

Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen

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 Diplompharmazeut Matthias Höpfner

geboren am 14. Juli 1975 in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Neubert

2. Prof. Dr. Gerd Bendas

3. PD Dr. habil Ulrich Rothe

Halle (Saale), 21.02.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008805

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008805>]

Gliederung

Gliederung	2
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
2. Theoretischer Teil	7
2.1. Geschichtliche Entwicklung der Schwingquarztechnik	7
2.2. Physikalische Grundlage von Schwingquarzen	7
2.3. Einteilung akustischer Sensoren	8
2.4. Quartz crystal microbalance (QCM).....	9
2.4.1. Grundlagen der Quarzmikrowaagenteknik	9
2.4.2. Einfluss von Flüssigkeiten auf die Resonanzfrequenz	11
2.4.3. Physikalische Modelle des Schwingungsverhaltens.....	11
2.4.4. Dämpfung	13
2.5. Die Quarzmikrowaage als Biosensor.....	15
2.5.1. Überblick	15
2.5.2. Die QCM-Technik zur Detektion von Adhäsionsprozessen in der Gasphase.....	15
2.5.3. Die QCM-Technik zur Detektion von Adhäsionsprozessen in Flüssigkeiten.....	16
2.5.4. Piezoimmunosensoren	17
2.5.5. Ermittlung von kinetischen Bindungsparametern aus QCM-Messungen	19
2.5.6. Untersuchungen von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen.....	22
2.5.7. Untersuchung von Nukleinsäuren	22
2.5.8. Die QCM-Technik zur Detektion zellulärer Systeme	23
2.5.8.1. Allgemeine Aussagen	23
2.5.8.2. Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der QCM-Technik	25
2.5.8.3. Untersuchungen spezifischer Zell-Substrat-Wechselwirkungen.....	27
2.5.9. Die QCM-Technik zur Detektion liposomaler Systeme.....	30
2.5.9.1. Einsatz von Liposomen zur Signalverstärkung	30
2.5.9.2. QCM-Studien zum Adsorptionsverhalten liposomaler Systeme.....	31
2.6. Beschichtung der Quarzelektroden.....	38
2.6.1. Unspezifische Adsorption, Physisorption.....	38
2.6.2. Spezifische Adsorption, Chemisorption und Self-Assembling	39
2.6.3. Gemischte Immobilisierungsstrategien	41
2.6.4. Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion.....	43
3. Zielstellung	45
4. Materialien und Methoden	47
4.1. Quarzmikrowaagensystem „LiquiLab21“	47
4.2. Quarzsensoren.....	47
4.3. Reinigung der Quarzsensoren.....	48
4.4. Beschichtung der Quarze	49
4.4.1. Beschichtung der Quarzsensoren mit Thiolen durch Self-Assembling.....	49
4.4.2. Kopplung von Proteinen und anderen Molekülen mit reaktiven Aminogruppen mit der Cyanurchlorid-Methode.....	49
4.4.3. Kopplung von Proteinen und anderen Molekülen mit reaktiven Aminogruppen mit der 16-Mercaptohexadecansäure-Methode.....	49

4.4.4. Beschichtung des Quarzsensors durch die Langmuir-Blodgett-Technik	50
4.5. Ellipsometrie.....	50
4.6. Randwinkelmessungen	50
4.7. Zellen und Zellpräparation.....	51
4.8. Liposomen	51
4.9. Chemikalien.....	52
5. Ergebnisse und Diskussion.....	53
5.1. Reinigung der Quarzsensoren.....	53
5.2. Beschichtung der Quarzsensoren.....	56
5.2.1. Self-Assembling-Schichten	56
5.2.2. Kovalente Fixierung von Proteinen.....	57
5.2.3. Aufbau einer support-fixierten Bilayer mit der Langmuir-Blodgett-Technik.....	59
5.3. Temperatureinfluss und Verbesserung der Temperaturstabilität.....	60
5.4. Messzelle	62
5.4.1. Messungen an Luft	62
5.4.2. Statische Versuchsanordnung in Flüssigkeiten	63
5.4.3. Versuchsanordnung mit Flussbedingungen.....	64
5.5. Unspezifische Proteinadsorption an verschiedenen Oberflächen.....	67
5.6. Spezifische Adsorption an funktionalisierten Oberflächen	71
5.6.1. Untersuchungen am Avidin-Biotin-System.....	71
5.6.2. Antigen-Antikörper-Reaktionen.....	73
5.6.3. Bestimmung von Bindungskonstanten	80
5.7. Zelladhäsion.....	84
5.7.1. Selektin-vermittelte Zelladhäsion.....	84
5.7.1.1. Einleitung	84
5.7.1.2. Selektin-vermittelte Adhäsion von U937-Zellen.....	85
5.7.1.3. Selektin vermittelte Adhäsion von KG1A-Zellen	90
5.7.1.4. E-Selektin vermittelte Adhäsion von E-CHO-Zellen.....	91
5.7.1.5. Leukozytenadhäsion an einer sLe ^x -haltigen Modellmembran	92
5.7.2. Zusammenfassung	95
5.8. Liposomenadhäsion	96
5.8.1. Unspezifische Adhäsion von Liposomen an Oberflächen.....	96
5.8.2. Stabilisierung der Liposomen durch Einbau von PEG-PE.....	100
5.8.3. Verstärkung der Wechselwirkung von Liposomen mit der Oberfläche.....	101
5.8.3.1. Kalziumeinfluss.....	101
5.8.3.2. Ladungseinfluss.....	101
5.8.3.3. Einbau von Thioalkanen.....	102
5.8.4. Zusammenfassung	103
5.8.5. Spezifische Adhäsion von Liposomen an funktionalisierten Oberflächen.....	103
5.8.5.1. Biotin-Liposomen.....	103
5.8.5.2. Immunoliposomen.....	109
5.8.5.3. sLe ^x -Liposomen.....	111
5.8.5.4. sLe ^x -DOPE-Liposomen.....	113
5.8.6. Zusammenfassung	115
6. Zusammenfassung	117
Danksagung.....	119

Literaturverzeichnis 120

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Δf	Frequenzänderung
ΔD	Dämpfungsänderung
AFM	atomic force microscopy
APM	acoustic plate mode
BAW	bulk acoustic wave
Biotin-PE	N-Biotinyl-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
Biotinyl-PEG-PE	N-[Biotinyl(Polyethylenglykol)-2000]- Distearoylphosphatidylethanolamine
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
D	Dämpfung
DOPA	Dioleylphosphatidsäure
DOPC	Dioleylphosphatidylcholin
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOPS	Dioleylphosphatidylserin
DOTAP	1,2-Dioleyl-3-trimethylammoniumpropan
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
E-CHO-Zellen	E-Selektin exprimierende chinesische Hamsterovarialzellen
EDC	N ² -(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPS	Ei-Phosphatidylserin
f	Frequenz
FPW	flexural plate wave
HSA	humanes Serumalbumin
IDT	interdigital transducer
IgG	Immunglobulin G
k_{Ass}	Assoziationsratenkonstante
K_B	Gleichgewichtsbindungskonstante
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_{Diss}	Dissoziationsratenkonstante
MIP	molecular imprintet polymer
NaC	Natriumcholat
N-Glut-PE	N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin
PC	Phosphatidylcholin
PEG	Polyethylenglykol
PNA	peptide nucleic acid
QCM	quartz crystal microbalance
QCM-D	quartz crystal microbalance with dissipation monitoring
RGD-Peptid	Alanyl-Glycyl-Asparaginsäure-Peptid
SAW	surface acoustic wave
SFM	scanning force microscopy
sLe ^x	Sialyl Lewis X
SPC	Sojaphosphatidylcholin
SPR	surface plasmon resonance
TH	Nucleotid-Transhydrogenase
TSM	thickness shear mode

1. Einleitung

Biologische Erkennungsprozesse, die durch spezifische Wechselwirkungen von Bindungspartnern gesteuert und ausgelöst werden, spielen eine fundamentale Rolle für die Funktionsfähigkeit aller Organismen. Für das molekulare Verständnis solcher oftmals hochkomplizierter Abläufe können zeitauflösende Biosensoren essentielle Beiträge leisten. Biosensoren sind chemische Messfühler, die durch die enge räumliche und funktionale Verzahnung eines biologischen Erkennungselementes (Rezeptor) mit einem Signalwandler (Transducer) charakterisiert sind. Sie werden eingesetzt, um biologische Interaktionen in ein quantifizierbares, elektrisches Signal umzuwandeln.

Die Quarzmikrowaage ist seit vielen Jahren als hochempfindlicher Massendetektor, besonders in der Umwelt- und Prozessanalytik bekannt. Durch Weiterentwicklungen fand sie Eingang in die Biosensorik. Als Messprinzip wird die Änderung der Schwingungseigenschaften oszillierender Quarzsensoren durch eine Masseanlagerung an der Quarzoberfläche, insbesondere durch spezifische Bindungsereignisse, genutzt. Die große Anzahl aktueller Veröffentlichungen in der Literatur verdeutlicht das Interesse an Biosensoren. Die schnelle Entwicklung der Biowissenschaften fordert zudem die ständige Fort- und Weiterentwicklung der ihr zur Verfügung stehenden analytischen Methoden. Die generelle Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage auf viele biologisch-medizinische Fragestellungen spiegelt sich in einer Vielzahl von publizierten Arbeiten der letzten fünf Jahre wider. Trotz überzeugender Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Einbeziehung der Quarzmikrowaage in die pharmazeutische und biomedizinische Forschung schließen sich die Studien noch nicht zu einem Gesamtbild, das die einfache und universelle Anwendbarkeit dieser Technik repräsentiert. Zu diesem Zweck müssen verschiedene Einflussfaktoren in ihrer Bedeutung charakterisiert und unterschiedliche Applikationen der Techniken verglichen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Möglichkeiten der QCM-Technik zur Lösung pharmazeutisch-relevanter Fragestellungen aufzuzeigen. Die systematische Untersuchung äußerer Einflussgrößen auf die Messergebnisse steht ebenso im Mittelpunkt wie die Optimierung der Versuchsanordnung für die jeweilige Fragestellung.

Im Ergebnis soll die Eignung der Quarzmikrowaage für die pharmazeutische Analytik gezeigt werden. Die Vorteile der QCM-Technik sollen dabei herausgearbeitet und deren Grenzen aufgezeigt werden.

2. Theoretischer Teil

2.1. Geschichtliche Entwicklung der Schwingquarztechnik

Resonante Quarzsensoren sind seit nunmehr über 4 Dekaden als Instrumente zur Bestimmung kleinster Massen in der Literatur bekannt. Die Empfindlichkeit dieser Messmethode liegt im unteren Nanogrammbereich und ist damit um etwa den Faktor 100 empfindlicher als verfügbare elektromechanische Waagen. Bereits 1959 konnte von Sauerbrey eine lineare Beziehung zwischen Massebeladung und Änderung der Resonanzfrequenz von Schwingquarzen gefunden werden [1]. Diese Arbeit führte erstmals zum systematischen Einsatz von Schwingquarzen zur Quantifizierung von dünnen Metallschichten. Bereits vorher war das Phänomen der Frequenzänderung von Quarzoszillatoren durch Masseaufbringung bekannt. Beispielsweise wurde die Frequenz von Resonatoren in der Kommunikationstechnik durch Bleistiftmarkierungen auf dem Quarz eingestellt und so zwischen Sender und Empfänger abgeglichen.

2.2. Physikalische Grundlage von Schwingquarzen

Die physikalische Grundlage der Quarzmikrowaage bildet der piezoelektrische Effekt. Als Piezoelektrizität wird die Erzeugung elektrischer Ladung an der Oberfläche eines Festkörpers durch Zug, Druck oder Torsion bezeichnet. Dieser Effekt wurde erstmals von Pierre und Jaques Curie 1880 beschrieben. Er tritt ausschließlich bei Kristallen ohne Inversionszentrum im Kristallgitter auf. Als reziproken piezoelektrischen Effekt bezeichnet man die Induzierung von mechanischen Deformationen durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes. Diese so angeregten Schwingungen erreichen im Resonanzfall ein Maximum. Die Lage des Maximums ist von vielen Faktoren abhängig, wobei gerade die Eigenschaften des angrenzenden Mediums (Temperatur, Dichte, Viskosität) als analytisches Messprinzip ausgenutzt werden können. Quarzkristallen kommt dabei eine besonders große Bedeutung zu. Sie besitzen neben der piezoelektrischen Eigenschaft auch noch geeignete mechanische, chemische, thermische und elektrische Eigenschaften, welche eine große kommerzielle Anwendung ermöglichen. Als besonders günstig erweist sich dabei die sehr hohe Frequenzstabilität von Resonatoren aus Quarz, die bei $\Delta f/f = 10^{-8}$ liegt. Neben Quarz werden auch noch andere Materialien wie Lithiumniobat (LiNbO_3) und Bariumtitanat (BaTiO_3) für Resonatoren verwendet. Die Weiterentwicklung der Elektrotechnik und die damit verbundenen verbesserten Schaltungsmöglichkeiten führten in jüngster Vergangenheit zu einer ganzen Reihe von Meßsystemen auf der Basis piezoelektrischer Resonatoren zur

Detektion von biologisch und medizinisch relevanten Substratwechselwirkungen mit Oberflächen.

2.3. Einteilung akustischer Sensoren

Durch ein oszillierendes elektrisches Feld werden innerhalb des piezoelektrischen Materials akustische Wellen angeregt. Man spricht daher auch von akustischen Sensoren. Eine Einteilung solcher Sensoren kann nach der Ausbreitung der akustischen Wellen erfolgen.

Surface acoustic wave (SAW) Sensoren

Oberflächenwellen breiten sich an der Oberfläche des piezoelektrischen Substrates direkt oder durch Reflexion an den Grenzflächen aus. Dieses Messprinzip wird bei den surface acoustic wave (SAW) Sensoren ausgenutzt. Die Oberflächenwellen werden durch aufgebraute Elektroden (interdigital transducer, IDT) erzeugt. Als Messgröße dient dabei die Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle, die proportional zur Masseanlagerung ist. Allerdings bestehen hier starke Einschränkungen. Beispielsweise ist der Einsatz in flüssigen Medien ausgeschlossen, da die auftretenden Energiedissipationen stören.

Acoustic plate mode (APM) Sensoren

Eine andere Art von Sensoren nutzt die Reflexion der akustischen Welle an den Grenzflächen des piezoelektrischen Materials aus. Bei den so genannten acoustic plate mode (APM) Sensoren wird auf der Unterseite des Sensors mittels IDT eine akustische Welle erzeugt, die sich innerhalb des Materials so ausbreitet, dass sich durch Totalreflexion an den Grenzflächen die akustische Welle parallel zur Oberfläche des Sensors ausbreitet. Wird auf der Oberseite des Sensors eine Masse angelagert, so ändert sich wiederum die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle proportional. Diese Sensoren lassen sich durch ihre geringe Wechselwirkung mit der angrenzenden Materie problemlos in Flüssigkeiten anwenden.

Flexural plate wave (FPW) Sensoren

Eine weitere Art von akustischen Sensoren sind die flexural plate wave Resonatoren. Bei dieser Art von Sensor wird eine sehr dünne Membran aus Siliziumnitrid in einen Rahmen aus Silizium eingefasst und mittels IDT eine akustische Welle erzeugt. Die Amplitude dieser Schwingung erreicht 100 nm, so dass sich solche Sensoren auch zur Bewegung von Flüssigkeiten oder kleinen Partikeln einsetzen lassen. Vorteilhaft ist die geringe Grundfrequenz der Schwingung von <10 MHz, die eine preiswerte Beschaltung zulässt. Auch ein Einsatz in Flüssigkeiten ist möglich. Als Messsignal dient hier die Abnahme der

Phasengeschwindigkeit der akustischen Welle, die proportional zur Masseanlagerung an der Membran ist.

