPPC beschichteten Quarzen bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Bei Versuchen die in der Nähe der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide durchgeführt wurden, waren signifikante Frequenzänderungen zu beobachten. Darauf aufbauend konnte das Adsorptionsverhalten von PL-A₂ an 1-Alkyl-2-acyl-phosphatidylcholinen untersucht werden. Dabei wurde gezeigt, daß die Intensität der Wechselwirkungen (Phospholipase A₂ – Lecithin) von der Struktur, d.h. von der Verzweigung der mittelständigen Fettsäuren der Phospholipide bestimmt wird. Sehr

intensive Wechselwirkungen fanden zwischen PL-A₂ und langkettig verzweigten Fettsäureresten (C₁₄) statt, wohingegen die sterisch weniger anspruchsvollen Derivate geringere Wechselwirkungen mit PL-A₂ zeigten. Die an QMB-Sensoroberflächen durchgeführten Untersuchungen korrelieren mit Studien zum Nachweis der Hydrolyseaktivität von Phospholipase A₂ (pH-stat Titrationsen). Interessant war weiterhin, daß die Spaltung der Fettsäuren (Hydrolyse) nicht mit der massensensitiven Methode nachvollziehbar war. Die Ursache dafür ist im Aufbau der verwendeten Schichten zu sehen (Abbildung 50). Eine Voraussetzung zur Durchführung dieser Untersuchungen war die Verwendung geordneter, trägerfixierter supramolekularer Strukturen. In den weiteren Arbeiten wurde ebenfalls die bewährte Kombination von SA- und LB-Technik verwendet. Darüber hinaus wurden Glycolipide als Erkennungsstrukturen eingebaut.

- 3) Unter Verwendung Glycolipid-modifizierter LB-Filme wurde in einem dritten Schwerpunkt unserer Untersuchungen die Anlagerung von Cholera toxin untersucht. Dabei war es zunächst notwendig, optimale Beschichtungen zu erproben. Eingesetzt wurden LB-Filme mit DSPC (90%) als Matrixlipid und einem Anteil von Gangliosid (10%). Bei Verwendung verschiedener Gangliosidfraktionen war eine deutliche Abhängigkeit der Adsorption von der Struktur der Monosaccharideinheiten festzustellen. Cholera toxin reagierte mit Gangliosiden in der Sequenz G_{M1} > G_{D1a} > G_{D1b} > G_{T1b}. Desweiteren wurde die Affinität und das Aufwuchsverhalten von Antikörpern (anti-G_{M1} und anti Cholera toxin) an spezifisch und unspezifisch beschichteten Sensoren überprüft. Hier ergibt sich ein neuer Ansatz für die Gestaltung spezifischer Beschichtungen für immunologische Untersuchungen.
- 4) Um das Adsorptionsverhalten komplexer Lipidsysteme zu studieren, wurden vesikuläre und micellare Systeme verwendet. Es gelang, nachzuweisen, daß Liposomen an Glycolipid modifizierten LB-Filmen (DSPC-Matrix und Glycolipid) nur dann adsorbieren, wenn spezifische Wechselwirkungen (Lectin-Ligand) vorliegen. Damit wurde gezeigt, daß das Zelladhäsionsmodell nach Bendas et al. geeignet ist, um Adhäsionen und Fusionen an trägerfixierten Modellmembranen zu untersuchen. Weiterhin gelang es, den Einfluß der Struktur der verwendeten Beschichtungen zu überprüfen und schließlich physikalische Eigenschaften der Liposomen zu benennen, die eine Adsorption an der Grenzfläche beeinflussen. Neben den komplexen liposomalen Systemen wurden auch Wechselwirkungen von Gallensalzmischmizellen an trägerfixierten Modellmembranen untersucht. Daraus geht hervor, daß eine spezielle Zusammensetzung der Aggregate Voraussetzung für deren Adsorption an Grenzflächen ist. Eindeutige Haftvorgänge wurden nur bei gemischten Mizellen (Gallensalz/Phospholipid/Fettsäure) gefunden. Diese ternären Systeme adhäreren in Abhängigkeit von der Länge der Alkylketten der Fettsäuren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die QMB-Technik in der Lage ist, verschiedene supramolekulare Wechselwirkungen zu charakterisieren. Das Konzept der Verwendung dünner, geordneter Schichten hat sich ausgezeichnet bewährt, weil Vorteile

sowohl hinsichtlich der resonanten Eigenschaften der Quarzresonatoren als auch hinsichtlich des Einsatzes als biochemische Modellmembranen vorhanden sind. Die Quantifizierung der Wechselwirkungen nach Sauerbrey, d.h. die strikte Ausnutzung der Masseempfindlichkeit der Sensoren, ist jedoch nur in wenigen Fällen gelungen (z.B. Adsorption von Cholera-toxin- β -UE). Zusätzlich zu dem gewünschten Masseffekt treten häufig noch viskoelastische Effekte auf. So wurden bei der Fusion ConA-gekoppelter Liposomen an der Sensoroberfläche Frequenzänderungen von bis zu 1000 Hz gemessen, die mit Veränderungen der Viskosität im Mikrometerbereich an der Oberfläche erklärbar sind. Um den Einfluß viskoser Medien zu modellieren, werden derzeit an der Universität Magdeburg umfangreiche theoretische Untersuchungen zum Verhalten dünner Schichten auf Quarzresonatoren durchgeführt. Arbeiten zur Erprobung der theoretischen Modelle an Polymerschichten wurden unlängst veröffentlicht [210; 211]. Im Ergebnis der Arbeit wird deshalb empfohlen, die erhaltenen Modelle sowohl auf ultradünne monomolekulare Beschichtungen als auch auf aggregierte Systeme (Micellen, Liposomen, Zellen) zu übertragen, um eine Trennung von Masse- und Viskositätseffekt zu erhalten.