2.4. Quartz crystal microbalance (QCM)

Die vorliegende Arbeit befasst sich hauptsächlich mit einer vierten Art von akustischen Sensoren, der so genannten Quarzmikrowaagentechnik. Synonym werden auch die Begriffe bulk acoustic wave (BAW) Resonator, thickness shear mode (TSM) Resonator oder englisch quartz crystal microbalance (QCM) verwendet.

2.4.1. Grundlagen der Quarzmikrowaagentechnik

Als piezoelektrisches Material dient eine Quarzscheibe. Zur Anregung dieser Quarzscheibe im benötigten Dickenscherswingungsmodus (thickness shear mode) müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Einerseits muss sich auf Ober- und Unterseite der Quarzscheibe je eine Elektrode befinden, die mit einem äußeren elektrischen Wechselfeld betrieben werden. Häufig werden im Vakuum aufgedampfte Goldelektroden verwendet, wobei zur Haftungsverbesserung zuvor eine dünne Schicht Chrom oder Titan aufgedampft wurde. Andererseits muss der Quarz in einem definierten Winkel aus einem Einkristall geschnitten werden. Als besonders günstig erweist sich der so genannte AT-Schnitt, bei dem in einem Winkel von $35,15^\circ$ zur optischen Achse des Quarzkristalls geschnitten wird. Die so gewonnenen Quarzscheiben schwingen im massenempfindlichsten Dickenscherswingungsmodus und besitzen dabei eine sehr geringe Temperaturempfindlichkeit (1 Hz/k) [2].

Abbildung 1 verdeutlicht den Dickenscherswingungsmodus.

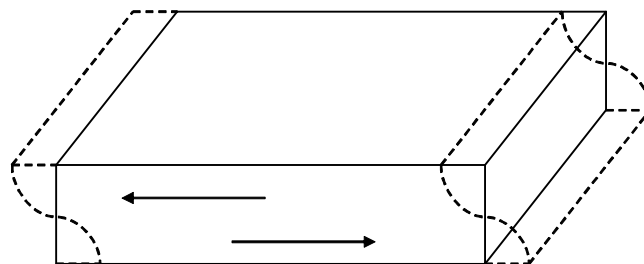


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Dickenscherswingungsmodus

Unter der Voraussetzung, dass sich eine auf der Quarzoberfläche angelagerte Masse genauso verhält wie das Quarzmaterial selbst und im Verhältnis zur Gesamtmasse sehr klein ist (etwa bis 2% des Sensorgewichts), ändert sich die Resonanzfrequenz durch eine

Masseanlagerung an der Quarzoberfläche linear. Dieser Zusammenhang wurde erstmals von Sauerbrey erwähnt [1].

Resonanz tritt unter der Bedingung ein, dass die Dicke der Quarzscheibe (d_Q) halb so groß ist wie die Wellenlänge der induzierten Transversalwelle innerhalb des Quarzkristalls (λ_Q):

$$d_Q = \frac{\lambda_Q}{2} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Die Schallgeschwindigkeit in Quarz ist eine Stoffkonstante (für AT-cut-Quarze $v_Q=3340 \text{ ms}^{-1}$), die von Länge (λ_Q) und Frequenz der akustischen Welle (f_Q) abhängen:

$$v_Q = \lambda_Q f_Q \quad \text{Gleichung (2)}$$

Daraus folgt, dass sich Dicke (d_Q) und Resonanzfrequenz (f_Q) des Quarzplättchens immer im selben Verhältnis ändern müssen, da die Schallgeschwindigkeit konstant ist:

$$\frac{\Delta d_Q}{d_Q} = -\frac{\Delta f_Q}{f_Q} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Die von Sauerbrey eingeführte Massendichte (M_F) der Fremdschicht, ergibt sich als Produkt aus deren Dicke (d_F) und Dichte (ρ_F), analoges gilt für die Massendichte des Quarzes (M_Q):

$$M_F = d_F \rho_F \quad \text{Gleichung (4)}$$

Daraus ergibt sich die proportionale Änderung der Frequenz (Δf_Q) des Quarzes durch die aufgelagerte Massendichte (ΔM_F):

$$\Delta f_Q = -f_Q \frac{\Delta M_F}{M_Q} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Durch Einsetzen der Gleichungen (2) und (4) in (5) ergibt sich die so genannte Sauerbrey-Gleichung:

$$\Delta f_Q = -2f_Q^2 \frac{M_F}{\rho_Q v_Q} \quad \text{Gleichung (6)}$$

Aus Gleichung (6) erkennt man, dass die Empfindlichkeit quadratisch von der Grundfrequenz des Quarzes abhängt. Die Grundfrequenz ist über Gleichung (1) mit der Dicke verbunden, d.h. je höher f_Q , desto dünner die Quarzscheiben. (Zum Vergleich: Ein 10 MHz-Quarz besitzt eine Dicke von $166,7 \mu\text{m}$.) Da es sich bei f_Q , ρ_Q und v_Q um Konstanten handelt, die nur von den Eigenschaften der Quarzscheibe abhängen, kann man die Gleichung vereinfachen:

$$\Delta f_Q = -c_Q M_F \quad \text{Gleichung (7)}$$

Für einen 10 MHz-Quarz ergibt sich damit eine Empfindlichkeit von $0,226 \text{ Hz cm}^{-2}$, bzw. eine Masseanlagerung von $4,4 \text{ ng}$ auf einer Fläche von 1 cm^2 ruft eine Frequenzänderung von 1 Hz hervor. Die Steigerung der Empfindlichkeit durch Erhöhung der Grundfrequenz ist durch die Dicke des Quarzes und dem großen schaltungstechnischen Aufwand bei hohen Frequenzen begrenzt. Standardmäßig werden QCM-Sensoren mit 5 bis 10 MHz Quarzen verwendet, die ein sehr gutes Preis-Leistungs-Verhältnis besitzen. Durch partielles Dünnätzen können Grundfrequenzen von bis zu 250 MHz erreicht werden [3]. Solche hohe Grundfrequenzen besitzen aber aufgrund einer geringen Frequenzstabilität und der größeren Anfälligkeit gegenüber Störeinflüssen kaum praktische Bedeutung.

2.4.2. Einfluss von Flüssigkeiten auf die Resonanzfrequenz

Neben dem Einfluss von Temperatur und Massebeladung gibt es weitere Einflussgrößen auf die Resonanzfrequenz. Besonders in flüssigen Medien wirkt sich hier eine Änderung von Viskosität und/oder Dichte besonders aus. Gordon und Kanazawa untersuchten den Einfluss von Dichte (ρ_f) und Viskosität (η_f) der umgebenden Flüssigkeit und fanden folgende Beziehung [4, 5]:

$$\Delta f = f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_f \rho_f}{\pi \mu_Q \rho_Q}} \quad \text{Gleichung (8)}$$

Hier sind Dichte des Quarzes ($\rho_Q=2,648 \text{ g/cm}^3$) und Schermodul des Quarzes ($\mu_Q=2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm s}^2$) konstant. Beim Einsatz der QCM-Technik in wässrigen Medien sind nicht nur die direkte Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz sondern auch die Änderungen von Viskosität und Dichte durch Temperaturänderungen und den damit verbundenen Auswirkungen auf die Resonanzfrequenz von Bedeutung. Der Temperaturkoeffizient für einen 10 MHz Quarz in wässriger Umgebung beträgt 15 Hz/K im Temperaturbereich von 30 bis 50 °C [6]. Daher ist eine hohe Temperaturkonstanz bei der Durchführung von Messungen erforderlich.

2.4.3. Physikalische Modelle des Schwingungsverhaltens

Um die Effekte der Viskositäts- und Dichteänderung von denen der Masseanlagerung auf die Resonanzfrequenz separieren zu können, wurde zunächst versucht, die physikalischen Parameter eines Schwingquarzes, der in einer Flüssigkeit mit einer zusätzlichen Fremdmasse beladen wird, theoretisch zu modellieren. Hierfür gab es mehrere Ansätze.

Im so genannten Transmission-line-Modell wird der Aufbau eines Quarz-Sensors aus den einzelnen Schichten betrachtet, die von der akustischen Welle durchdringt werden. Die Eigenschaften der akustischen Welle in den separaten Schichten (Quarz, angelagerte Masseschicht(en), überstehende Flüssigkeit) wird durch Analogien zwischen akustischen und elektrischen Eigenschaften beschrieben. Der Einfluss einer angelagerten Schicht auf die Frequenz des Quarzes wird durch eine akustische Impedanz (Z) dargestellt. Die akustische Impedanz der aufgelagerten Schicht(en) entspricht dabei der Messgröße, die vom Quarzsensoren erfasst wird.

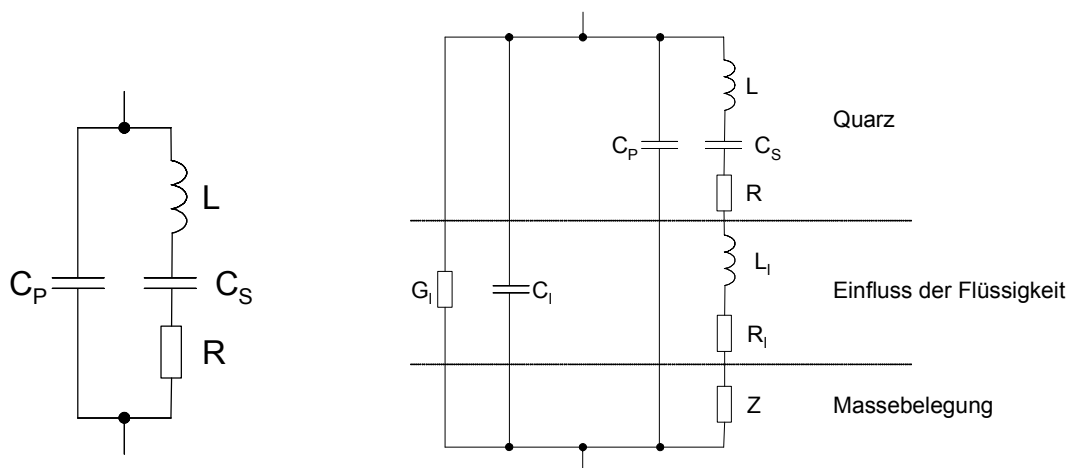


Abbildung 2: Butterworth-van-Dyke-Ersatzschaltbild für einen Schwingquarz; ohne Last in Luft (links); mit einer Schicht und Flüssigkeit beladen (rechts)

Das Butterworth-Van-Dyke-Modell ist ein vereinfachtes Ersatzschaltbild für das komplexe Verhalten eines Schwingquarzes und kann aus dem Transmission-line-Modell abgeleitet werden. Durch eine dynamische Induktivität (L) wird die schwingende Masse des Quarzes dargestellt. Durch eine dynamische Kapazität (C_S) wird die mechanische Elastizität ausgedrückt, Energieverluste werden mit einem Widerstand (R) beschrieben. Die Parallelkapazität (C_P) ist durch den Quarzsensoren gegeben und berechnet sich aus der Dielektrizitätskonstante (ϵ_{22}) und der Dicke des Quarzes (d_Q) sowie der Elektrodenfläche (A_{el}):

$$C_P = \frac{\epsilon_{22} A_{el}}{d_Q} \quad \text{Gleichung (9)}$$

Sauerbrey hat diese Ersatzparameter berechnet und mit experimentellen Werten verglichen [7]. Für in Flüssigkeit betriebene Quarze wird das Modell um Deskriptoren erweitert, die den Einfluss der Flüssigkeit darstellen, und zwar eine Parallelkapazität (C_I) und ein Parallelwiderstand (G_I) sowie eine Induktivität (L_I) und ein Widerstand (R_I) in Serie. Die komplexe Größe Z spiegelt den Einfluss einer angelagerten Masse wieder.

Einen weiteren Ansatz stellt das akustische Last-Konzept dar (engl.: acoustic load concept). Durch eine Matrix wird die akustische Eigenschaft einer Schicht bzw. einer Flüssigkeit auf dem Quarz charakterisiert. Der Vorteil dieses Modells besteht darin, dass die Antwort des Sensors in Abhängigkeit jeder einzelnen Schicht (Masseanlagerung, Flüssigkeit) modelliert werden kann, d.h. der Anteil jeder einzelnen Schicht an der Änderung der Resonanzfrequenz und der Dämpfung des Quarzes kann ermittelt werden. Der Sonderfall der Belegung des Quarzsensors mit einer dünnen, starren Schicht führt dabei wieder zu der bereits von Sauerbrey gefundenen Beziehung zwischen Δf und Massebeladung (Gleichung (6)).

Anhand solcher teilweise sehr komplexen Modelle kann man mittels der Frequenzänderung nicht nur auf die Masse der angelagerten Schicht, sondern auch auf deren Dichte, Viskosität und den so genannten Schermodul G schließen. Der komplexe Schermodul setzt sich zusammen aus einem elastischen, realen Speichermodul und einem imaginärem Verlustmodul. Der Schermodul G gibt die viskoelastischen Eigenschaften eines Stoffes wieder. Er nimmt hohe Zahlenwerte für starre, feste Körper und kleine Zahlenwerte für elastische, verformbare Körper an. Der Schermodul von AT-cut Quarzen beträgt zum Beispiel $2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$.

Anhand der Frequenzänderung als einzigen Messwert kann nicht gleichzeitig auf alle unbekannt Parameter des Analyten geschlossen werden. Daher wurden große Anstrengungen unternommen, weitere Messgrößen aus dem elektrischen und dem Schwingverhalten des Quarzsensors abzuleiten bzw. zu ermitteln. Eine Methode ist die Anregung des Quarzes bei höheren Frequenzen, die ungerade, ganzzahlige Vielfache der Grundfrequenz sind. Diese Versuchsanordnung ermöglicht auch die zeitgleiche Ermittlung mehrerer Frequenzänderungen in einem Experiment, ist aber mit einem höheren schaltungstechnischen Aufwand verbunden.

Eine weitere Methode ist die Erfassung der Dämpfung der Quarzoszillation.

2.4.4. Dämpfung

Die Dämpfung ist eine Messgröße, die hauptsächlich durch die viskoelastischen Eigenschaften der angelagerten Masse beeinflusst wird. Jede natürliche Schwingung wird durch Energieverluste mit umgebender Materie gedämpft. Bei der Quarzmikrowaage fällt diese Dämpfung im Vakuum oder in gasförmiger Umgebung gering aus, da Gase eine sehr geringe akustische Impedanz besitzen. Wird ein Quarz jedoch in flüssiger Umgebung zu Schwingungen angeregt, erfolgt durch die umgebende Flüssigkeit eine erhebliche Dämpfung der Schwingung. Diese Dämpfung galt lange Zeit als unüberwindbares Hindernis zur Anwendung der QCM in Flüssigkeiten. Aber durch die rasante Entwicklung der

Elektrotechnik in den letzten Jahren konnten geeignete Beschaltungen zur Verfügung gestellt werden, die eine ausreichend stabile Schwingung in flüssiger Umgebung ermöglichen. Wird diese Dämpfung während eines Experiments erfasst, können zusätzliche Informationen über die Beschaffenheit der adsorbierten Masse an der Quarzoberfläche, insbesondere über deren viskoelastisches Verhalten, gewonnen werden.