Weiterhin sollte man sich darauf konzentrieren, die QMB-Methode mit anderen Meßtechniken zu kombinieren. Zusätzliche Informationen zum Adsorptionsverhalten von Analyten ließen sich z.B. durch elektrochemische oder optische Methoden gewinnen. Um die empirisch gewonnenen Erkenntnisse zu untermauern, sollte bei künftigen Projekten die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit theoretischen Arbeitsgruppen noch größere Beachtung finden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden neue Ansatzpunkte zur Charakterisierung von Wechselwirkungen biochemischer, pharmazeutischer oder biologischer Systeme mit der QMB-Technik erarbeitet. Die Untersuchungen umfassen nur ein kleines Teilgebiet aus dem riesigen Spektrum möglicher Applikationen. Dennoch wurde Wert darauf gelegt, möglichst repräsentative Studien durchzuführen die als Ausgangspunkt für weitere Anwendungen dienen sollen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt steht ein komplettes QMB-Analysesystem zur Verfügung, das auf Basis der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen experimentellen Erfahrungen angefertigt wurde. Die zukünftigen Arbeiten werden sich thematisch unmittelbar an die hier vorgestellten Untersuchungen anschließen. Mit der jetzt zur Verfügung stehenden experimentellen Ausrüstung sollte es möglich sein, die Adhäsion komplexerer supramolekularer Systeme (natürliche Zellen) an Sensoroberflächen in Realzeit zu verfolgen und damit einen Beitrag für die Tierversuch-reduzierende Wirkstoffforschung zu leisten.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer und wissenschaftlichen Lehrer Herrn Prof. Dr. R.H.H. Neubert für seine zahlreichen Anregungen, seine Unterstützung und die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Problematik

Ich danke allen Mitarbeitern des Fachbereiches Pharmazie, insbesondere der Arbeitsgruppe Biopharmazie, die durch Hilfsbereitschaft und in einer freundschaftlichen Atmosphäre einen Anteil zur Entstehung der Arbeit beigetragen haben.

Für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der QMB-Experimente bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des ifak e.V. Magdeburg, Arbeitsgruppe Meß- und Sensortechnik und bei den Mitarbeitern des Instituts für Prozeßmeßtechnik/Elektronik der Universität Magdeburg unter Leitung von Prof. Dr. P. Hauptmann. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Hartmann, der durch seine unermüdliche Gesprächsbereitschaft und seine zahlreichen praktischen Hinweise wesentlichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hatte.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. U. Rothe am Institut für physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität bedanke ich mich für die Möglichkeit, in ihrem Labor Untersuchungen an dünnen Schichten durchzuführen. Herrn Doz. Dr. U. Rothe möchte ich besonders für seine Diskussionsbereitschaft danken und Herrn Dr. U. Bakowski danke ich für die Durchführung der ellipsometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen sowie für die Einweisung in die Filmwaagetchnik und viele interessante Gespräche.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. G. Bendas am Institut für Pharmazeutische Chemie für die Herstellung und Modifizierung der Liposomen sowie für viele Hinweise die mir sehr geholfen haben.

Mein herzlicher Dank richtet sich außerdem an Herrn J. Jakob für die Synthese der Phosphatidylcholine und die Durchführung der pH-stat Titrationsen.

Herrn Dr. J. Müthing danke ich für die Bereitstellung der Gangliosidfraktionen und für seine Idee zur Untersuchung der Toxinwechselwirkungen.

Bei Herrn Dipl. Chem. B. Koch vom BSL Olefinverbund GmbH bedanke ich mich für die Durchführung der Kontaktwinkeluntersuchungen.

Schließlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. E. Dalcanale, Herrn Prof. R. Ungaro und Herrn S. Levi von der Universität Parma (Italien) für die Bereitstellung der Calixarene und Cavitanden. Herrn S. Levi danke ich besonders für die gemeinsamen Experimente.

Ganz besonders bedanke ich mich abschließend für die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt der Martin-Luther-Universität unter Leitung von Herrn Reese, mit deren Hilfe wir kreativ an der Weiterentwicklung des Zellendesigns arbeiten konnten.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Bigelow: *The Complete Works of Benjamin Franklin*: G.P. Putnam's Sons: New York 1887
- [2] K.B. Blodgett, I. Langmuir: *Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties*: Phys. Review **51** (1937) 964-982
- [3] M. Ahlers, W. Müller, A. Reichert, H. Ringsdorf, J. Venzer: *Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten – Wege zur Simulation von Biomembranprozessen*: Angew. Chem. **102** (1990) 1310-1327
- [4] K. Yun, E. Kobatake, T. Haruyama, M.-L. Laukkanen, K. Keinänen, M. Aizawa: *Use of a Quartz Crystal Microbalance to Monitor Immunoliposome-Antigen Interaction*: Anal. Chem. **70** (1998) 260-264
- [5] B.M. Paddle: *Biosensors for Chemical and Biological Agents of Defence Interest*: Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 1079-1113
- [6] E.A.H. Hall: *Biosensoren*: Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York 1995
- [7] B. Danielsson, B. Mattiasson, K. Mosbach: *Enzyme Thermistor Devices and their Analytical Applications*: Appl. Biochem. Bioeng. **3** (1981) 97-143
- [8] T. Scheper: *Bioanalytik*: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH: Braunschweig 1991
- [9] G.F. Blackburn: *Chemically Sensitive Field Effect Transistors; in Biosensors – Fundamentals and Applications*: Oxford Science Publication, Oxford, 1987
- [10] A.J. Bard, L.R. Faulkner: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*: John Wiley and Sons: New York 1980
- [11] Y. Ikariyama, M. Furuki, M. Aizawa: *Sensitive Bioaffinity Sensor with Metastable Molecular Complex Receptor and Enzyme Amplifier*: Anal. Chem. **57** (1985) 496-500
- [12] M.A. Nabi Rahni, G.G. Guilbault, N.G. deOlivera: *Immobilized Enzyme Electrode for the Determination of Oxalate in Urin*: Anal. Chem. **58** (1986) 523-526
- [13] S.O. Enfors: *Oxygen-stabilized Enzyme Electrode for D-Glucose Analysis in Fermentation Broths*: Enzyme Microb. Technol. **3** (1981) 29
- [14] B. Drapp, G. Gauglitz, J. Ingenhoff, B. Wolf: *Simulation of Transversal Modul Fields Integrated Optic Components*: Anal. Chim. Acta **265** (1992) 267-275
- [15] M.R.S. Fuh, L.W. Burgess, G.D. Christian: *Single Fiber-Optic Fluorescence Enzyme-Based Sensor*: Anal. Chem. **60** (1988) 433-435
- [16] W. Trettnak, M.J.P. Leiner, O.S. Wolfbeis: *Fiber-Optic Glucose Sensor with a pH Optrode as a Transducer*: Biosensors **4** (1988) 15-26
- [17] J. Wangsa, M.A. Arnold: *Fiber-Optic Biosensors Based on the Fluorimetric Detection of Reduced Nicotinamid Adenine Dinucleotide*: Anal. Chem. **60** (1988) 1080-1082
- [18] E.A.H. Hall: *Entwicklungen in der Biosensor-Technologie*: Bio-Engineering **1** (1988) 21-28
- [19] BIACORE (<http://www.pnu.com/biosensor/>); Affinity SENSORS (<http://www.affinity-sensors.com/>); IBIS-Datenblätter der Fa. Intersens Instruments BV (in Dt. vertreten durch XanTec Analysensysteme GbR)
- [20] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström: *Biosensing with Surface Plasmon Resonance – How it all Started*: Biosensors and Bioelectronics **10** (1995) i-ix
- [21] C.Lu, A.W. Czanderna: *Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances*: Elsevier: Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1984
- [22] G.G. Guilbault, J.H. Luong: *Gas Phase Biosensors*: J. Biotechn. **9** (1988) 1-10
- [23] M.S. Nieuwenhuizen, A. Venema: *Sensors, a Comprehensive Survey*, Vol. 2/3(13) Mass-Sensitive Devices: VCH-Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim (1991) 648-680
- [24] J.C. Andle, J.F. Vetelino: *Acoustic Wave Biosensors*: Sensors and Actuators A **44** (1994) 167-176

-
- [25] C. Kößlinger, E. Uttenthaler, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf, G. Brimk, A. Stanglmaier, E. Sackmann: *Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies on immunological applications*: Sensors and Actuators B **24-25** (1995) 107-112
- [26] M. Alvarez-Icaza, U. Bilitewski: *Mass Production of Biosensors*: Anal. Chem. **65** (1993) 525A-553A
- [27] F. Vianello, A. Stefani, M.L. Dipaolo, A. Rigo, A. Lui, B. Margesin, M. Zen, M. Scarpa, G. Soncini: *Potentiometric Detection of Formaldehyde in Air by an Aldehyde Dehydrogenase FET*: Sensors and Actuators B **37** (1996) 49-54
- [28] M. Maske, A. Strauß: *Enzyme Thermistor Analysis of Kinetics and Stability of Immobilized Invertase*: Anal. Letters **26** (1993) 1613
- [29] W. Zhang, H.D. Chang, G.A. Rechnitz: *Dual Enzyme Fiber Optic Biosensor for Pyruvate*: Anal. Chim. Acta **350** (1997) 59-65
- [30] B. König, M. Grätzel: *A Piezoelectric Immunosensor for Hepatitis Viruses*: Anal. Chim. Acta **309** (1995) 19-25
- [31] E. Katz, I. Willner: *Amperometric Amplification of Antigen Antibody Association at Monolayer Interfaces: Design of Immunosensor Electrodes*: J. of Electroanal. Chem. **418** (1996) 67-72
- [32] V.B. Pizziconi, D.L. Page: *A Cell Based Immunobiosensor with Engineered Molecular Recognition Design Feasibility*: Biosensors and Bioelectronics **12** (1997) 287-299
- [33] A.P. Osipov, N.V. Zaitseva, A.M. Egorov: *Chemiluminescent Immunoenzyme Biosensor with a Thin Layer Flow Through Cell: Application for Study a Real Time Biomolecular Antigen Antibody Interaction*: Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 881-887
- [34] D.S. Koh, B. Hille: *Modulation by Neurotransmitters of Catecholamine Secretion from Sympathetic Ganglion Neurons Detected by Amperometry*: Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **94** (1997) 1506-1511
- [35] K.M. Hahnenberger, S.E. Kurtz: *A Drug Screening Program for Ion Channels Expressed in Yeast*: Trends in Biotechn. **15** (1997) 1-4
- [36] J. Wang, G. Rivas, X.H. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P.A.M. Farias, F.S. Valera, D.H. Grant, M. Ozsoz, M.N. Flair: *DNA Electrochemical Biosensors for Environmental Monitoring: A Review*: Anal. Chim. Acta **347** (1997) 1-8
- [37] J. Wang, X.H. Cai, G.Rivas, H. Shiraishi: *Stripping Potentiometric Transduction of DNA Hybridization Processes*: Anal. Chim. Acta **326** (1996) 141-147
- [38] F. Kleinjung, F.F. Bier, A. Warsinke, F.W. Scheller: *Fibre Optic Genosensor for Specific Determination of Femtomolar DNA Oligomers*: Anal. Chim. Acta **350** (1997) 51-58
- [39] K. Niikura, K. Nagata, Y. Okahata: *Quantitative Detection of Protein Binding onto DNA by Using a Quartz Crystal Microbalance*: Chemistry Letters (1996) 863-864
- [40] E.E. Szabo, N. Adanyi, M. Varadi: *Application of Biosensor for Monitoring Galactose Content*: Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 1051-1058
- [41] R. Koneke, C. Menzel, R. Ulber, K. Schugerl, T. Scheper, M. Saleemuddin: *Reversible Coupling of Glycoenzymes on Fluoride Sensitive FET Biosensors Based on Lectin Glucoprotein Binding*: Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 1229-1236
- [42] J. Jonata, M. Josowicz, D.M. DeVaney: *Chemical Sensors*: Anal. Chem. **66** (1994) 207R-228R
- [43] *Kleine Enzyklopädie Struktur der Materie*: Bibliographisches Institut: Leipzig 1982
- [44] J.W. Grate, S.J. Martin, R.M. White: *Acoustic Wave Microsensors (Part I)*: Anal. Chem. **65** (1993) 940A-986A
- [45] J.W. Grate, S.J. Martin, R.M. White: *Acoustic Wave Microsensors (Part II)*: Anal. Chem. **65** (1993) 987A-997A
- [46] F. Möller, J. Kuhn: *SAW Resonator Temperature Sensor*: Sensors and Actuators A **30** (1992) 73-75
-