QCM-D von Q-Sense

Ein kommerzielles Gerät, das beide Prinzipien in eleganter Weise kombiniert stellt das QCM-D System der Firma Q-Sense, (Göteborg, Schweden) dar. Hier werden 5 MHz Quarze periodisch zur Schwingung in Grundfrequenz sowie im dritten und fünften Oberton angeregt und von der antreibenden Spannungsquelle wieder getrennt. In der spannungslosen Phase, in der der Quarzsensoren „ausschwingt“, kann die Dämpfung der Schwingung aus dem zeitlichen Abfall der Schwingungsamplitude ermittelt werden. Die Entwicklung dieses kommerziellen Biosensors auf QCM-Basis führte zu einer starken Zunahme der Anwendung dieser Technik in den Bio- und Materialwissenschaften.

LiquiLab von ifak

Das in dieser Arbeit verwendete Messsystem LiquiLab21 vom Institut für Automation und Kommunikation e.V. (ifak e.V., Barleben, Deutschland) verfolgt ein anderes Prinzip. Um den Quarz mit konstanter Amplitude schwingen zu lassen, ist bei zunehmender Dämpfung eine höhere Spannung erforderlich, da die Energieverluste kompensiert werden müssen. Diese Spannungsänderung wird durch einen Spannungswandler in eine Frequenz gewandelt und mit der Resonanzfrequenz eines 10 MHz Quarzes zeitgleich erfasst. Dabei sind Messzeiträume bis zu 100 ms möglich. Standardmäßig wird ein Messwert pro Sekunde erfasst, derselbe Zeitrahmen wie beim QCM-D Gerät von Q-Sense.

Die Erfassung der Dämpfung gibt dabei Aufschluss, ob die angelagerte Masse als feste rigide Masse betrachtet werden kann und einfach mit der Sauerbrey-Gleichung aus der Frequenzänderung berechnet werden kann, oder ob durch viskoelastische Einflüsse der Masse eine Beeinflussung der Resonanzfrequenz stattfindet [8]. Aber auch ein direktes Abschätzen von Materialeigenschaften kann aus der Dämpfungserfassung erfolgen. So können anhand von Messungen der Resonanzfrequenz und Obertönen und den entsprechenden Dämpfungen Schermodul, Dichte und Viskosität sowie Dicke eines auf dem Quarz befindlichen Films ermittelt werden [9].

2.5. Die Quarzmikrowaage als Biosensor

2.5.1. Überblick

Durch die ständige Fortentwicklung in den Biowissenschaften werden permanent neue Wissensgebiete erschlossen, neue Techniken zur Untersuchung biologischer Fragestellungen entwickelt und dadurch neue Erkenntnisse der biologischen Materie, dem Zusammenspiel einzelner Moleküle, Zellen und Organismen sowie fundamentale Zusammenhänge in der Biologie, Physik, Medizin und Chemie gewonnen. Im Zuge dieser Forschung wurde auch die Quarzmikrowaagenteknik als Biosensor immer weiter entwickelt und in allen naturwissenschaftlichen Bereichen angewendet. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Weiterentwicklung der QCM-Technik und deren Einsatz bei einer Vielzahl von Fragestellungen. Im folgenden Kapitel dieser Arbeit soll näher auf die Anwendung der Quarzmikrowaage als Biosensor eingegangen werden.

Prinzipiell kann die Quarzmikrowaage jede an der Sensoroberfläche angelagerte Masse detektieren. Dies ermöglicht einen sehr breiten Einsatz in allen Fragestellungen, bei denen es um Masseänderungen an Grenzflächen fest/gasförmig oder fest/flüssig geht. Bereits 1990 wurde von Schumacher auf das Potential der Anwendung der Quarzmikrowaage in flüssigen Medien hingewiesen [10]. Insbesondere erweist sich die Anwendung der massensensitiven Quarzmikrowaage unter gleichzeitiger Benutzung der flüssigkeitszugewandten Elektrode als Arbeitselektrode für elektrochemische Experimente als sehr fruchtbare Kombination [11].

Die Quarzmikrowaage gilt heute als anerkannte und etablierte Methode zur Detektion von Adsorptionsprozessen an Oberflächen. Hauptanwendung findet die QCM-Technik bei der Untersuchung der Adsorption von Proteinen und anderen Makromolekülen wie zum Beispiel Polymeren. Es werden sowohl spezifische Interaktionen wie zum Beispiel Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen oder Antigen-Antikörper-Reaktionen untersucht. Aber auch die Untersuchung supramolekularer Systeme wie die Adhäsion von Vesikeln und Liposomen wird mit der Quarzmikrowaage durchgeführt. Die Wechselwirkungen von unterschiedlichen Zellen mit verschiedenen Oberflächen wurden ebenfalls mit Schwingquarzen untersucht. Zahlreiche Review-Artikel dokumentieren den aktuellen Stand der QCM-Technik [11, 12, 13, 14, 15].

2.5.2. Die QCM-Technik zur Detektion von Adhäsionsprozessen in der Gasphase

Die erste Anwendung fanden QCM-Sensoren in der Verfolgung der Abscheidung von Metallen aus der Gasphase [16]. Bereits 1964 wurde von King ein Messsystem mit Schwingquarzen zur Detektion von verschiedensten Analyten in der Gaschromatographie

beschrieben [17]. Quarzresonatoren wurden zur Bestimmung von Gasen und organischen Dämpfen, wie zum Beispiel Organophosphaten und Pestiziden [18], Chlorwasserstoff [19], Ammoniak [20], Formaldehyd [21] und Parathion [22] eingesetzt.

Die Anordnung von mehreren, unterschiedlich beschichteten Quarzsensoren in so genannten Sensorarrays ermöglicht die Analyse komplexer Gasgemische in einem Messvorgang. Vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, wurde eine „künstliche Nase“ entwickelt, die aus acht unterschiedlich gecoateten Quarzresonatoren besteht [23].

2.5.3. Die QCM-Technik zur Detektion von Adhäsionsprozessen in Flüssigkeiten

Die Mehrzahl der Arbeiten, die sich mit der Quarzmikrowaage auseinandersetzen, hat die Untersuchung von Adhäsionsprozessen gelöster Moleküle an unterschiedlich modifizierten Quarzoberflächen zum Gegenstand. Dabei ist das Interesse vor allem auf das Verhalten von Proteinen und Polymeren bei der unspezifischen und spezifischen, d.h. rezeptorvermittelten Adhäsion fokussiert.

Unspezifische Adhäsionen von gelösten Molekülen an Oberflächen werden durch verschiedene Kräfte hervorgerufen. Dazu gehören elektrostatische Anziehungskräfte zwischen gegensätzlichen Ladungen, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brücken-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Quarzmikrowaage bietet sich zur Untersuchung solcher Adhäsionsphänomene aufgrund ihrer Fähigkeit zur Detektion von Masseanlagerungen an der Sensoroberfläche an. Tatsächlich sind eine Vielzahl von Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens von Polymeren und Proteinen an unterschiedlich modifizierten Elektrodenoberflächen durchgeführt worden.

Höök et al. untersuchten die Adsorption von fünf verschiedenen Proteinen an einer Oktadekanthiol-Schicht [24]. Dabei konnten anhand der zusätzlichen Dämpfungsänderung unterschiedliche Adsorptionsphasen deutlich gemacht werden und die Adsorption der fünf Proteine (Myoglobin, Hämoglobin, humanes Serumalbumin (HSA), Ferritin und Anti-HSA-IgG) qualitativ verglichen werden. Die Adsorption von Hämoglobin wurde noch detaillierter untersucht [25]. Mit Hilfe der QCM-D-Technik konnten so strukturelle Unterschiede in den adsorbierten Proteinschichten detektiert werden. In einer weiteren Studie konnte dieselbe Arbeitsgruppe die Adsorption eines Muscheladhäsionsproteins an einer Oktadekanthiol-Schicht und eine anschließende Strukturänderung durch chemische Vernetzung verfolgen [26].

Andere Arbeiten verfolgten mit der Quarzmikrowaage Adsorptionsprozesse von Polystyren unterschiedlicher Größe an Gold [27], von humanem Serumalbumin an Gold-,

Platin- und Glasskohlenstoffelektroden [28], von Ferritin an Gold [29], von Rinderserumalbumin an Gold [30] und von Plasmaproteinen an Poly(mercaptopropyl)methylsiloxan-modifizierten Goldelektroden [31]. Cavic et al. untersuchten die Adsorption von Rinderserumalbumin, Fibrinogen, Avidin und Neutravidin an verschiedenen Siloxan-Oberflächen [32]. Ebenso kann der Aufbau von Polyelektrolytschichten zum Beispiel aus Poly-L-Lysin / Poly-L-Glutaminsäure [33, 34], Poly-L-Lysin / Hyaluronan [35, 36] und Natrium-Polystyrensulfat / Polyallylaminhydrochlorid [37] verfolgt und näher charakterisiert werden. Mit Hilfe von QCM-Messungen konnte so sehr einfach zwischen linear und exponentiell wachsenden Polyelektrolytschichten unterschieden werden. Durch die Entwicklung eines mathematischen Modells konnten Salomäki und Kollegen die viskoelastischen Eigenschaften eines Multischichtsystems (300 Schichten) aus Polydiallylaminhydrochlorid und Natrium-Polystyrensulfat anhand von QCM-Messungen bestimmen und verifizieren [38].

Oftmals wird die QCM-Technik mit anderen Methoden kombiniert, wie zum Beispiel zyklischer Voltammetrie [28], Randwinkelmessung [30], Ellipsometrie [34], AFM, Surface-Plasmon-Resonanz- und X-Ray-Photoelektronen-Spektroskopie [29]. Durch diese Kombinationen können tiefere Einblicke in die Beschaffenheit des adsorbierten Materials, wie zum Beispiel Wassergehalt, Dicke, Permeabilität und Homogenität der Schicht gewonnen werden. Ebara und Okahata verwendeten einen Schwingquarz zur Messung der Adsorption von Mellitin und β -Globulin an einer Lipidmonolayer an einer Wasser-Luft-Grenzfläche und konnten unterschiedliche Adsorptionsmechanismen bei hohem und niedrigem Lateraldruck feststellen [39].

Die Anwendung der Quarzmikrowaage zur Untersuchung von unspezifischen Adsorptionsvorgängen bietet hauptsächlich zwei große Vorteile: Erstens kann der Adsorptionsverlauf direkt on-line verfolgt werden, was die Ermittlung von kinetischen Parametern zulässt. Zweitens ist eine zusätzliche Markierung des Analyten durch die unspezifische Massenempfindlichkeit der Quarzmikrowaage nicht erforderlich.

Um mit Hilfe der Quarzmikrowaage die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor-Liganden-Paaren direkt zu detektieren, ist grundsätzlich die Immobilisierung eines Bindungspartners an der Quarzoberfläche notwendig. Dazu stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe 2.6).

2.5.4. Piezoimmunosensoren

Eine starke Anwendung fand die QCM-Technik zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen. So genannte Piezoimmunosensoren können zur

Konzentrationsbestimmung von sowohl Antigenen als auch von Antikörpern benutzt werden. Die Bestimmung kann direkt erfolgen, d.h. auf dem Sensor wird der Antikörper gebunden und das Antigen aus einer Lösung wird gebunden und kann so bestimmt werden bzw. zur Bestimmung von Antikörpertitern kann auch das Antigen auf dem Sensor gebunden werden.

Die direkte Bestimmung von Antikörpern ist dabei leicht möglich, da die molekulare Masse von Immunglobulinen groß genug ist, um ein ausreichendes Sensorsignal in Form einer Frequenzabnahme durch Masseanlagerung zu erzeugen. Zahlreiche Arbeiten konnten die Anwendung der QCM-Technik als Immunosensor für Antikörper erfolgreich in verschiedenen Modellen zeigen. Bereits 1986 konnten Thompson et al. zeigen, dass mit Antigen-beschichteten Quarzresonatoren Antikörperbindungen in wässrigen Lösungen verfolgt werden können [40]. Allerdings beobachteten sie eine Frequenzerhöhung bei der Antikörperbindung und führten diesen Umstand auf Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften zurück. Davis und Leary konnten 1989 zeigen, dass bei der Bindung von Antikörpern erwartungsgemäß eine Frequenzabnahme erfolgt [41], wie es dann auch in allen folgenden Arbeiten beschrieben wurde. Dass tatsächlich eine Änderung der viskoelastischen Eigenschaften durch die Antigen-Antikörperbindung erfolgt, konnten Höök et al. durch Messung der Dämpfung während der Bindungsreaktion zeigen [24]. Auch durch Impedanzspektroskopie wurde der Einfluss von Antigen-Antikörperbindung auf die Schwingungseigenschaften von Quarzresonatoren untersucht [42]. Diese Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass die Frequenzänderung zu einem Großteil durch die angelagerte Masse hervorgerufen wird. Die Dämpfung durch die veränderten viskoelastischen Eigenschaften bei der Antigen-Antikörper-Bindung ist höher als bei einer reinen Physisorption oder der kovalenten Immobilisierung von Antikörpern. Die auftretende Dämpfung wird zu einem Großteil Energieverlusten innerhalb des Proteins durch die Scherbelastung und damit verbundenen Mikrostrukturänderungen zugeschrieben.

Die Quarzmikrowaagentchnik wurde eingesetzt zur Bestimmung von HIV-Antikörpern in humanem Serum[43, 44], von *Schistosoma japonicum*-Antikörpern in Kaninchenserum [45] und von Antikörpern gegen das afrikanische Schweinefieber-Virus in Schweineserum [46].

Ebenfalls breite Anwendung findet die Quarzmikrowaagentchnik zur Bestimmung von Antigen-Konzentrationen in Lösung. Zur Beschichtung des Sensors wird dazu ein korrespondierender Antikörper verwendet. Antikörper können gegen eine Vielzahl von Stoffen gebildet und in größerem Maßstab hergestellt werden. Die Bindung des Antigens an den auf dem Quarzresonator immobilisierten Antikörpern kann wiederum durch die Masseanlagerung und der damit verbundenen Frequenzänderung verfolgt werden. So wurde

unter anderem die Konzentration von verschiedenen Herpes-Viren [47], Cortisol [48], α -Fetoprotein in humanem Serum [49], Orchideen-Viren in Pflanzenextrakten [50] und Chloramphenicol [51] bestimmt. Die Durchführung eines kompetitiven Versuchsaufbaus, bei dem ein gelöster Antikörper um die Bindung mit dem Antigen in Lösung und mit auf dem Quarz immobilisierten Antigen konkurriert, konnten Pribyl et al. für die Bestimmung von Atrazin eine höhere Sensibilität als durch die direkte Bindung von Atrazin an immobilisierten Antikörper erreichen [52]. Durch einen kompetitiven Versuchsaufbau gelingt auch die Bestimmung von Antigenen, die durch ihr geringes Molekulargewicht keine ausreichend hohe Massebeladung verursachen und so nicht direkt bestimmt werden könnten, wie Zhou und Cao für 2,3,7,8,-Tetrachlordibenzo-p-dioxin zeigen konnten [53]. Eine weitere Möglichkeit zur Verstärkung des Sensorsignals wurde von Ebersole und Ward beschrieben [54]. Durch die Verwendung eines zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers gegen das bereits am Sensor gebundene Antigen erfolgt die enzymatische Reaktion eines löslichen Substrates in ein unlösliches Produkt, welches ausfällt und sich auf dem Quarzsensord niederschlägt. Dieser Niederschlag wird als große Masseanlagerung mit einer hohen Frequenzänderung detektiert und verstärkt so ähnlich wie bei den bekannten ELISA-Techniken das Messsignal.

Als Alternative zur Beschichtung des Quarzsensors mit Antikörpern wurde von Liss et al. die Verwendung eines Aptamers beschrieben [55]. Aptamere bestehen aus Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer 3D-Struktur Affinitäten zu Proteinen ausbilden und ähnlich wie Antikörper verwendet werden können [56]. Von Vorteil sind die einfache, synthetische Herstellung, eine verbesserte Regenerationsfähigkeit des Sensors und eine erhöhtes Signal bei der Antigenbindung, da eine Aptamerschicht aufgrund ihres geringeren Platzbedarfs dichter gepackt werden kann und so mehr Bindungsstellen für das Antigen pro Sensorfläche zur Verfügung stehen. Die Empfindlichkeit und Selektivität ist mit einer herkömmlichen Antikörperbeschichtung vergleichbar [55].

Aber nicht nur die Konzentrationsbestimmung eines Antigens oder Antikörpers ist mit der Quarzmikrowaage möglich. Durch die on-line Verfolgung der Bindung können kinetische Parameter wie die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante (k_{Ass} und k_{Diss}) und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) ermittelt werden.

2.5.5. Ermittlung von kinetischen Bindungsparametern aus QCM-Messungen

Die Bindung zwischen einem gelösten Molekül A und dem auf der Quarzoberfläche immobilisiertem Molekül B kann häufig als Reaktion nach Pseudo-erster Ordnung aufgefasst werden und die Bildung des Komplexes AB erfolgt reversibel nach Gleichung (10).



Den zeitlichen Verlauf der Produktbildung AB kann man durch

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{Ass} \times [A] \times [B] - k_{Diss} \times [AB] \quad \text{Gleichung (11)}$$

erfassen. Durch Substitution von

$$[B] = [B]_0 - [AB], \quad \text{Gleichung (11)}$$

wobei $[B]_0$ die Konzentration zum Zeitpunkt $t=0$ ist, erhält man

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{Ass} \times [A] \times ([B]_0 - [AB]) - k_{Diss} \times [AB]. \quad \text{Gleichung (12)}$$

Wie bereits dargestellt, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Massebeladung und Frequenzänderung. Dass eine lineare Beziehung auch für Proteinadsorptionen in wässrigen Medien gilt, konnte durch Rickert et al. am Beispiel von Biotin-BSA / Streptavidin-Multilayern gezeigt werden [57]. Die Konzentration des gebundenen Komplexes AB kann also durch die gemessene Frequenzänderung ΔF ersetzt werden.

$$\frac{d[AB]}{dt} = \frac{dF}{dt} = k_{Ass} \times [A] \times (F_{max} - F_t) - k_{Diss} \times F_t \quad \text{Gleichung (13)}$$

F_{max} gibt die maximale Frequenzänderung bei vollständiger Belegung des Sensors mit Produkt AB an, während F_t die Frequenzänderung zum Zeitpunkt t angibt. Die Konzentration des gelösten Moleküls A kann in einem kontinuierlich fließenden System als konstant angesehen werden. Um nun die Gleichgewichtsbindungskonstante K_B zu ermitteln kann in einem ersten Ansatz die Frequenzänderung F_{GG} bei Gleichgewichtseinstellung bei verschiedenen Konzentrationen von A ermittelt werden. Das Gleichgewicht ist dadurch charakterisiert, dass Assoziation und Dissoziation in gleichem Maße auftreten und es gilt:

$$\frac{dF}{dt} = k_{Ass} \times [A] \times (F_{max} - F_{GG}) - k_{Diss} \times F_{GG} = 0 \quad \text{Gleichung (14)}$$

Durch Umformung erhält man

$$\frac{F_{GG}}{[A]} = K_B \times F_{max} - K_B \times F_{GG} \quad \text{Gleichung (15)}$$

Ein Plot von $F_{GG}/[A]$ gegen F_{GG} liefert eine Gerade mit dem Anstieg $-K_B$ und dem Schnittpunkt mit der X-Achse $K_B \times F_{max}$. So kann durch lineare Regression K_B und F_{max} ermittelt werden.

Eine zweite Methode gelangt durch Integration von Gleichung (13) zu

$$\Delta F = -\frac{k_{Ass} \times [A] + F_{max}}{k_{Ass} \times [A] + k_{Diss}} \times (1 - e^{-[k_{Ass} \times [A] + k_{Diss} \times (t-t_0)]}) \quad \text{Gleichung (16)}$$

Wird in einem Durchflusssystem gemessen, kann nach erfolgter Bindung des Moleküls A mit Puffer gespült werden, so dass nun nur noch die Dissoziation des Komplexes AB verfolgt wird, die sich darstellen lässt durch

$$\frac{dF}{dt} = -k_{Diss} \times F_t \quad \text{Gleichung (17)}$$

Durch Integration erhält man

$$\Delta F = \Delta F_0 \times e^{-k_{Diss} \times (t-t_0)} \quad \text{Gleichung (18)}$$

Die Gleichungen (16) und (18) können mit Hilfe einer nicht-linearen Regression an die in Realzeit gemessenen Sensogramme (Frequenzänderung gegen die Zeit) einer Bindung zwischen A und B mit anschließender Dissoziation angepasst werden und daraus die Bindungsparameter k_{Ass} und k_{Diss} ermittelt werden. Die Gleichgewichtsdissoziationsskonstante K_D ergibt sich zu

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}} \quad \text{Gleichung (19)}$$

und kann so aus den ermittelten Werten von k_{Ass} und k_{Diss} bestimmt werden.

So gelang Hengerer und Kollegen mit Hilfe der Quarzmikrowaage nicht nur der Nachweis von Affinitäten verschiedener Antikörpern einer Phagen-Bibliothek, sondern auch die zeitgleiche Bestimmung der kinetischen Parameter k_{Ass} , k_{Diss} und K_D der Bindung [58, 59]. Die mit dieser Methode erhaltenen Bindungskonstanten stimmen gut mit den Bindungskonstanten, die mit anderen Methoden wie ELISA- und SPR-Technik ermittelt wurden, überein.

Eine weitere Methode der Bestimmung von Bindungskonstanten ist die Anpassung der Messdaten (Δf) an eine Langmuir Adsorptionsisotherme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration ($[Ligand]$).

$$\Delta f = \Delta f_{max} \times \frac{K_B \times [Ligand]}{1 + K_B \times [Ligand]} \quad \text{Gleichung (20)}$$

Voraussetzung für die Anwendung ist die energetische Gleichberechtigung der Bindungsplätze und deren homogene Verteilung auf dem Sensor. So wurde von Janshoff et al. die Bindungskonstante für Erdnussagglutinin an das Gangliosid G_{M1} in einer Lipidschicht bestimmt [60].

2.5.6. Untersuchungen von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

Die Anwendung der Quarzmikrowaagentechnik ist nicht auf die Detektion von Antigen-Antikörper-Reaktionen beschränkt. Prinzipiell kann nahezu jede spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung mit Hilfe der QCM-Technik untersucht werden. Voraussetzung ist lediglich die Immobilisierung eines Bindungspartners auf der Quarzoberfläche und eine Masseanlagerung bei der Bindung des gelösten zweiten Bindungspartners, die eine ausreichend große Frequenzänderung hervorruft.

Aufgrund dieser einfach zu erfüllenden Voraussetzungen wurde eine Vielzahl von Untersuchungen von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit der Quarzmikrowaage publiziert. Bereits 1987 wurde von Muramatsu et al. die Bindung von Immunglobulinen an immobilisiertes Protein A untersucht [61].

Ebenso wurde die Bindung von Erdnussagglutinin an Rezeptor-haltigen Lipidmembranen bestimmt und detaillierte kinetische Studien unternommen [60]. Auch die Wechselwirkung von Raf-C1 [62], Annexin A1 [63] und Annexin A2-Tetramer [64] mit festkörpergestützten Lipidmembranen wurden detailliert mit der Quarzmikrowaagentechnik untersucht. Dabei konnten nicht nur Bindungskonstanten bestimmt werden, auch Ca^{2+} -Abhängigkeiten, Reversibilitäten und Abhängigkeiten von der Membranlipid-Zusammensetzung wurden ermittelt. Anhand der durchgeführten Studien konnte ein tieferer Einblick in das Bindungsverhalten von Proteinen mit Lipidmembranen gewonnen werden. Liu et al. setzten die Quarzmikrowaage zur Untersuchung der Wechselwirkung kleiner immobilisierter Moleküle wie zum Beispiel Sulfamethazin, Sulfamethoxazol [65] und Histidin [66] mit verschiedenen Serumproteinen ein. Dabei erlaubte die Versuchsanordnung das Screening auf eine Vielzahl von Proteinen.

Die Anwendung der Quarzmikrowaage als Sensor zur Bestimmung von Substanzkonzentrationen wurde ebenfalls beschrieben. Anhand der linearen Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Masseanlagerung kann das Sensorsignal zur Konzentrationsbestimmung nach vorheriger Eichung herangezogen werden. So wurden mit Quarzresonatoren zum Beispiel Sensoren für Acetylcholin [67] und Shiga-Toxinen aus *E.coli* [68] durch die Bindung an spezifische Rezeptoren beschrieben.

2.5.7. Untersuchung von Nukleinsäuren

Die Quarzmikrowaage wurde erfolgreich zur Detektion von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei wurde unter anderem die Hybridisierung von einzelsträngiger DNA mit immobilisierten komplementären DNA-Strängen [69, 70, 71, 72] oder PNA-Strängen [73, 74] verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von PNA-Oligomeren die

Detektion von einzelnen Mismatches in der Basensequenz ermöglicht wird. Eine Erhöhung der Sensitivität wurde auch durch eine Verstärkung mit Gold-Nanopartikeln erreicht [75] oder durch die nach der Hybridisierung erfolgende Bindung eines Mismatch-bindenden-Proteins an den DNA-Doppelstrang [76]. Die Quarzmikrowaage wurde eingesetzt zur Detektion der bei der β -Thalasämie auftretenden Genmutation [77] oder genetisch modifizierten Organismen [78]. Ebenso konnte die Bindung von Proteinen und Peptiden an immobilisierten DNA-Doppelsträngen verfolgt werden [79, 80]. Auch die zeitliche Verfolgung der enzymatischen Aktivität einer Polymerase konnte durch den Einsatz der Quarzmikrowaage erfolgen [81, 82] ebenso wie die Spaltung von doppelsträngiger DNA durch eine Nuklease [83]. Einen pharmazeutisch äußerst interessanten Ansatz bietet die Quarzmikrowaage in der Charakterisierung der Bindung von Arzneistoffen mit direktem Angriff an den Nukleinsäuren, wie zum Beispiel Doxorubicin [84], Platinverbindungen [85], Nogalamycin [86] oder Mitoxantron [87].

2.5.8. Die QCM-Technik zur Detektion zellulärer Systeme

2.5.8.1. Allgemeine Aussagen

Die Quarzmikrowaagentechnik wurde in vielfältigen Ansätzen zur Charakterisierung von zellulären Systemen herangezogen. Dies war jedoch erst möglich, nachdem adäquate Beschaltungen von Schwingquarzen in flüssigen Medien zur Verfügung standen. Die Entwicklung eines Sensors zur Detektion von zellulären Systemen, insbesondere zur Bestimmung und Quantifizierung von Bakterien, ist in der Lebensmittelindustrie und der klinischen Diagnostik von großem Interesse. Dabei sollen zeitaufwendige Methoden, wie das Ausstreichen auf Nährmedien und anschließende mikroskopische Bestimmung und Zählung durch einfache, spezifische und schnelle Detektionsmethoden am besten direkt in biologischen Medien ersetzt werden. Die QCM-Technik bietet dafür durch die on-line Erfassung der masseproportionalen Resonanzfrequenz und die große Variabilität in der Beschichtung des Sensors mit sensitiven Schichten hervorragende Voraussetzung. In den vergangenen Jahren sind daher eine ganze Reihe von Versuchsanordnungen zur Bestimmung von zellulären Systemen publiziert worden.

Bereits 1993 konnten Gryte et al. die Adhäsion von Affennierenzellen auf Quarzsensoren verfolgen [88]. Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um adhärenz Zellen, d.h. um Zellen, die fest an bestimmten Oberfläche „verwachsen“ und nicht durch einfaches Spülen von dieser entfernt werden können. Eine Ablösung solcher Zellen gelingt durch eine Trypsinbehandlung. Die von Gryte und Kollegen verwendeten Affennierenzellen waren eine Stunde nach Zugabe auf der Quarzgoldelektrode bereits gespreitet. Dabei wurden

Frequenzabnahmen der verwendeten 5 MHz-Quarze von 280 bis 460 Hz gemessen (~ 1270 bis 2090 Hz/cm^2). Durch mikroskopische Kontrollen konnte gezeigt werden, dass die komplette Sensoroberfläche mit einem Zellmonolayer bedeckt war. Die Berechnung der Masse anhand der gefundenen Frequenzabnahme mit der Sauerbrey-Gleichung liefert jedoch keine befriedigenden Werte, da eine Zellmonolayer eine theoretische Frequenzänderung von -116000 Hz nach Sauerbrey hervorrufen müsste. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Voraussetzungen zur Anwendung der Sauerbrey-Gleichung nicht gegeben sind. Insbesondere handelt es sich bei Zellen nicht um rigide, dünne und gleichmäßig verteilte Adsorbatschichten. Vielmehr wird durch eine adhärierte Zellschicht die Viskosität und Dichte an der Sensoroberfläche zum Teil erheblich verändert. Daraus folgt, dass die festgestellte Frequenzänderung nicht ausschließlich auf die reine Masseanlagerung von Zellmaterial zurückzuführen ist. Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist die Eindringtiefe der akustischen Welle in das den Quarz umgebende Medium. Wie bereits beschrieben, wird die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes durch Wechselwirkungen mit dem angrenzenden Medium beeinflusst. Dabei dringt die akustische Welle nur in einem sehr begrenzten Gebiet in das umgebende Medium ein. Die Eindringtiefe ist abhängig von der Grundfrequenz des Quarzes sowie Dichte und Viskosität des Mediums. Sie beträgt etwa 250 nm in Wasser bei Raumtemperatur. Die Dicken von adhärierten Zellschichten liegen generell oberhalb dieses Wertes. Damit kann also die Resonanzfrequenz des Quarzsensors nur von einem Bruchteil der Zellmasse beeinflusst werden. Hinzu kommt ein Abfall der Eindringtiefe durch die zu erwartende höhere Viskosität einer Zellschicht. Der Einfluss der Eindringtiefe der akustischen Welle in die oberflächennahe Umgebung wird durch ein Vergleichsexperiment mit Latexpartikeln von zellähnlicher Größe, Dichte und damit Masse deutlich. So stellten Gryte et al. nur eine sehr geringe Frequenzabnahme ($\sim 10 \text{ Hz}$) mit $10 \mu\text{m}$ großen Latexpartikeln fest. Diese festen Partikel können nur an einer kleinen Kontaktfläche mit der Quarzoberfläche in Wechselwirkung treten. Der Quarz kann nur einen Bruchteil der Partikel bedingt durch die Eindringtiefe wahrnehmen. Eine starke Abweichung zwischen der berechneten Masse nach Sauerbrey und der tatsächlich auf der Sensoroberfläche vorhandenen Masse ist die Folge. Da es sich bei Zellen um flexiblere Strukturen handelt, kommt es durch eine Abflachung der Zellen zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche mit der Oberfläche. Dieses Phänomen ist auch mikroskopisch sichtbar. Dadurch kann die größere Frequenzabnahme im Vergleich zu den „gleich schweren“ Latexpartikeln erklärt werden. Die Abflachung der Zellen spielt wahrscheinlich die entscheidende Rolle bei der Frequenzantwort des Schwingquarzes auf Zelladhäsionen. So konnten im Jahr 1992 Matsuda und Kollegen durch Elektronenmikroskopaufnahmen am Beispiel von Blutplättchen zeigen, dass die