-
- [47] L. Mingfang, I. Haiguo: *SAW Temperature and Humidity Sensor with high Resolution*: Sensors and Actuators B, **12** (1993) 53-56
- [48] E.T. Zelllers, S.A. Batterman, M. Han, S.J. Patrash: *Optimal Coating Selection for the Analysis of Organic Vapor Mixtures with Polymer-Coated Surface Acoustic Wave Sensor Arrays*: Anal. Chem. **67** (1995) 1092-1106
- [49] S.J. Martin, G.C. Frye, S.D. Senturia: *Dynamics and Response of Polymer-Coated Surface Acoustic Wave Devices: Effect of Viscoelastic Properties and Film Resonance*: Anal. Chem. **66** (1994) 2201-2219
- [50] J. Kondoh, Y. Matsui, S. Shiokawa: *SH-SAW Biosensor Based on pH-Change*: 1993 IEEE Ultrasonics Symp., Baltimore, MD, USA: (1993) 337-340
- [51] J. Kondoh, S. Shiokawa: *SH-SAW Taste Sensor Based on Acoustoelectric Interactions*: 1993 IEEE Ultrasonics Symp., Baltimore, MD, USA: (1993) 421-424
- [52] P. H. Carr, A. Jhunjhunwala, L.A. Veilleux, J.F. Vetelino, J.C. Field: *New Low Loss High Coupling Mode up to 1 GHz on LiNbO₃*: Proc. 1977 IEEE Ultrasonics Symp., Phoenix, AZ, USA: (1977) 579-584
- [53] A.J. Ricco, S.J. Martin: *Acoustic Wave Viscosity Sensor*: Appl. Phys. Lett. **50** (1987) 1474-1476
- [54] J.C. Andle, J.F. Vetelino, R.M. Lec, D.J. McAllister: *An Acoustic Plate Mode Immunosensor*, 1989 IEEE Ultrasonics Symp., Montreal, Canada: (1989) 579-584
- [55] B.J. Costello, S.W. Wenzel, R.M. White: *Density and Viscosity Sensing with Ultrasonic Flexural Plate Waves*: Proceedings of the 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Yokohama: (1993) 704-707
- [56] S. Wenzel, R. White: *Analytic Comparison of the Sensitivities of Bulk-Wave, Surface-Wave and Flexural Plate-Wave Ultrasonic Gravimetric Sensors*: Appl. Phys. Lett., **54** (1989) 1976-1978
- [57] H.K. Pulker, H. Hilbrand: *Der Einfluß der Temperatur auf die Meßgenauigkeit bei der kontinuierlichen Dickenmessung von Aufdampfschichten mit dem Schwingquarz*: Z. angew. Phys. **23** (1967) 15-20
- [58] (a) L.P. May, M.P. Byfield, M. Lindstrom, L.F. Wunsche: *Chiral Discrimination Using a Quartz Crystal Microbalance and Comparison with Gas Chromatographic Retention Data*: Chirality **9** (1997) 225-232
(b) Chemosensor-System QMB 6: *Intelligentes Sensorsystem zur Geruchstofferkennung*: Produktblatt der Fa. MITU Laborbedarf GmbH Greifenberg (März 1995); (c) G. Horner, B. Vonach: *Ein intelligentes Sensor-System erkennt Gerüche*: Laborpraxis **4** (1995) 28-30
- [59] (a) J. Hartmann, J. Auge, P. Hauptmann: *Using the Quartz Crystal Microbalance Principle for Gas Detection with Reversible and Irreversible Sensors*: Sensors and Actuators B **18-19** (1994) 429-433; (b) J. Hartmann, P. Hauptmann, S. Levi, E. Dalcanale: *Chemical Sensing with Cavitands: Influence of Cavity Shape and Dimensions on the Detection of Solvent Vapors*: Sensors and Actuators B **35-36** (1996) 154-157
- [60] I.I. Postnikov: *Effect of Temperature on Frequency Characteristics of Contoured Quartz Thickness-Shear-Type Vibrators*: Acoustical Physics **40** (1994) 586-592
- [61] J. Auge; Dissertation: Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (1995)
- [62] L. Spassov: *Piezoelectric Quartz Resonators as Highly Sensitive Temperature Sensors*: Sensors and Actuators A **30** (1992) 67-72
- [63] G. Sauerbrey: *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*: Z. Phys. **155** (1959) 206-222
- [64] R. Schumacher: *Die Quarzmikrowaage: Eine neue Meßtechnik zur in-situ Untersuchung des Phasengrenzbereiches fest/flüssig*: Angew. Chemie. **102** (1990) 347-361
- [65] K.K. Kanazawa, J.G. Gordon II: *Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid*: Anal. Chem. **57** (1985) 1770-1771
- [66] K.K. Kanazawa, J.G. Gordon II: *The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with a Liquid*: Anal. Chim. Acta **175** (1985) 99-105
-

-
- [67] D. Mende, G. Simon: *Physik, Gleichungen und Tabellen*: Fachbuchverlag Leipzig 1975
- [68] J. Auge, P. Hauptmann; J. Hartmann, S. Rössler: *New Design for QCM-Sensor in Liquids*: Sensors and Actuators B **24-25** (1995) 43-48
- [69] K.S. van Dyke: *The Piezoelectric Survey of Strain Pattern on Thickness Shear Quartz Resonators*: Proceedings of the 10th Frequency Control Symposium, Fort Monmouth 1956
- [70] R. Bechmann: *Dickenscherswingungen piezoelektrisch erregter Kristallplatten*: Hochfrequenztechnik und Elektroakustik **56** (1950) 17-21
- [71] G. Sauerbrey: *Amplitudenverteilung und elektrische Ersatzdaten von Schwingquarzplatten (AT-Schnitt)*: Mitteilung aus dem 1. Physikalischen Institut der TU Berlin AEO **18** (1961) 624-628
- [72] S.J. Martin, V.E. Granstaff, G.C. Frye: *Characterization of a Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading*: Anal. Chem. **63** (1991) 2272-2281
- [73] V.E. Granstaff, V. Edwards, S.J. Martin: *Characterization of a Thickness Shear Mode Quartz Resonator with Multiple Nonpiezoelectric Layers*: J. Appl. Physics **75** (1994) 1238-1245
- [74] J. Auge, P. Hauptmann, F. Eichelbaum, S. Rössler: *Quartz Crystal Microbalance Sensor in Liquids*: Sensors and Actuators B **18-19** (1994) 518-522
- [75] S. Rössler: Dissertation Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg 1997
- [76] Recherche in Chemical Abstracts; Stichwort: „quartz crystal microbalance“
- [77] H.K. Pulker, H. Hilbrand: *Der Einfluß der Temperatur auf die Meßgenauigkeit bei der kontinuierlichen Dickenmessung von Aufdampfschichten mit dem Schwingquarz*: Z. angew. Phys. **23** (1967) 15-20
- [78] P. Hauptmann, R. Lucklum, J. Hartmann, J. Auge, B. Adler: *Using the Quartz Microbalance Principle for Sensing Mass Changes and Damping Properties*: Sensors and Actuators A **37-38** (1993) 309-316
- [79] E. Dalcanale, J. Hartmann: *Selective Detection of Organic Compounds by Means of Cavitand-Coated QCM Transducers*: Sensors and Actuators B **24-25** (1995) 39-42
- [80] X.C. Zhou, L. Zhong, S.F.Y. Li, S.C. Ng, H.S.O. Chan: *Organic Vapour Sensors Based on Quartz Crystal Microbalance Coated with Self-Assembled Monolayers*: Sensors and Actuators B **42** (1997) 59-65
- [81] M. Ho, G.G. Guilbault, E.P. Scheide: *Detection of Carbon Monoxide in Ambient Air with a Piezoelectric Crystal*: Anal. Chem. **52** (1982) 1998-2002
- [82] A. Suleiman, G.G. Guilbault: *A Coated Piezoelectric Crystal Detector for Phosgene*: Anal. Chim. Acta **162** (1984) 97-102
- [83] J. Hlavay, G.G. Guilbault: *Detection of Hydrogen Chloride Gas in Ambient Air with a Coated Piezoelectric Quartz Crystal*: Anal. Chem. **50** (1978) 965-967
- [84] J.F. Alder, A.E. Bentley, P.K.P. Drew: *Determination of Hydrogen Cyanide in Air Using Mass Amplification by Heavy Ligand Replacement on a Coated Quartz Piezoelectric Crystal*: Anal. Chim. Acta: **182** (1986) 123-131
- [85] (a) H.M. Fog, B. Rietz: *Piezoelectric Crystal Detector for the Monitoring of Ozone in Working Environments*: Anal. Chem. **57** (1985) 2634-2638; (b) B. Adler, J. Hartmann: unveröffentlichte Ergebnisse
- [86] G.G. Guilbault: *Determination of Formaldehyde with an Enzyme-Coated Piezoelectric Crystal Detector*: Anal. Chem. **55** (1983) 1682-1684
- [87] J. Ngeh.Ngwainbi, P.H. Foley, S.S. Kuan, G.G. Guilbault: *Parathion Antibodies on Piezoelectric Crystals*: J. Am. Chem. Soc. **108** (1986) 5444-5447
- [88] A. Shons, F. Dorman, J. Najarian: *A Immunospecific Microbalance*: J. Biomed. Meter. Res. **6** (1972) 565-570
- [89] M. Thompson, C.L. Arthur, G.K. Dhaliwal: *Liquid-Phase Piezoelectric and Acoustic Transmission Studies of Interfacial Immunochemistry*: Anal. Chem. **55** (1986) 1206-1209
-

-
- [90] J.R. Sportsman, G.S. Wilson: *Chromatographic Properties of Silica-Immobilized Antibodies*: Anal. Chem. **52** (1980) 2013-2018
- [91] H. Muramatsu, J.M. Dicks, E. Tamiya, I. Karube: *Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins*: Anal. Chem. **59** (1987) 2760-2763
- [92] K.A. Davis, T.R. Leary: *Continuous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for Kinetic Immunoassays*: Anal. Chem. **61** (1989) 1227-1230
- [93] R.C. Ebersole, M.D. Ward: *Amplified Mass Immunosorbent Assay with a Quartz Crystal Microbalance*: J. Am. Chem. Soc. **110** (1988) 8623-8628
- [94] C. Kößlinger, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf, S. Koch, P. Woias: *A Quartz Crystal Biosensor for Measurements in Liquids*: Biosensors and Bioelectronics **7** (1992) 397-404
- [95] G.G. Guilbault, B. Hock, R. Schmid: *A Piezoelectric Immunobiosensor for Atrazine in Drinking Water*: Biosensors and Bioelectronics **7** (1992) 411-419
- [96] K. Yokoyama, K. Ikebukuro, E. Tamiya, I. Karube, N. Ichiki, Y. Arikawa: *Highly Sensitive Quartz Crystal Immunosensor for Multisample Detection of Herbicides*: Anal. Chim. Acta **304** (1995) 139-145
- [97] C. Steegborn, P. Skládal: *Construction and Characterization of the Direct Piezoelectric Immunosensor for Atrazine Operating in Solution*: Biosensors and Bioelectronics **12** (1997) 19-27
- [98] J. Horáček, P. Skládal: *Improved Direct Piezoelectric Biosensor Operating in Liquid Solution for the Competitive Label-Free Immunoassay of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid*: Anal. Chim. Acta **347** (1997) 43-50
- [99] L. Tessier, F. Patat, N. Schmitt, M. Lethiecq, Y. Frangin, D. Guilloteau: *Significance of Mass and Viscous Loads Discrimination for an AT-Quartz Blood Group Immunosensor*: Sensors and Actuators B **18-19** (1994) 698-703
- [100] L. Tessier, N. Schmitt, H. Watier, V. Brumas, F. Patat: *Potential of the Thickness Shear Mode Acoustic Immunosensors for Biological Analysis*: Anal. Chim. Acta **347** (1997) 207-217
- [101] K. Nakanishi, I. Karube, S. Hiroshi, A. Uchida, Y. Ishida: *Detection of the Red Tide-Causing Plankton *Chatonella marina* Using a Piezoelectric Immunosensor*: Anal. Chim. Acta **325** (1996) 73-80
- [102] I. Ben-Dov, I. Willner, E. Zisman: *Piezoelectric Immunosensors for Urine Specimens of *Chlamydia trachomatis* Employing Quartz Crystal Microgravimetric Analyses*: Anal. Chem. **69** (1997) 3506-3512
- [103] N.C. Fawcett, J.A. Evans, L.-C. Chien, N. Flowers: *Nucleic Acid Hybridization Detected by Piezoelectric Resonance*: Anal. Letters **21** (1988) 1099-1114
- [104] Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijiri, M. Mukae, A. Murakami, K. Makino: *Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance*: J. Am. Chem. Soc. **114** (1992) 8299-8300
- [105] Y. Okahata, K. Ijiri, Y. Matsuzaki: *A DNA-Lipid Cast Film on a Quartz-Crystal Microbalance and Detection of Intercalation Behaviors of Dye Molecules into DNAs in an Aqueous Solution*: Langmuir **9** (1993) 19-21
- [106] K. Niikura, K. Nagata, Y. Okahata: *Quantitative Binding of Protein Binding onto DNA by Using a Quartz-Crystal Microbalance*: Chemistry Letters (1996) 863-864
- [107] S. Yamaguchi, T. Shimomura, T. Tatsuma, N. Oyama: *Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz Crystal Oscillators*: Anal. Chem. **65** (1993) 1925-1927
- [108] N. Oyama, S. Yamaguchi, T. Shimomura, K. Miki: *Method for Determination of DNA and Sensor Therefor*: EP 0 587 408 A1 (1993)
- [109] H. Su, M.R. Kallury, M. Thompson, A. Roach: *Interfacial Nucleic Acid Hybridization Studied by Random Primer 32P Labelling and Liquid-Phase Acoustic Network Analysis*: Anal. Chem. **66** (1994) 769-777
- [110] H. Su, P. Williams, M. Thompson: *Platinum Anticancer Drug Binding to DNA Detected by Thickness-Shear-Mode Acoustic Wave Sensor*: Anal. Chem. **67** (1995) 1010-1013
-