Frequenzänderung nicht nur mit der Anzahl an adhärenierten Zellen, sondern auch mit deren Adhäsionszustand korreliert [89]. Sie fanden einen biphasischen Verlauf der Resonanzfrequenz bei der Adhäsion von Plättchen an den Goldelektroden. Dabei wird der erste auftretende Frequenzabfall der tatsächlichen Adhäsion zugeordnet, während die zweite Phase des Abfalls der Abflachung und dem „Spreiten“ der Zellen zuzuordnen ist. Ein ähnliches Verhalten wurde von Redepenning et al. für das Anhaften von Osteoblasten auf Schwingquarzen beschrieben [90]. Über eine Zeitspanne von sechs Stunden wird nach Zugabe der Zellsuspension ein Frequenzabfall gemessen. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte die tatsächlich von Zellen bedeckte Fläche der Goldelektrode des Sensors visualisiert und quantifiziert werden. Es zeigte sich eine gute lineare Korrelation der Oberflächenbelegung mit der ermittelten Frequenzabnahme. Dabei ist eine Zunahme der Oberflächenbelegung nicht durch die Adhäsion neuer Zellen sondern durch das Aufspreiten von bereits an der Oberfläche haftenden Osteoblasten bedingt, deren Durchmesser von etwa 10-15 μm in Suspension bis auf 50 μm im voll gespreiteten Zustand anwächst. Dabei nimmt die Höhe der Zelle bis auf 1 μm ab. Da jedoch die Eindringtiefe der akustischen Welle kleiner als 1 μm ist, wird die Abnahme der Zellhöhe durch den Quarzsensoren nicht erfasst. Auch hier versagt die Berechnung der Masse nach der Sauerbrey-Gleichung. Die gemessenen Frequenzänderungen betragen nur ein Zehntel der nach Sauerbrey zu erwartenden Frequenzabnahme, im vorliegenden Fall etwa -500 Hz im Vergleich zu -5600 Hz für die verwendeten 5 MHz-Quarze bei 100%iger Bedeckung. Die Bildung von mehreren Zellschichten führt nicht zu einer weiteren Frequenzabnahme, was wiederum durch die geringe Eindringtiefe der akustischen Welle in das viskose Medium, hier eine Zellschicht, erklärt werden kann. Redepenning et al. betrachteten die Osteoblastenschicht als reine viskoelastische Beladung des Schwingquarzes und berechneten mit Gleichung (8) Viskositäten für die Zellschichten von $0,03 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Viskosität von Erythrozyten beträgt zum Vergleich etwa $0,01$ bis $0,05 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [91].

2.5.8.2. Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der QCM-Technik

Nivens et al. konnten die QCM-Technik einsetzen um die Bildung eines Biofilms aus *Pseudomonas cepacia* zu verfolgen [92]. Sie fanden eine Korrelation zweiter Ordnung zwischen Zellzahl und gemessener Frequenzänderung. Dabei gaben die Autoren zu beachten, dass ein Biofilm aus *P. cepacia* aus mehreren Zellschichten bestehen kann. Es können durch den Schwingquarz jedoch nur die Zellen mit direktem Oberflächenkontakt erfasst werden. Zudem können sich bei der Bildung eines Biofilms die viskoelastischen Eigenschaften der unmittelbar auf der Oberfläche befindlichen Zellen durch Änderungen der Zellmorphologie

oder Abscheidung von Biopolymeren ändern und die Frequenz des Schwingquarzes zusätzlich beeinflussen. Diese Umstände bedingen wahrscheinlich die Nichtlinearität der Beziehung zwischen Frequenzabnahme und Bakterienzahl. Dabei gelang es den Autoren durch exakte Temperierung und Konstanz der Luftfeuchte eine Sensordrift zu unterdrücken, so dass die Biofilmbildung auch über mehrere Tage verfolgt werden konnte.

Eine weitere innovative Methode zu Bestimmung von Bakterien mit Hilfe der QCM-Technik entwickelten Bao und Kollegen [93]. Sie nutzten die Fähigkeit verschiedener Bakterien, einen festen Film aus Gelatine zu verflüssigen. Der Übergang eines Gelatinefilms vom festen in den flüssigen Zustand kann durch die damit verbundene Viskositätsänderung gut mit der QCM-Technik erfasst werden. Dabei fanden Bao et al. eine lineare Korrelation zwischen der Bakterienzahl und der Zeitdauer bis zum erkennbaren Verflüssigen eines auf dem Quarz befindlichen Gelatinefilms. So konnte die Zellzahl von *Staphylococcus epidermidis* bestimmt werden. Dabei kommt der Methode zu Gute, dass alle Bakterien, die Gelatine verflüssigen können, nach vorheriger Kalibrierung des Systems bestimmt werden können, wie für *Proteus vulgaris* gezeigt wurde [94].

Die am weitesten verbreitete Methode der Bestimmung von Bakterien mittels der QCM-Technik ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird ein spezifischer Antikörper auf dem Quarzsensoren immobilisiert und mit einer Suspension von Antikörpertragenden Zellen inkubiert. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten der Versuchsanordnung. Zum einen kann der Quarz vor und nach der Antigen-Antikörper-Reaktion getrocknet an Luft vermessen werden. Diese so genannte „Dip-and-dry“-Methode bietet den Vorteil, dass nur mit geringen viskoelastischen Effekten gerechnet werden muss und in erster Näherung die Sauerbrey-Gleichung angewendet werden kann um die adsorbierte Masse zu berechnen. Als zweite Möglichkeit kann der Quarzsensoren mit einer Suspension der zu bestimmenden Zellen gespült werden und das Messsignal direkt on-line verfolgt werden. Durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion konnten beispielsweise Zellzahlen von *Candida albicans* [95], *Chlamydia trachomatis* [96], *Vibrio cholerae* [97], *Salmonella typhimurium* [98, 99], *S. prathyphi* A [100] und *Pseudomonas aeruginosa* [101] bestimmt werden. Es gelang ebenso zwischen unterschiedlichen *Salmonella*-Serogruppen zu differenzieren und deren Zellzahlen zu ermitteln [102]. Die Bestimmung von Enterobakterien konnte mit Hilfe eines Antikörpers gegen die Enterobacteriaceen-Familie gezeigt werden [103]. Eine interessante Studie von Minnuni et al. beschreibt ein Protokoll zur Bestimmung von *Listeria monocytogenes* durch Immobilisierung der Listerien auf dem Sensor und die anschließende Detektion einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion [104].

Eine andere Vorgehensweise zur Bestimmung von *Staphylococcus epidermidis* durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion beschreiben Pavey und Kollegen [105]. Sie benutzten die Änderung von viskoelastischen Eigenschaften der Analysenlösung durch die Reaktion von Antigen mit seinem Serum, das spezifische Antikörper enthielt. Der Vorteil dieser Methode ist die nicht notwendige Modifizierung des Quarzsensors und die somit breite Einsetzbarkeit dieser Methode. Die Sensitivität ist mit herkömmlichen Agglutinationstests vergleichbar, das Ergebnis liegt jedoch schon nach 15 min vor und ist damit wesentlich schneller als im Platten-Agglutinationstest (24 h). Mit dieser Methode werden aber keine direkten Zellantigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen, sondern nur die durch eine *S. epidermidis* induzierte Antikörperproduktion im Patientenserum.

Durch die Verwendung eines so genannten „molecular imprinted polymer“ (MIP) konnte eine sehr starke und spezifische Interaktion von Hefezellen mit dem Quarzsensor beobachtet werden [106]. Die gefundenen Frequenzabnahmen waren mit mehreren kHz in der Größenordnung, wie sie durch die Sauerbrey-Gleichung vorherberechnet werden konnten. Dies kann durch die sehr große Kontaktfläche der Hefezellen mit dem „Fingerabdruck-Polymer“ erklärt werden, worin die Zellen exakt geometrisch passen. Interessanterweise verursachte die Wechselwirkung von kleineren Bakterienzellen mit dem MIP eine Frequenzzunahme. Ebenfalls eine Zunahme der Resonanzfrequenz beobachteten Marxer et al. bei der Adhäsion von HeLa-, Affennierenepithel- und A549-Lungenkarzinomzellen [107]. Dabei handelt es sich jeweils um adhärenente Zelllinien. Nach einer initialen Frequenzabnahme stieg die Resonanzfrequenz wieder an, bis sie höhere Werte als zu Beginn der Adhäsion erreichte. Eine Desorption von Zellen konnte mikroskopisch ausgeschlossen werden, vielmehr konnte durch eine Behandlung der adhärenierten Zellen mit verschiedenen Zytoskelett-aktiven Substanzen gezeigt werden, dass eine Änderung der Zellviskosität im Verlaufe des Zellsreadings für den Frequenzanstieg verantwortlich ist. Die Erhöhung der Resonanzfrequenz durch Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften konnte durch Kanazawa theoretisch gezeigt werden [108].

2.5.8.3. Untersuchungen spezifischer Zell-Substrat-Wechselwirkungen

Neben dem Interesse in der Bestimmung von Zellzahlen wurde die Quarzmikrowaagenteknik auch zur Untersuchung von spezifischen Zell-Substrat-Wechselwirkungen eingesetzt. In einer Arbeit von Muratsugu et al. wurde die Adhäsion von Blutplättchen an Kollagen-beschichteten Quarzsensoren untersucht [109]. Dabei konnten die Autoren die spezifische Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen Typ I detektieren. Die gefundenen Frequenzabnahmen von etwa 43 Hz für die verwendeten 9 MHz-Quarze sind

dabei etwa 200-mal kleiner als nach der Sauerbrey-Gleichung erwartet würde. Eine geringe unspezifische Adhäsion an BSA-beschichteten Quarzen (-6 Hz) wurde ebenso festgestellt. Eine starke Verringerung der spezifischen Adhäsion konnte durch den Zusatz von EDTA zum Assay-Puffer (-4 Hz) oder der Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen (-11 Hz) gezeigt werden.

Die Adhäsion von Neutrophilen an Protein-beschichteten Quarzsensoren untersuchten Nimeri und Kollegen [110]. Dabei konnten anhand der Frequenz- und Dämpfungsänderungen Unterschiede in Kinetik und Spreitverhalten der Leukozyten an verschiedenen Proteinschichten (humanes Serumalbumin, Immunglobulin G und Fibrinogen) detektiert werden. Die stärkste Wechselwirkung, d.h. höchste Frequenzabnahme und Dämpfungszunahme, wurde dabei für IgG festgestellt.

Die Quarzmikroaagenteknik wurde außerdem in mehreren Arbeiten zur Untersuchung der Zelladhäsion, des Spreitens und des Wachstums ausschließlich adhärenter Zellen verwendet. Dabei konnten verschiedene Parameter der Zelladhäsion und -spreitung näher untersucht werden. Bereits 1991 wurde von Ebersole und Kollegen ein Versuchsaufbau zur Bestimmung der Zellvitalität beschrieben, basierend auf der Detektion der Änderung des pH-Wertes hervorgerufen durch metabolisch erzeugte Säuren [111]. In diesem Versuchsaufbau wird also keine tatsächliche Wechselwirkung von Zellen mit der Quarzoberfläche verfolgt. Frederiksson et al. zeigten die direkte Adhäsion von CHO- und Affenierenepithelzellen auf Polystyren-beschichteten Quarzsensoren [112]. Dabei konnten Unterschiede zwischen beiden Zelltypen festgestellt werden. Auch zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Adhäsionsverhalten an hydrophoben Polystyren und hydrophilen, UV/Ozon-behandelten Polystyren. Der Einfluss von Serum-haltigem Medium wurde ebenfalls am selben Zellsystem untersucht [113].

Die Bildung einer Zellmonolayer verschiedener Zelllinien wurde von Wegener et al. mit Quarzsensoren untersucht [114, 115, 116]. Dabei wurden spezifische Frequenzabnahmen für unterschiedliche Zelllinien festgestellt. Diese korrelierten mit der Dichte der Zellschicht, d.h. für sehr dicht wachsende Zellen wurden größere Frequenzabnahmen gefunden als für weniger dicht wachsende. Diese Untersuchungen wurden sehr elegant mit einer gleichzeitig anwendbaren Impedanzanalyse gekoppelt. Wiederum waren die ermittelten Frequenzabnahmen um Größenordnungen geringer als durch die Sauerbrey-Gleichung vorhergesagt. Durch die Impedanzanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen nicht wie eine rigide Schicht verhalten, sondern vielmehr ein viskoelastisches Verhalten aufweisen, dass die Frequenzantwort des Quarzes entscheidend beeinflusst. Die Adhäsion der verschiedenen Zelllinien wird durch Integrine vermittelt. Die Autoren konnten durch Inhibierungsversuche mit RGD-Ligand-Peptiden zeigen, dass die räumliche Nähe der Zellen

zur Quarzoberfläche allein nicht ausreichend ist, um eine Frequenzänderung zu bewirken, sondern vielmehr eine spezifische Integrin-vermittelte Wechselwirkung dafür verantwortlich ist. Diese Wechselwirkungen werden wahrscheinlich durch extrazelluläre Matrixproteine verwirklicht, welche aus dem serumhaltigen Medium adsorbiert werden. Die Autoren konnten mit dem vorgestellten Quarzmikrowaagen-Sensor unterschiedliche RGD-Peptide auf deren Wirksamkeit hinsichtlich der Unterdrückung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion untersuchen.

Zhou et al. untersuchten die Adhäsion von Rinderendothelzellen auf Quarzsensoren [117]. Es konnten die Adhäsion der Zellen, ein stimuliertes Wachstum adhärierter Zellen und die Ablösung von Zellen durch Trypsin on-line verfolgt werden. Cans et al. konnten mit Hilfe der QCM-Technik induzierbare Exozytose-Prozesse in konfluent gewachsenen NG108-15- und PC12-Zellen verfolgen und quantifizieren [118]. Marx et al. untersuchten ebenfalls an konfluent gewachsenen Zellen Änderungen des Zytoskeletts durch Nocodazol [119]. Sie konnten eine Dosis-Wirkungskurve für Nocodazol anhand der Quarzsensorantwort aufstellen.

Otto et al. untersuchten mit einer Quarzmikrowaage die Adhäsion von *Escherichia coli* Stämmen mit und ohne Fimbrien in Abhängigkeit von der Oberflächenhydrophilie des Sensors und der Ionenstärke des Mediums [120]. Auch die Abhängigkeit des Adhäsionsverhaltens von der so genannten Cpx-Signal-Kaskade wurde mit Hilfe der Quarzwaage untersucht [121].

Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen das Potential der Quarzmikrowaagentechnik zur on-line-Verfolgung und Charakterisierung von zellulären Prozessen. Im Mittelpunkt stehen dabei Adsorptionsprozesse von adhären Zellen, deren temporärer Verlauf und die Beeinflussung durch äußere Faktoren. Auch die Untersuchung fest adhärierter Zellschichten konnte mit der Quarzmikrowaagentechnik durchgeführt werden. Dabei ist die nicht-invasive, direkte Messung von Änderungen der Zelleigenschaften von großem methodischem Vorteil. Allerdings bedarf es aufgrund der komplexen Einflussnahme von zellulären Systemen auf das Schwingungsverhalten von Quarzresonatoren einer zweiten Kontrollmethode wie zum Beispiel AFM- oder mikroskopischen Untersuchungen, um die Ergebnisse der Quarzmikrowaagenexperimente interpretieren zu können, da die Modellvorstellungen des Schwingungsverhaltens oftmals nicht zufrieden stellende Aussagen zu treffen. Ein Grund dafür ist die Komplexität des zellulären Systems. Des Weiteren fehlen noch hinreichende, einfache Modelle zur Analyse des Schwingungsverhaltens von Quarzresonatoren mit solch einer komplexen Matrix, wie es zelluläre Systeme darstellen.

Daher wurde versucht, das komplexe System nativer Zellen zu vereinfachen. Eine seit längerer Zeit bekannte und angewandte Methode ist die Verwendung von Liposomen als Zellmodell. Im nächsten Teil dieser Arbeit soll deshalb näher auf Untersuchungen von liposomalen Systemen mit der Quarzmikrowaagentchnik eingegangen werden.

2.5.9. Die QCM-Technik zur Detektion liposomaler Systeme

Liposomen sind sphärische Vesikel, die mit einer Lipiddoppelschicht ein wässriges Kompartiment umschließen. Die Größe solcher Liposomen reicht von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern, häufig werden sie in einem Größenbereich von 100 bis 1000 nm eingesetzt. Diese geringe Größe macht die mikroskopische Untersuchung liposomaler Systeme schwierig. Daher bietet sich die Quarzmikrowaage zur Charakterisierung solcher supramolekularen Systeme als Messmethode an. Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über den aktuellen Stand der Fachliteratur geben.

2.5.9.1. Einsatz von Liposomen zur Signalverstärkung

Die relativ hohe Masse von Liposomen im Vergleich zu gelösten Proteinen führte zu einer Reihe von Arbeiten, in denen Liposomen zur Verstärkung eines Messsignals der Quarzmikrowaage eingesetzt wurden.

1998 benutzten Yun und Kollegen die QCM-Technik zur Detektion von Immunoliposomen [122]. Es wurde die Bindung von Antikörpern gegen 2-Phenyloxazon bestimmt. Dabei kam ein bakteriell hergestellter Antikörper zum Einsatz, der mit einem Lipidanker modifiziert ist. Dadurch konnte der Antikörper direkt mittels Dialysemethode mit Octylglykosid in Ei-PC-Liposomen eingebaut werden. Die von Yun und Kollegen verwendeten Immunoliposomen konnten nun lösliches Hapten im Konzentrationsbereich von $10^{-5} - 10^{-8}$ M nachweisen.

Liposomen wurden von Patolsky und Kollegen zur Signalverstärkung bei der Detektion von DNA-Hybridisierungsphänomenen eingesetzt [123]. Dabei wurde der QCM-Sensor mit einem thiolierten DNA-Oligomer in einem Self-Assembling-Verfahren funktionalisiert und anschließend mit einem komplementären DNA-Strang hybridisiert. Dabei war der komplementäre Nukleotid-Strang länger als der erste Primer und an das überstehende Ende konnten Liposomen mit passenden DNA-Strängen angebunden werden. Damit konnte das Messsignal deutlich vergrößert werden, was zu einer höheren Sensitivität führte und die Nachweisgrenze des Komplement-Stranges auf 10^{-9} M senkte.

Alfonta et al. nutzten mit G_{M1} -Gangliosid und Meerrettich-Peroxidase-beladene Liposomen zur Verstärkung des Messsignals eines Choleratoxin-Biosensors [124]. Dabei werden die Liposomen als Träger für die G_{M1} -Liganden und die Meerrettich-Peroxidase

benutzt, die in einer nachgelagerten enzymatischen Reaktion aus 4-Chlor-1-naphtol und H_2O_2 ein unlösliches Produkt liefert, welches auf der Quarzoberfläche präzipitiert und so eine hohe Frequenzänderung hervorruft.

2.5.9.2. QCM-Studien zum Adsorptionsverhalten liposomaler Systeme

Daneben wurden auch Studien zum Adsorptionsverhalten verschiedener liposomaler Präparationen mit der QCM-Technik durchgeführt.

Bereits 1995 konnte die QCM-Technik von Ohlson et al. für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Liposomen herangezogen werden [125]. Die Goldelektrode des Quarzes wurde in einem Self-Assembling-Verfahren mit 16-Mercaptohexadecan-1-ol beschichtet. Liposomen mit dem Gangliosid G_{M1} zeigten eine Adhäsion (Frequenzabnahme von 250 Hz. Nach der Sauerbrey-Gleichung ergibt sich eine Massebeladung von etwa 10 Lipidmonoschichten. Die große Frequenzabnahme deutet auf die Adsorption intakter Vesikel hin. Anschließend konnte die Bindung von Cholera-toxin an die G_{M1} -Ganglioside detektiert werden.

Keller und Kasemo untersuchten die Adsorption von kleinen, unilamellaren Vesikeln (Durchmesser 25 nm, 100 % Ei-Phosphatidylcholin) an unterschiedlich modifizierten Oberflächen eines QCM-Sensors [126]. Dabei konnten erstmals eindrucksvoll die Vorteile der Dämpfungsanalyse gezeigt werden. Keller und Kasemo untersuchten drei unterschiedliche Oberflächen: Hydrophobe Self-Assembling-Schichten von Oktadecan-1-thiol, oxidiertes Gold und SiO_2 -Schichten. Dabei kamen sie zu folgenden Ergebnissen:

Oberfläche	Frequenzabnahme in Hz	Dämpfungsänderung in 10^{-6}	Art der gebildeten Schicht
Oktadecan-1-thiol	13	~ 0	Monolayer
SiO_2	26	~ 0	Bilayer
oxidiertes Gold	90	~ 3	intakte Vesikel

Tabelle 1: Adhäsionsverhalten von Ei-PC-Liposomen an unterschiedlich modifizierte Quarzsensoren nach Keller und Kasemo [126]

Aus Tabelle 1 wird deutlich, dass die intakten Liposomen die größte Änderung der Dämpfung hervorrufen, während planare, fest adsorbierte Lipidschichten mit wenig inkorporiertem Wasser nahezu keine Dämpfungsänderung bewirken. Die starke Frequenzabnahme der intakten Vesikel erklärt sich durch die Erfassung des eingeschlossenen Wassers als Masse. Besonders interessant gestaltet sich dabei die Bildung des Bilayers auf einer SiO_2 -Schicht. Durch die on-line Verfolgung des Messsignals konnten Keller und

Kasemo die biphasische Adsorptionskinetik der Liposomen aufdecken. In einem ersten Schritt werden intakte Liposomen adsorbiert (bis $\Delta f = 60 - 68$ Hz und $\Delta D = 1,2 - 2 \times 10^{-6}$), die dann auf der SiO₂-Oberfläche aufspreiten und eine komplette Lipiddoppelschicht bilden. In einer Monte-Carlo-Simulation wurden von Zhdanov et al. die Adsorption und Spreitung solcher Liposomen untersucht und mit den genannten QCM- und zusätzlichen SPR-Messdaten verglichen [127]. Ein Ergebnis dieser Studie zeigt, dass die Adsorptionskinetik der intakten Liposomen diffusionskontrolliert abläuft. Durch Variation verschiedener Parameter konnten Zhdanov und Kollegen ein Modell entwickeln, das den Messdaten aus QCM- und SPR-Experimenten gut entsprach. Dabei wurde angenommen, dass die Liposomen zunächst als intakte Vesikel auf die SiO₂-Oberfläche binden und nur spreiten, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe zu einem anderen adhären Vesikel oder aus der Spreitung anderer Liposomen bereits gebildeter Bilayergrenzen befinden. Ein spontanes Aufspreiten ließ sich mit den ermittelten Daten nicht in Einklang bringen.

In einer Atomic Force Microscopy Studie konnten Reviakine und Brisson den zeitlichen Verlauf der Adsorption, Fusion und Spreitung von kleinen unilamellaren Vesikeln auf mica zeigen [128] und die Ergebnisse von Keller und Kasemo bestätigen. Dabei bildeten sich auch konfluente Bilayer aus. Es wurde eine Abhängigkeit der Bilayerbildung von der Vesikelgröße und -konzentration, der Art der Herstellung und von der Gegenwart oder dem Fehlen von Ca²⁺-Ionen beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Herstellungsmethode	Radius	Konzentration	Ca ²⁺ oder EDTA-Zusatz	Adsorbatschicht
Ultraschall	~ 12 nm	≤ 0,5 mg/ml	EDTA	Intakte Vesikel
Ultraschall	~ 12 nm	≤ 0,5 mg/ml	Ca ²⁺	Bilayer
Ultraschall	~ 12 nm	~ 1 mg/ml	Ca ²⁺ / EDTA	Bilayer
Extrusion	~ 15 – 25 nm	bis zu 3 mg/ml	EDTA	Intakte Vesikel
Extrusion	~ 15 – 25 nm	0,001 mg/ml	Ca ²⁺	Intakte Vesikel
Extrusion	~ 15 – 25 nm	0,01 mg/ml	Ca ²⁺	Bilayer
Extrusion	~ 50 nm	0,006 mg/ml	EDTA	intakte Vesikel und Bilayer
Extrusion	~ 50 nm	≥ 0,006 mg/ml	Ca ²⁺	Bilayer
Extrusion	~ 100 nm	bis zu 3 mg/ml	Ca ²⁺ / EDTA	Bilayer und aufgelagerte Lipidaggregate

Tabelle 2: Adhäsionsverhalten unterschiedlicher Liposomen an einer mica-Oberfläche nach Reviakine und Brisson [128]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass größere Vesikel, eine höhere Lipidkonzentration und die Gegenwart von Ca²⁺-Ionen die Aufspreitung und Bilayerbildung fördern. Vesikel, die durch Ultraschall hergestellt wurden, neigten schneller zur Fusion und

Bilayerbildung als extrudierte Liposomen. Fusion findet statt, wenn Liposomen den kritischen Fusionsradius übersteigen, der sich aus der freien Energie eines gebundenen Liposoms, dem Krümmungsmodul und Biegemodul der Bilayer und aus dem effektivem Kontaktpotential errechnen lässt [129, 130].

Richter und Kollegen untersuchten in einer Studie von 2003 das Adhäsionsverhalten von Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung an SiO₂-Oberflächen [131]. Dabei wurden von ihnen vier Arten der Adhäsion gefunden.

Lipidzusammensetzung	Art der Adhäsion	Frequenz und Dämpfung
DOPC/DOPS (1:1)	intakte Vesikel	-54 Hz und $2,9 \times 10^{-6}$
DOPC/DOPS (4:1)	erst Vesikel, dann Bilayer	-24,5 Hz (-58 Hz min) $0,1 \times 10^{-6}$ ($2,4 \times 10^{-6}$ max)
DOTAP	sofort Bilayer	-20,5 Hz und $0,2 \times 10^{-6}$
DOPC/DOPS (1:2)	keine Adhäsion	-0 Hz

Tabelle 3: Adhäsionsverhalten unterschiedlicher Liposomen an einer SiO₂-Oberfläche nach Richter et al. [131]

Die Tabelle zeigt, dass ähnliche Ergebnisse wie von Keller und Kasemo [126] beobachtet wurden. Für DOPC/DOPS-Liposomen im molaren Verhältnis 1:1 wurde erst die Adhäsion von intakten Vesikeln beobachtet, die ab einer kritischen Belegung der Oberfläche zu einer Bilayer konvertiert. Dabei konnte durch AFM-Aufnahmen gezeigt werden, dass eine Fusion der Vesikel zu größeren Liposomen vermutlich nicht stattfindet. Es zeigte sich, dass die Spreitung der Liposomen zur Doppelschicht durch spontane Fusion einzelner Liposomen beginnt. Die so gebildeten kleinen Doppelmembranbereiche leiten dann die Fusion von angrenzenden, intakten Liposomen zu Bilayern ein. Dieser Prozess setzt sich bis zur vollständigen Bedeckung der Oberfläche fort, wenn genügend Liposomen vorhanden sind (kritische Lipidkonzentration). Im Falle der DOTAP-Vesikel konnten mittels AFM nur in Einzelfällen intakte Liposomen beobachtet werden. Offensichtlich spielt hier die elektrostatische Anziehung der negativ geladenen SiO₂-Oberfläche auf die positiv geladenen DOTAP-Vesikel die entscheidende Rolle. Diese Kraft führt zu einer sofortigen Fusion der Liposomen zu einer Bilayer, ohne dass der intermediäre Zustand der intakten Liposomenadhäsion nachweisbar war. Im Falle negativ geladener Liposomen (DOPC/DOPS im Verhältnis 1:2) tritt keine Adhäsion von Lipidmaterial mehr auf. Hier scheint die elektrostatische Abstoßung eine Bindung der Liposomen an die Oberfläche zu verhindern. In der Gegenwart von Ca²⁺ Ionen kann die Bildung einer Bilayer erzwungen werden. Die bivalenten Ca²⁺-Ionen können die Ladungsabstoßung kompensieren und es wird erst die

Adsorption von intakten Vesikeln beobachtet, die ab einer kritischen Oberflächenbelegung zu einer Bilayer fusionieren.

In einer Studie aus dem Jahr 2002 untersuchten Reimhult und Kollegen das Adsorptionsverhalten von unterschiedlich großen Ei-PC-Liposomen auf SiO_2 - und TiO_2 -Oberflächen [132]. Die verwendeten Liposomendurchmesser reichten von 25 bis 200 nm. Dabei stellten sie fest, dass nur auf einer SiO_2 -Oberfläche eine Bilayer aus Liposomen gebildet wird, während auf einer TiO_2 -Oberfläche nur intakte Vesikel adhärten. Diese allgemeine Aussage lässt sich qualitativ für alle Vesikelgrößen treffen. Für SiO_2 zeigt sich, dass die gemessenen Minima der Frequenz und Maxima der Dämpfung in ihrem Betrag mit der Größe der Liposomen linear zunehmen. Auch auf TiO_2 wurde eine ähnliche Abhängigkeit der Frequenzabnahme und Dämpfungszunahme mit der Liposomengröße gefunden. Dieser Umstand lässt sich wie folgt erklären: Kommt es zu einer Adhäsion von intakten Vesikeln, nimmt die angelagerte Masse mit der Größe zu. Zieht man dazu noch in Betracht, dass eingeschlossene Wassermoleküle mit zur Frequenzabnahme beitragen, also quasi mitgewogen werden, muss die Frequenz stärker abnehmen, je größer das Liposom ist, wenn die Oberfläche vollständig oder nahezu vollständig belegt ist. Die Adhäsion von größeren Liposomen sollte ebenfalls mit einer Verstärkung der Dämpfung einhergehen, da die aufgelagerte Masse mit zunehmender Größe auch mehr mechanischen Widerstand gegen die Oszillationsbewegungen des Quarzsensors bietet. Da ein Liposom kein kompaktes und undeformierbares Gebilde darstellt, steigt die Dämpfung, je mehr Material angelagert wird. Kommt es dann, wie im Fall von SiO_2 zur Ausbildung einer Bilayer, wurden erwartungsgemäß für alle Liposomengrößen die gleichen Werte für Dämpfung und Frequenzabnahme ermittelt. Ein Unterschied in der Adhäsion der intakten Vesikel wurde zwischen SiO_2 und TiO_2 gefunden. Liposomen derselben Größe verursachen auf SiO_2 eine geringere Dämpfung pro Frequenzabnahme (Hz) als auf TiO_2 . Mit Hilfe einer mathematischen Modulation, basierend auf einem Voigt-Modell [133], der gefundenen Messergebnisse konnte die Höhe der adsorbierten Schicht abgeschätzt werden. Es zeigte sich, dass die Liposomen auf SiO_2 stärker abflachen. Dadurch wird die effektive Höhe der Schicht geringer und die Dämpfung wird geringer pro Frequenzabnahme (angelagerter Masse), da sich ein kompakteres Adsorbat bildet, der mechanische Widerstand ist geringer. Die graphische Darstellung lässt sich gut in Dämpfung vs. Frequenz-Diagrammen realisieren. Der Anstieg der Kurve gibt qualitative Aussagen über die mechanische Dämpfung des Quarzes durch die aufgelagerte Masse wieder.