-
- [111] H. Su, S. Chong, M. Thompson: *Kinetics of Hybridization of Interfacial RNA Homopolymer Studied by Thickness-Shear Mode Acoustic Wave Sensor*: *Biosensors and Bioelectronics* **12** (1997) 161-173
- [112] K. Ito, K. Hashimoto, Y. Ishimori: *Quantitative Analysis for Solid-Phase Hybridization Reaction and Binding Reaction of DNA Binder to Hybrids Using a Quartz Crystal Microbalance*: *Anal. Chim. Acta* **327** (1996) 29-35
- [113] M.D. Ward, R.C. Ebersole: *Enzymatically Amplified Piezoelectric Specific Binding Assay*: US Patent 4,999,284 (1991)
- [114] Y. Okahata, Y. Ebara: *Observation of Phospholipase A2 Activity Towards the Hydrolysis of Phospholipid Langmuir-Blodgett Films Deposited on a Quartz-Crystal Microbalance*: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1992) 116-117
- [115] S.J. Lasky, D.A. Buttry: *Development of a Real-Time Glucose Biosensor by Enzyme Immobilization on the Quartz Crystal Microbalance*: *Am. Biotechnol. Lab.* **8** (1990) 8-16
- [116] J. Rishpon, S. Gottesfeld: *Investigation of Polypyrrole-Glucose Oxidase Electrodes by Ellipsometric, Microgravimetric and Electrochemical Measurements*: *Biosensors and Bioelectronics* **6** (1991) 143-150
- [117] N. Damrongchai, K. Yun, E. Kobatake, M. Aizawa: *Self-Assembling of Glutathione S-transferase/Calmodulin Fusion Protein on Chemically Modified Gold Surface*: *J. Biotechnol.* **55** (1997) 125-133
- [118] H. Muramatsu, K. Kimura, T. Ataka, R. Homma, Y. Miura, I. Karube: *A Quartz Crystal Viscosity Sensor for Monitoring Coagulation Reaction and its Application to a Multichannel coagulation Detector*: *Biosensors and Bioelectronics* **6** (1991) 353-358
- [119] L. Bao, L. Deng, L. Nie, S. Yao, W. Wie: *Determination of Microorganisms with a Quartz Crystal Microbalance Sensor*: *Anal. Chim. Acta* **319** (1996) 97-101
- [120] L. Bao, L. Deng, L. Nie, S. Yao, W. Wie: *A Rapid Method for Determination of Proteus vulgaris with a Piezoelectric Quartz Crystal Sensor Coated with a Thin Liquid Film*: *Biosensors and Bioelectronics* **11** (1996) 1193-1198
- [121] K. Chen, D. Le, H. Zhang, L. Nie, S. Yao: *Model of a Quartz Crystal Microbe Growth Sensor and its Application to Estimation of Microbial Populations in Mineral Waters*: *Anal. Chim. Acta* **329** (1996) 83-89
- [122] L. Deng, L. Bao, W. Wie, L. Nie, S. Yao: *Continuous Measurement of Bacterial Populations on the Surface of a Solid Medium with a Thickness Shear Mode Acoustic Resonator in Series*: *Enzyme Microb. Technol.* **19** (1996) 525-528
- [123] Y. Okahata, H. Ebato, K. Taguchi: *Specific Adsorption of Bitter Substances on Lipid Bilayer-coated Piezoelectric Crystals*: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1987) 1363-1365
- [124] Y. Okahata, H. Ebato, X. Ye: *Molecular Selective Adsorption on a Multilayer-coated Piezoelectric Crystal*: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988) 1037-1038
- [125] Y. Okahata, H. Ebato: *Adsorption Behaviour of Local Anaesthetics in Synthetic Lipid Membranes Coated on a Quartz-crystal Microbalance and Correlation with their Anaesthetic Potencies*: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (1991) 475-480
- [126] Y. Okahata, H. Ebato: *Absorption Behaviors of Surfactant Molecules on a Lipid-Coated Quartz-Crystal Microbalance. An Alternative to Eye-Irritant Tests*: *Anal. Chem.* **63** (1991) 203-207
- [127] Y. Ebara, Y. Okahata: *In Situ Surface-Detecting Technique by Using a Quartz-Crystal Microbalance. Interaction Behaviors of Proteins onto a Phospholipid Monolayer at the Air-Water Interface*: *Langmuir* **9** (1993) 574-576
- [128] Y. Ebara, Y. Okahata: *A Kinetic Study of Concanavalin A Binding to Glycolipid Monolayers by Using a Quartz-Crystal Microbalance*: **116** (1994) 11209-11212
-

-
- [129] R.C. Ebersole, J.A. Miller, J.R. Moran, M.D. Ward: *Spontaneously Formed Functionally Active Avidin Monolayers on Metal Surfaces: A Strategy for Immobilizing Biological Reagents and Design of Piezoelectric Biosensors*: J. Am. Chem. Soc. **112** (1990) 3239-3241
- [130] H. Ebato, J.N. Herron, W. Müller, Y. Okahata, H. Ringsdorf, P. Succi: *Docking of a Second Functional Protein Layer to a Streptavidin Matrix on a Solid Support: Studies with a Quartz Crystal Microbalance*: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **31** (1992) 1087-1089
- [131] J.J. Chance, W.C. Purdy: *Bile Acid Measurements Using a Cholestyramine-Coated TSM Acoustic Wave Sensor*: Anal. Chem. **68** (1996) 3104-3111
- [132] H-C- Chang, C.-C. Yang, T.-M. Yeh: *Detection of Lipopolysaccharide Binding Peptides by the Use of a Lipopolysaccharide-coated Piezoelectric Crystal Biosensor*: Anal. Chim. Acta **340** (1997) 49-54
- [133] Datenblätter: Dr. Födisch Umweltmeßtechnik GmbH, Zwenkauer Str. 22, 04420 Kulkwitz
- [134] Datenblätter: ifak e.V. Magdeburg, Steinfeldstr. 3, 39179 Barleben
- [135] HKR Sensorsysteme; Datenblätter: MITU Laborbedarf GmbH, Landsberger Str. 13, 86926 Greifenberg
- [136] Datenblätter: Seiko EG&G GmbH, Dr. Maurer, Hohenlindener Str. 12, 81677 München (System QCA-917)
- [137] <http://www.ifak.fhg.de>
- [138] C.R. Suri, G.C. Mishra: *Activating Piezoelectric Crystal Surface by Silanization for Microgravimetric Immunobiosensor Application*: Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 1199-1205
- [139] S. Yamaguchi, T. Shimomura, T. Tatsuma, N. Oyama: *Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz Crystal Oscillators*: Anal. Chem. **65** (1993) 1925-1927
- [140] E. Roederer, G.J. Bastiaans: *Microgravimetric Immunoassay with Piezoelectric Crystals*: Anal. Chem. **55** (1983) 2333-2336
- [141] Cooper: *Biochemische Arbeitsmethoden*: de Gruyter Verlag: Berlin 1981
- [142] H. Muramatsu, J.M. Dicks, E. Tamiya, I. Karube: *Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins*: Anal. Chem. **59** (1987) 2760-2763
- [143] M. Horisberger, M.F. Clere: *Labelling of Colloidal Gold with Protein A*: Histochemistry **82** (1985) 219-223
- [144] K.A. Davis, T.R. Leary: *Continuous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for Kinetic Immunoassays*: Anal. Chem. **61** (1989) 1227-1230
- [145] F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata: *Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development*: Anal. Chem. **69** (1997) 2043-2049
- [146] I. Ben-Dov, I. Willner, E. Zisman: *Piezoelectric Immunosensors for Urine Specimens of *Chlamydia trachomatis* Employing Quartz Crystal Microbalance Microgravimetric Analyses*: Anal. Chem. **69** (1997) 3506-3512
- [147] G.G. Guilbault, B. Hock, R. Schmid: *A Piezoelectric Immunobiosensor for Atrazine in Drinking Water*: Biosensors and Bioelectronics **7** (1992) 411-419
- [148] K. Yokoyama, K. Ikebukuro, E. Tamiya, I. Karube, N. Ichiki, Y. Arikawa: *Highly Sensitive Quartz Crystal Immunosensors for Multisample Detection of Herbicides*: Anal. Chim. Acta **304** (1995) 139-145
- [149] K. Nakanishi, I. Karube, S. Hiroshi, A. Uchida, Y. Ishida: *Detection of the Red Tide-causing Plankton *Chattonella marina* Using a Piezoelectric Immunosensor*: Anal. Chim. Acta **325** (1996) 73-80
- [150] (a) C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo: *Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold*: J. Am. Chem. Soc. **111** (1989) 321-335 (b) C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides: *Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Head Group, Tail Group and Solvent*: J. Am. Chem. Soc. **111** (1989) 7155-7164 (c) C.D. Bain, G.M. Whitesides: *Formation of Monolayers by the Coadsorption of*
-

- Thiols on Gold: Variation in the Length of the Alkyl Chain*: J. Am. Chem. Soc. **111** (1989) 7164-7175 (d)
R.G. Nuzzo, F.A. Fusco, D.L. Allara: *Spontaneous Organized Molecular Assemblies. Formation, Dynamics, and Physical Properties of n-Alkanoic Acids Adsorbed from Solution*: J. Am. Chem. Soc. **109** (1987) 2358-2368
- [151] E.U.T. vanVelzen: Dissertation, Universität Twente 1994
- [152] LAUDA Tensiometer, Technische Beschreibung
- [153] Kohlrausch: *Praktische Physik*: B.G. Teubner Verlag: Stuttgart 1985
- [154] R.W. Collins, Y.-T. Kim: *Ellipsometry for Thin-Film and Surface Analysis*: Anal. Chem. **62** (1990) 887-900
- [155] R.M.A. Azzam, N.M. Bashara: *Ellipsometry and Polarized Light*, Amsterdam; Holland (1977)
- [156] Simulationssoftware *Alchemy III*
- [157] K.B. Blodgett: *Monomolecular Films of Fatty Acids on Glass*: J. Am. Chem. Soc. **56** (1934) 495
- [158] K.B. Blodgett, I. Langmuir: *Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties*: Phys. Review **51** (1937) 964-982
- [159] F. Vögtle: *Supramolekulare Chemie*: Teubner-Verlag: Stuttgart 1989
- [160] Y. Morzherin, D.M. Rudkevich, W. Verboom, D.N. Reinhoudt: *Chlorosulfonated Calix[4]arenes: Precursors for Neutral Anion Receptors with a Selectivity for Hydrogen Sulfate*: J. Org. Chem. **58** (1993) 7602
- [161] J. Scheerder, M.C. Fochi, J.F.J. Engbersen, D.N. Reinhoudt: *Urea-Derivatized p-tert-Butylcalix[4]arenes: Neutral Ligands for Selective Anion Complexation*: J. Org. Chem. **59** (1994) 7815
- [162] F. Erkang, S.A. van Armen, S. Kincaid, A.D. Hamilton: *Molecular Recognition: Hydrogen – Bonding Receptors that Function in Highly Competitive Solvents*: J. Am. Chem. Soc.: **115** (1993) 369
- [163] A. Casnati, M. Fochi, P. Minari, A. Pochini, M. Reggiani, R. Ungaro, D.N. Reinhoudt: *Upper Rim Urea-Derivatized Calix[4]arenes as Neutral Receptors for Monocarboxylate Anions*: Gazz. Chim. Italia **126** (1996) 99-106
- [164] (a) M. Vincenti, E. Dalcanale: *Host-guest Complexation in the Gas Phase. Investigation of the Mechanism of Interaction Between Cavitands and Neutral Guest Molecules*: J. Chem. Soc. Perkin Trans **2** (1995) 1069-1076 (b) J. Hartmann, P. Hauptmann, E. Dalcanale, S. Levi: *Chemical Sensing with Cavitands – Influence of Cavity Shape and Dimensions on the Detection of Solvent Vapors*: Sens. Act. B **35-36** (1996) 154-157 (c) S. Levi: Diplomarbeit (1996) Universität Parma
- [165] D.J. Cram: Cavitands: *Organic Hosts with Enforced Cavities*: Science **219** (1983) 1177
- [166] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins: *Partition Coefficients and Their Uses*: Chem. Rev. **71** (1971) 525
- [167] Römpp Chemie Lexikon: Georg Thieme Verlag: Stuttgart/New York 1995
- [168] M. Winterstein, B. Adler: *Was ist und was kann Mustererkennung?:* WLB Wasser, Luft, Boden **1-2** (1997) 48-51
- [169] W. Yuan, R.J. Berman, M.H. Gelb: *Synthesis and Evaluation of Phospholipid Analogues as Inhibitors of Cobra Venom Phospholipase A2*: J. Am. Chem. Soc. **109** (1987) 8071-8081
- [170] H-K. Lin, M.H. Gelb: *Competitive Inhibition of Interfacial Catalysis by Phospholipase A2: Differential Interaction as a Controlling Factor of Inhibitor Potency*: J. Am. Chem. Soc. **115** (1993) 3932-3942
- [171] D.W. Grainger, A. Reihert, H. Ringsdorf, C. Salesse, D.E. Davies, J.B. Lloyd: *Mixed Monolayers of Natural and Polymeric Phospholipids: Structural Characterization by Physical and Enzymatic Methods*: Biochim. Biophys. Acta **1022** (1990) 146
- [172] T.L. Hazlett, R.A. Deems, E.A. Dennis: *Activation, Aggregation, Inhibition and the Mechanism of Phospholipase A2*: Adv. Exp. Med. Biol. **279** (1990) 49
- [173] M.A. Wells: *AKinetic Study of the Phospholipase A2 (Crotalus adamanteus) Catalyzed Hydrolysis of 1,2-Dibutyryl-sn-glycero-3-phosphorylcholin*: Biochemistry **11** (1972) 1031-1041