Stalgren et al. untersuchten mit der QCM-Technik die Adsorption von sehr hoch konzentrierten Liposomen an einer Goldoberfläche [134]. Dabei kamen 1,2% Ei-PC zum

Einsatz, die Liposomen waren etwa 70 nm groß. Bei diesen hohen Konzentrationen wurde eine Adhäsion von < -100 Hz nach 180 min gemessen. In einem ersten Schritt kommt es zu einer schnellen Frequenzabnahme und einem Dämpfungsanstieg, der in einem zweiten Schritt langsamer wird. Dabei wurde keine stabile Endfrequenz erreicht, selbst nach vielen Stunden nicht. Nach dem Spülen mit Wasser beträgt die Frequenzänderung nur noch -24 Hz und die Dämpfung sinkt nahezu auf ihren Ausgangswert. Die Untersuchungen von Keller et al. [126] und Reimhult et al. [132] zeigen ein ähnliches Verhalten. Durch den anschließenden Spülschritt mit reinem Wasser können die adhären, intakten Liposomen zu einer Bilayer umgewandelt werden. Dies kann wahrscheinlich auf den osmotischen Stress zurückgeführt werden, denen die Liposomen ausgesetzt werden, wenn die Lösung von 1,2% Lipid in 1 mM Salzlösung durch Wasser ersetzt wird. Bei der Adsorption von einer Phospholipid-stabilisierten Sojaöl-Emulsion (1,2% Lipid, 20 % Sojaöl) findet sich ein ähnliches Adsorptionsverhalten, allerdings entsteht durch den Spülschritt mit Wasser nur eine Monolayer (Frequenzänderung -10 Hz und Dämpfung nahe 0). Durch die Adsorption von Emulsionströpfchen auf der Goldoberfläche wird die Ausbildung einer Monolayer bevorzugt, in der Weise, dass sich Lipide mit ihren hydrophilen Kopfgruppen an das Gold lagern und mit ihren lipophilen Alkylketten die Öltröpfchen stabilisieren. Nach dem Spülen mit Wasser verbleiben nur noch die Phospholipide an der Goldoberfläche.

Granéli und Kollegen untersuchten die Bildung von Bilayern aus Proteoliposomen, d.h. Liposomen mit in der Membran inkorporierten Protein [135]. Sie verwendeten für ihre Studien eine Nucleotid-Transhydrogenase (TH), ein Protein aus *Escherichia coli* sowie Gramicidin A aus *Bacillus brevis*. TH besitzt neben der transmembranären Domäne noch zwei hydrophile Teile, die in die wässrige Phase ragen und enzymatisch abgespalten werden können. Das Spaltprodukt bleibt in der Membran verankert und besitzt dann, ähnlich wie Gramicidin A keinen hydrophilen Teil mehr oder nur noch einen. Sie stellten keine Veränderung bei der Adhäsion von Proteoliposomen mit und ohne Gramicidin A auf SiO_2 fest, d.h. der Einbau von Gramicidin A behindert nicht die Fusion der Liposomen mit der SiO_2 Oberfläche und die Bilayerbildung. Dagegen zeigen die TH-Liposomen bei geringen Proteinkonzentrationen eine verzögerte Bildung der Bilayer, während bei hohen Proteinkonzentrationen (Protein / Lipid-Verhältnis $>10 \times 10^5$) nur intakte Liposomen adhären. Durch die enzymatische Abspaltung einer oder im verstärkten Maße beider hydrophilen Domänen wird diese Behinderung wieder abgeschwächt, d.h. die hydrophilen Domänen behindern das Aufspreiten der Proteoliposomen auf der SiO_2 -Oberfläche. Dies kann auf der abschirmenden Wirkung der hydrophilen Domänen durch sterische Behinderung

beruhen, die die Wechselwirkungen der Liposomen untereinander und mit der Oberfläche verringert.

1999 nutzten Liebau et al. die QCM-Technik um die Lectin-induzierte Adhäsion/Fusion von Liposomen und Mizellen an support-fixierte Modellmembranen zu untersuchen [136]. Sie konnten zeigen, dass keine Fusion von SPC-Cholesterol-N-Glut-PE-(60:30:10)-Liposomen mit einer Mannose-haltigen DSPC-Membran erfolgt. Erst der Einsatz von Concanavalin A als Mannose-bindendes Lektin, kovalent an die Liposomenaußenhülle gekoppelt, führte zu einer Adhäsion von Liposomen. Die relativ große Frequenzabnahme von 1204 Hz deutet auf die Adhäsion von ganzen Liposomen oder mehrschichtigen Membranen hin. Dies wurde von den Autoren nicht näher untersucht. Der Einsatz von intravesikulär verstärkten Liposomen sowie von Polyethylenglykol-haltigen Liposomen führte zu einer deutlichen Verringerung der Frequenzabnahme. Dies deutet auf die Bildung von Multilayern hin, da eine solche Stabilisierung der Liposomen eine deutliche Abnahme der Sensorantwort bewirkt. Im Falle der Adhäsion von intakten, sphärischen Vesikeln sollte das Sensorsignal in derselben Größenordnung ausfallen. Durch Variation des Mannose-haltigen Lipids (längere Spacergruppe) wurde die Frequenzabnahme um 20% gesenkt. Wurde die spezifische Lektin-Wechselwirkung durch α -D-Methylmannopyranosid inhibiert, konnte die Bindung Con A-haltiger Liposomen ebenfalls um 20% gesenkt werden. Mizellen aus Gallensalzen zeigten keine Adhäsion an DSPC-Membranen, Gallensalz-Phospholipid-Mizellen zeigten eine geringe Adhäsionsneigung während ternäre Mischungen aus NaC / DPPC und Fettsäure die größten Adhäsionen in Abhängigkeit der Kettenlänge der Fettsäure ($C_{14} < C_{16} < C_{18}$) zeigten.

Eine detaillierte Studie zur Untersuchung von spezifisch adhärirten Vesikel führten Pignataro und Kollegen durch [137]. Sie verwendeten 100 nm große unilamelare Vesikel aus DPPC mit unterschiedlichen Gehalten an Biotin-X-DHPE. Der Sensor wurde mit Avidin beschichtet. Die Adsorption von Biotinhaltigen Liposomen wurde nur statisch verfolgt, da unter Flussbedingungen keine Adhäsion im Sinne einer Frequenzabnahme gemessen werden konnte.

Biotingehalt	Frequenzabnahme nach 180 min	Höhe der adhärerten Liposomen (mit SFM bestimmt)
1 mol% Biotin-X-DHPE	20 Hz	50 nm
5 mol% Biotin-X-DHPE	260 Hz	
10 mol% Biotin-X-DHPE	500 Hz	36 nm
20 mol% Biotin-X-DHPE	520 Hz	16 nm
30 mol% Biotin-X-DHPE	550 Hz	8 nm

Tabelle 4: Frequenzabnahme bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Biotingehalt auf Avidin-modifizierten Quarzen nach Pignataro et al. [137]

Tabelle 4 gibt die erhaltenen Frequenzabnahmen für die unterschiedlichen Biotingehalte der DPPC-Liposomen bei der Adhäsion an eine Avidin-Monoschicht an. Wurde nach 180 min der Fluss wieder angelegt, so fiel die Frequenz weiter ab. Die Autoren erklären dies mit dem Aufreißen und Aufspreiten von intakten, adhärerten Liposomen durch Scherkräfte. Sie finden die höchsten Frequenzabnahmen bei den am stärksten abgeflachten Liposomen, bei 30 mol% Biotin-X-DHPE wird nahezu vollständig eine Lipid-Doppel- bzw. -Mehrfachschicht gefunden. Die Autoren folgern daraus, dass die gemessenen Frequenzabnahmen mit der Anzahl der Kontaktpunkte einhergeht, d.h. je mehr Kontaktpunkte zwischen Oberfläche und Liposom desto größer die Abnahme der Resonanzfrequenz. Dieser Befund steht im Widerspruch zur oben bereits beschriebenen Arbeit von Keller und Kasemo [126]. Diese finden eine höhere Frequenz bei der Adhäsion von intakten Liposomen im Vergleich zu adhärerten Lipiddoppelschichten. Die Änderung der Quarzdämpfung wurde von Pignataro et al. nicht gemessen, dieser Parameter hätte einen weiteren Einblick in die Sensorantwort auf adhärerte Liposomen geben können. Die Autoren führten aber eine Analyse der Reibungskraft mit der Spitze einer SFM-Nadel durch. Dabei fanden sie große Unterschiede zwischen der Proteinschicht und der adhärerten Lipiddoppelschicht (30 mol% Biotin-X-DHPE Liposomen), die ebenfalls zum Sensorsignal beitragen könnten, da die QCM-Technik ebenfalls empfindlich gegenüber Viskositäts- und Elastizitätsänderungen an der Sensoroberfläche ist. Zur Erklärung der Tatsache, dass erst nach 800 bis 1000 s die Adhäsion der Liposomen auf der Oberfläche des Sensors erkennbar wurde, führen die Autoren eine zuvor stattfindende Liposomenfusion an. Diese Erklärung scheint aber ebenfalls unbefriedigend, da selbst sehr kleine Liposomen (Durchmesser 25 nm) an einer QCM-Sensoroberfläche gemessen wurden [126].

In einer neueren Studie finden Reiss und Kollegen [138] interessanterweise eine andere Tendenz der Frequenzantwort des QCM-Sensors im Verhältnis zum Biotingehalt der verwendeten Liposomen. Mit steigendem Biotingehalt sinkt die Resonanzfrequenz, wie Tabelle 5 zeigt:

Biotingehalt	Frequenzabnahme
0 mol% Biotin-X-DHPE	400 Hz
1 mol% Biotin-X-DHPE	430 Hz
5 mol% Biotin-X-DHPE	260 Hz
10 mol% Biotin-X-DHPE	190 Hz
20 mol% Biotin-X-DHPE	140 Hz
30 mol% Biotin-X-DHPE	< 50 Hz

Tabelle 5: Frequenzabnahme bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Biotingehalt auf Avidin-modifizierten Quarzen nach Reiss et al.¹³⁸

Diese zur vorherigen Studie konträren Ergebnisse werden von den Autoren nicht diskutiert. Vielmehr folgern sie aus ihren Beobachtungen, dass sich bei hohem Biotin-Lipidgehalt eine komplette Bilayer aus Lipidmolekülen bildet, während bei geringem oder fehlendem Biotingehalt die Liposomen intakt an die modifizierte Quarzoberfläche binden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass grundsätzlich mit zwei Phänomenen bei der Wechselwirkung von Liposomen mit Oberflächen gerechnet werden kann: Einerseits mit der Bindung von intakten, sphärischen Vesikeln, andererseits mit der Aufspreitung der Liposomen zu Lipiddoppelschichten. Dabei kann anhand von QCM-Messungen das Verhalten der Liposomen abgeschätzt werden. Insbesondere die Erfassung der Dämpfungsänderung erweist sich als sehr hilfreich, da beide Adsorptionsformen gerade in diesem Messwert stark differieren.

2.6. Beschichtung der Quarzelektroden

Die Quarzmikrowaage stellt einen sehr empfindlichen Massesensor dar. Jede auf die Quarzelektrodenoberfläche aufgebrauchte Masse ändert die Schwingungseigenschaften. Daher ist es zur Detektion von spezifischen Wechselwirkungen unbedingt notwendig, die Elektroden des Quarzes mit einer spezifischen Beschichtung zu versehen.

2.6.1. Unspezifische Adsorption, Physisorption

Eine einfache Methode stellt die unspezifische Adsorption von Molekülen auf der Elektrodenoberfläche dar. Dabei werden die Moleküle, meist Proteine, aus einer wässrigen Lösung auf die Elektroden aufgebracht. Dies kann mit einer einfachen Dip-Technik erfolgen. Es gibt zahlreiche Literaturangaben, bei der so erfolgreich und funktional Proteine, wie zum Beispiel (Strept)Avidin [139], Protein A [47, 140], Antikörper [141], Virusprotein [142] und biotinyliertes Rinderserumalbumin [57] auf Quarzsensoren immobilisiert wurden. Su et al. gelang die Immobilisierung von einzelsträngiger DNA (~4000 Basen) auf Palladium beschichteten Elektroden [143]. Auch das Aufbringen von Polymeren kann durch reine Physisorption erfolgen, wie für Polyethylenimin gezeigt wurde [144]. Auch das Spin-Coaten

ist für Polymere beschrieben worden. Dabei eignet sich vor allem Polystyren als Polymer. An eine so geschaffene neue Oberfläche kann wiederum durch unspezifische Adhäsion analog zu well-plates, wie sie in ELISA-Tests benutzt werden, ein Bindungspartner immobilisiert werden. Dieses Verfahren konnte für die Immobilisierung von bakterieller DNA genutzt werden [145]. Voraussetzung für das Gelingen einer unspezifischen Adsorption ist eine ausreichende Größe der zu immobilisierenden Moleküle, damit genügend unspezifische Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Oberfläche und den Molekülen stattfinden können. Dabei spielen hauptsächlich schwache van-der-Waals-Kräfte eine Rolle.

2.6.2. Spezifische Adsorption, Chemisorption und Self-Assembling

Eine weitere Methode stellt die Adsorption von Molekülen unter der Verwendung der starken Schwefel-Gold-Affinität dar. Bei der Adsorption von SH- und Disulfid (S-S)-Gruppen an eine Goldoberfläche bilden sich Gold-Mercaptid-Bindungen (Au-S-R) aus [146]. Es wird aber auch von der Bildung von Disulfiden berichtet [147, 148], die wahrscheinlich auf das Tempern der Schichten bei Temperaturen um 375 K zurückzuführen sind. Die Stärke der Au-S-Bindung reicht an eine kovalente Bindung heran ($\sim 40 \text{ kJ/mol}^{-1}$) [149]. Im Self-Assembling-Verfahren können Thiolverbindungen auf Goldsubstraten immobilisiert werden. Sehr gut untersucht ist die Adsorption von Alkanthiolen. Diese bilden aus verdünnten organischen Lösungen hochgeordnete Monoschichten. Dabei wird eine vorhandene RS-H oder RS-SR-Bindung unter Bildung eines Thiolates (RS^-) gespalten. Dieses Thiolat adsorbiert an der hochgeordneten Goldoberfläche, indem es zwischen drei Goldatomen bindet und eine hexagonale Symmetrie aufweist. Der Abstand der Goldatome im Metallgitter beträgt $2,88 \text{ \AA}$. Der Abstand zwischen zwei Schwefelatomen beträgt $4,97 \text{ \AA}$ [150]. Die Alkylketten sind um $25\text{-}39^\circ$ zur Oberflächennormalen geneigt angeordnet [151, 152] (Abbildung 3).