-
- [174] J. Jakob: Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- [175] M.K. Jain, J. Rogers: *Substrat Specificity for Interfacial Catalysis by PL-A₂ in the Scooting Mode*: Biochim. Biophys. Acta **1003** (1989) 91-97
- [176] B. Borgström: *Phosphatidylcholine as Substrate for Human Pancreatic Phospholipase A₂: Importance of the Physical State*: Lipids **28** (1993) 371-375
- [177] M.K. Jain, O.G. Berg: *The Kinetics of Interfacial Catalysis by Phospholipase A₂ and Regulation of Interfacial Activation. Hopping versus Scooting*: Biochim. Biophys. Acta **1002** (1989) 127-132
- [178] G.M. Kuziemko, M. Stroh, R.C. Stevens: *Cholera Toxin Binding Affinity and Specificity for Gangliosides Determined by Surface Plasmon Resonance*: Biochemistry **35** (1996) 6375-6384
- [179] J. Müthing, F. Unland: *A Comparative Assessment of TLC Overlay Technique and Microwell Adsorption Assay in the Examination of Influenza A and Sendai Virus Specificities Towards Oligosaccharides and Sialic Acid Linkages of Gangliosides*: J. Glycoconjugate **11** (1994) 486-492
- [180] P.H. Fishman: *Role of Membrane Gangliosides in the Binding and Action of Bacterial Toxin*: J. Membrane Biol. **69** (1982) 85-97
- [181] L. Eidels, R.L. Proia, D.A. Hart: *Membrane Receptors for Bacterial Toxins*: Microbiol. Rev. **47** (1983) 596-620
- [182] E.A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J.A. Martial, W.G.J. Hol: *Crystal Structure of Cholera Toxin B-pentamer Bound to Receptor G_{M1} Pentasaccharide*: Protein Science **3** (1994) 166-175
- [183] G.M. Kuziemko, M. Stroh, R.C. Stevens: *Cholera Toxin Binding Affinity and Specificity for Ganglioside Determined by Surface Plasmon Resonance*: Biochemistry **35** (1996) 6375-6384
- [184] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber, A. el Bayâ, M.A. Schmidt, H.J. Galla: *Quartz Crystal Microbalance Investigation of the Interaction of Bacterial Toxins with Ganglioside Containing Solid Supported Membranes*: J. Eur. Biophys. **26** (1997) 267-270
- [185] T.A. Springer: *Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Migration: The Multistep Paradigm*: Cell **76** (1994) 301-339
- [186] L.A. Lasky: *Selectin-carbohydrate Interactions and the Initiation of the Inflammatory Response*: Annu. Rev. Biochem. **64** (1995) 113-119
- [187] H. Lis, N. Sharon: *Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition*: Chem. Rev. **98** (1998) 637-674
- [188] H.D. Dörfler: *Grenzflächen- und Kolloidchemie*: VCH Verlagsgesellschaft mbH: New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1994
- [189] G. Bendas, J. Vogel, U. Bakowski, A. Krause, J. Müller, U. Rothe: *A Liposome-based Model System for the Simulation of Lectin-induced Cell Adhesion*: Biochim. Biophys. Acta **1325** (1997) 297-308
- [190] D.D. Lasic: *Sterisch stabilisierte Vesikel*: Angew. Chemie **106** (1994) 1765-1779
- [191] Römpp Chemie Lexikon: Georg Thieme Verlag: Stuttgart/New York 1995
- [192] R. Neubert, B. Fritsch, G. Dongowski: *Wechselwirkungen zwischen Nahrungsbestandteilen und Arzneistoffen*: Pharmazie **48** (1993) 723-728
- [193] (a) M. Schwarz, R.H.H. Neubert, G. Dongowski: *Characterization of Interactions between Bile Salts and Drugs by Capillary Chromatography. Part I*: Pharm. Res. **13** (1996) 1174 (b) M. Schwarz, R.H.H. Neubert, H.H. Rüttinger: *Application of Capillary Electrophoresis for Characterizing Interactions between Drugs and Bile Salts. Part II*: J. Chromatogr. A **745** (1996) 135 (c) M.A. Schwarz, K. Raith, H.H. Rüttinger, G. Dongowski, R.H.H. Neubert: *Investigation of Interactions Between Drugs and Mixed Bile Salt/Lecithin Micelles – a Characterization by Micellar Affinity Capillary Electrophoresis (MACE)*; Part III: J. Chromatogr. A **781** (1997) 377-389; (d) M.A. Schwarz, K. Raith, G. Dongowski, R.H.H. Neubert: *The Effect on the Partition Equilibrium of Various Drugs by the Formation of Mixed Bile*
-

-
- Salt/Phosphatidylcholine/Fatty Acid Micelles – a Characterization by Micellar Affinity Capillary Electrophoresis (MACE); Part IV: in press*
- [194] P. Schneider, Dürr: *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*: VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim 1991
- [195] C.R. Suri, M.Raje, G.C. Mishra: *Determination of ImmunoglobulinM Concentration by Piezoelectric Crystal Immunobiosensor Coated with Protamine*: *Biosensors and Bioelectronics* **9** (1994-) 535-542
- [196] K. Rauscher, J. Voigt, I. Wilke, K.T. Wilke: *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1961
- [197] S.N. Magomov, H.J. Cantov: *Atomic Force Microscopy of Polymers*: *J. Appl. Polymer Sc.* **51** (1992) 3-19
- [198] H.D. Dörfler: *Grenzflächen- und Kolloidchemie*: Weinheim-Verlag: New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1994
- [199] U. Janiak: *Theoretische Grundlagen der Ellipsometrie*: Gerätebeschreibung SENTECH GmbH, Berlin (1991)
- [200] A. Casnati, M. Fochi, P. Minari, A. Pochini, M. Reggiani, R. Ungaro, D.N. Reinhoudt: *Upper Rim Urea-derivatized Calix[4]arenes as Neutral Receptors for Monocarboxylate Anions*: *Gazzetta Chimica Italiana* **126** (1996) 99-106
- [201] S. Levi: Diplomarbeit Universität Parma 1996
- [202] J. Jakob: Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1998
- [203] Kasai: *Eur. J. Immunol.*: **10** (1980) 175-180
- [204] V. Weissig: Habilitationsschrift Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1991
- [205] P.K. Smith: *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid*: *Anal. Biochem* **150** (1985) 6-85
- [206] G. Bendas, J. Vogel, U. Bakowski, A. Krause, J. Müller, U. Rothe: *A Liposome-based Model System for the Simulation of Lectin-induced Cell Adhesion*: *Biochim. Biophys. Acta* **1325** (1997) 297-308
- [207] X.C. Zhou, S.C. Ng, H.S.O. Chan, S.F.Y. Li: *Detection of Organic Amines in Liquid with Chemically Coated QCM*: *Sensors and Actuators B* **42** (1997) 137-144
- [208] F. Hentrich: Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1991
- [209] U. Bakowski: Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1997
- [210] R. Lucklum, P. Hauptmann: *Determination of Polymer Shear Modulus with Quartz Crystal Resonators*: *Faraday Discuss.* **107** (1997) 123-140
- [211] R. Lucklum, C. Behling, R.W. Cernosek, S.J. Martin: *Determination of Complex Shear Modulus with Thickness Shear Mode Resonators*: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **30** (1997) 346-351