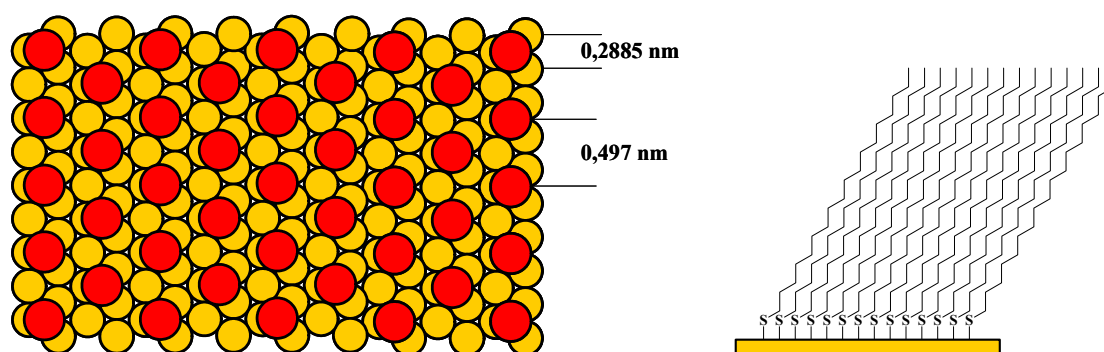


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anordnung der Schwefelatome auf der Goldoberfläche (links) und der Neigung der Alkylketten in Thiol-Self-Assemblier-Schichten auf Goldoberflächen (rechts)

Diese Neigung ergibt sich aus dem geringeren Platzbedarf einer Alkylkette in ihrer dichtesten Packung (all-trans) von nur $\sim 4,6$ Å. Die Ausbildung dieser Monoschicht erfolgt mit einer Zwei-Phasen-Kinetik. In einem ersten schnellen Schritt, der eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zeigt, werden ca. 80 – 90 % der Monolayer auf der Goldoberfläche gebildet. Diese Schicht ist jedoch nicht sehr geordnet, es schließt sich in einem zweiten Schritt, der über mehrere Stunden verläuft, eine Ordnung der Alkylketten an, der schließlich zu einer nahezu komplett ausgebildeten Monoschicht führt [153]. Diese Art der Monolayerbildung ist nicht auf Alkanthiole beschränkt. Es können unterschiedliche ω -funktionalisierte Alkylthiole eingesetzt werden, die ebenso hochgeordnete Monoschichten auf Goldsubstraten bilden. So wurden Schichten mit Alkoholgruppen ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$), Säurefunktionen ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$) [153] und Aminogruppen ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2$) hergestellt und charakterisiert. Ebenso können aromatische und heteroaromatische Thiole mit Aminogruppen [144] im Self-Assembling-Verfahren auf Goldoberflächen aufgebracht werden. Damit steht eine sehr einfache und reproduzierbare Methode zur Beschichtung von Gold mit Schichten unterschiedlicher chemischer Eigenschaften zur Verfügung. Ausgehend von diesen Self-Assembling-Schichten können weitere Modifizierungen der Sensoroberfläche vorgenommen werden. Es gelang aber auch die direkte Immobilisierung von DNA-Einzelsträngen durch die gezielte Einführung einer Thiolgruppe [154].

Ebenfalls in einem Self-Assembling-Verfahren können Thioalkane auf eine Silber- oder Kupferoberfläche immobilisiert werden. Dabei bilden sich ebenfalls hochgeordnete Monoschichten, bei denen die Alkylketten jedoch nur um $\sim 12^\circ$ gewinkelt sind. Es kann auch von praktisch senkrecht stehenden Alkylketten ausgegangen werden [150]. Es zeigte sich, dass die Präparation der Monoschichten wesentlich empfindlicher auf die Herstellungsbedingungen reagiert als im Falle einer Goldoberfläche. Zusätzlich beeinflusst eine vorhandene Oxidschicht, die sich leicht bei Kupfer und in geringerem Maße auch bei

Silber bildet, den Adsorptionsprozess. Es bilden sich ebenfalls Metall-Thiolat-Bindungen (Me-SR), im Falle von Silber kann nach der Adsorption langkettiger (>8 CH₂-Gruppen) Thioalkane keine Oxidschicht festgestellt werden. Dies deutet auf die Auflösung der Oxidschicht hin. Ebenso wird dieser Befund durch die Tatsache gestützt, dass mit kurzkettigen (<3 CH₂-Gruppen) Thioalkanen eine „Auflösung“ des Metalls beobachtet wurde. Dies kann durch eine Oxidation, vor der die kurzen Ketten die Oberfläche nicht schützen, und anschließende Umwandlung der Oxidschicht in gelöste Me-SR Moleküle erklärt werden. Um definierte Monoschichten auf Ag und Cu zu erhalten, ist daher eine übermäßige Oxidation der Oberfläche zu vermeiden.

Die Immobilisierung von geladenen Molekülen gelingt auch durch elektrostatische Wechselwirkung. In einem ersten Schritt wird meist die Beschichtung der Goldelektrode mit einem geladenen Thiol oder Polymer durchgeführt, die zu einer starken Ladung der Oberfläche führt. An diese Oberfläche können dann entgegengesetzt geladene Moleküle fixiert werden. Dazu werden häufig Polyelektrolyte benutzt, die eine sehr hohe Ladungsdichte und ein relativ hohes Molekulargewicht besitzen. Multischichten aus Poly-L-Lysin und Polyglutaminsäure wurden hergestellt [33]. Die Immobilisierung von einer Avidin-Monoschicht gelang so an einer Thiopropionsäureschicht [155] oder als äußerste Schicht einer Multilayer aus Polyelektrolyten (Polystyrensulfat/Polyallylaminhydrochlorid) [156]. Auch der Aufbau von Multilayern aus DNA-Oligomeren und Polyallylaminhydrochlorid [157] wurde beschrieben.

2.6.3. Gemischte Immobilisierungsstrategien

Eine direkte kovalente Bindung von Molekülen an eine Goldoberfläche ist aufgrund der hohen chemischen Resistenz von Gold nur schwer möglich. Durch die vorherige Behandlung der Goldoberfläche mit stark oxidierenden Mitteln kann eine Goldoxidschicht erzeugt werden, die einer chemischen Kopplung zugänglich ist. Yamaguchi et al. beschreiben, dass sich ein Silan mit so geschaffenen Sauerstofffunktionen umsetzen lässt [158].

Die kovalente Fixierung von Molekülen auf der Sensoroberfläche lässt sich im Falle von Goldelektroden nur schwer erreichen. Aber durch Kombination einer vorgelagerten unspezifischen Adsorption eines reaktiven Polymers oder der gezielten Chemisorption einer kopplungsfähigen Schicht in einem Self-Assembling-Verfahren kann eine kovalente Fixierung von Molekülen erreicht werden. Bei der unspezifischen Adsorption eines reaktiven Polymers wird zumeist auf Polyethylenimin zurückgegriffen. Es bildet einen dünnen Film auf der Goldelektrode und die vorhandenen Aminogruppen können leicht mit so genannten Crosslinkern wie zum Beispiel Succinanhydrid oder Glutardialdehyd reagieren. Dabei handelt

es sich um bivalente Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, mit zwei Molekülen gleichzeitig oder zumindest sehr zeitnah unter Vernetzung zu reagieren. So kann man beispielsweise Proteine über freie Aminogruppen des Lysins oder des N-Terminus binden. Ebenso kann eine SH-Gruppe des Cysteins mit Aldehyden oder Anhydriden reagieren und eine kovalente Bindung ausbilden.

Ebenfalls über freie Aminogruppen können Proteine an Säurefunktionen gekoppelt werden, wenn diese entsprechend aktiviert werden. Dazu wird häufig das wasserlösliche Carbodiimid EDC verwendet. Eine Säurefunktion lässt sich leicht auf der Goldoberfläche durch Self-Assembling einer Thiocarbonsäure einführen. Dabei kommen kurzkettige Thiocarbonsäuren wie 3-Thiopropionsäure oder das Disulfid 3,3'-Dithiobispropionsäure und langkettige Thiocarbonsäuren wie zum Beispiel 16-Mercaptohexadecansäure zum Einsatz. Eine sehr einfache Methode nutzt das Self-Assembling der bereits aktivierten N-Hydroxysulfosuccinimid-3-thiopropionsäure und die anschließende Kopplung von Proteinen in wässriger Lösung. Durch Impedanzmessungen an Goldelektroden konnte jedoch gezeigt werden, dass Monoschichten aus kurzkettigen Thiocarbonsäuren in wässrigen Medien nicht sehr stabil sind und bis zu einer Kettenlänge von elf CH₂-Gruppen (1-Mercaptoundecansäure) Fehlstellen aufweisen, die zu einer Signaldrift führen [159]. Thioalkane lassen sich auch durch elektrochemische Reduktion von Bunte-Salzen in situ an einer Goldoberfläche herstellen und binden [160].

Hochgeordnete (Mono-)Schichten von Amphiphilen lassen sich durch die Langmuir-Blodgett-Technik herstellen und auf Substrate übertragen [161]. Diese Methode kann zur Beschichtung des Quarzsensors mit Lipidschichten, so genannten support-fixierten Membranen, benutzt werden. Mit Hilfe der LB-Technik konnten so Filme aus DSPC und Mannosederivaten [136], Biotinhaltige Lipidschichten [162] und Antikörper [99] auf Quarzsensoren übertragen werden. Die Beschichtung eines QCM-Sensors mit Ankerlipiden in einer Phospholipidmonolayer für eine nachfolgende orientierte Immobilisierung von Antikörpern wurde von Vikolm und Albers beschrieben [163]. Höök et al. entwickelten eine Methode zur Beschichtung des Sensors mit einer Lipiddoppelschicht durch Liposomenfusion auf einer SiO₂-Schicht [164]. Es konnte in mehreren Experimenten gezeigt werden, dass sich in solche Lipidmembranen Liganden wie Biotin [165] oder Membranproteine [135] einbauen lassen.

Eine universelle Funktionalisierung des Quarzsensors lässt sich gut mit einer Biotin-(Strept-)Avidin Bindung erreichen. Hierbei wird zunächst (Strept-)Avidin durch Physisorption oder kovalente Bindung an eine Self-Assembling-Schicht gebunden. Hierfür stehen gut etablierte Immobilisierungsprotokolle zur Verfügung, das (Strept-)Avidin System

ist zudem äußerst robust. In einem nachgeschalteten Schritt kann dann eine Vielzahl von Molekülen über eine Biotin-Markierung gebunden werden. Biotinylierungen sind für nahezu alle Biomoleküle beschrieben und erhältlich. Beispielhaft sollen hier nur DNA-Oligomere und Antikörper [166] genannt werden.

2.6.4. Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion

Für eine erfolgreiche Detektion von Bindungsereignissen ist es nicht allein ausreichend, dass eine Immobilisierung eines Bindungspartners stattfindet. Vielmehr besteht die größere Schwierigkeit darin, die nicht belegte Sensorfläche so zu passivieren, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen Sensor und Analyt weitgehend zurückgedrängt werden. Bei einem intensiven Studium der Literatur stellt man fest, dass diesem Problem trotz seiner Signifikanz eine geringe Beachtung geschenkt wurde. Ein sehr allgemeines und häufig angewendetes Mittel zur Passivierung der nicht belegten Sensoroberfläche ist die Inkubation des Sensors nach abgeschlossener Kopplung mit einem Überschuss an inertem Protein. Dazu kommen zumeist Rinderserumalbumin (BSA) und Casein zum Einsatz. Diese Art der Passivierung ist auch aus vielen anderen Messmethoden wie zum Beispiel dem ELISA bekannt. Eine genauere Untersuchung des Passivierungsmechanismus wurde von Sweryda-Krawiec et al. durchgeführt [167]. Sie stellten fest, dass BSA eine hohe Tendenz zur Adsorption an sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Oberflächen hat, wobei es jedoch Unterschiede in der Art der Adsorption gibt. BSA zeigt nach der Adsorption eine sehr ähnliche, nahezu identische Oberflächeneigenschaft, unabhängig vom Untergrund auf dem es adsorbiert wurde. Eine weitere Methode zur Passivierung der Oberfläche ist eine starke Hydrophilisierung, die zur Ausbildung einer großen Hydratschicht führt und so unspezifische Wechselwirkungen, die meist hydrophober Natur sind, zurückzudrängen vermag. Zum Einsatz kommen hier hauptsächlich Dextran- und Polyethylenglykol-Derivate. Die Verwendung von Dextranderivaten wird seit vielen Jahren in den SPR-Sensoren erfolgreich eingesetzt. Diese Sensoren bestehen aus einer Glasscheibe, die ebenfalls mit einer dünnen Metall(Gold-)Schicht bedampft ist. Trotz des erfolgreichen Einsatzes in der SPR-Technik gibt es nur wenige Literaturstellen zur Anwendung in der QCM-Technik [168]. Einen Grund dafür dürfte der Patentschutz in Bezug auf eine Vielzahl von Dextranderivaten und Methoden zur Herstellung solcher Dextranschichten sein. Deshalb findet man auch eine Reihe von Versuchen, andere hydrophile Derivate ausgehend von Polyethylenglykol (PEG) als Passivierungsagenzien anzuwenden. Eine Methode zur Immobilisierung von PEG-Ketten stellt die Einführung einer SH-Gruppe dar. Mit solchen PEG-Derivaten kann die Goldelektrode des Quarzsensors in einem einfachen Self-Assembling-Verfahren beschichtet

werden. Es konnte gezeigt werden, dass gemischte Self-Assembling-Schichten aus Alkanthiolen und SH-PEG-Derivaten die unspezifische Adsorption von Proteinen verhindern können [169, 170]. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden PEG-Derivate synthetisiert, die eine Ankopplung von DNA-Oligomeren ermöglichen [171].

Auch die Verwendung des kurzkettigen hydrophilen 6-Mercaptohexan-1-ol in gemischten Self-Assembling-Schichten mit SH-DNA zeigte eine gute Unterdrückung der unspezifischen Adsorption von DNA-Oligomeren [172]. Ebenso konnte durch einen Multilayeraufbau von Poly-L-Lysin und Polyglutaminsäure gezeigt werden, dass auch die Ladung eine Rolle bei der Passivierung der Oberfläche spielt [33]. In dieser Studie zeigte eine abschließende Schicht Polyglutaminsäure keine unspezifische Adsorption von Serumproteinen, während an einer terminalen Poly-L-Lysin-Schicht eine starke Bindung von Serumproteinen zu verzeichnen war. Nach erfolgter Adsorption der Serumproteine auf der positiv geladenen Oberfläche wurde ein negatives Potential der Oberfläche gemessen, d.h. durch die Adsorption wurde die Ladung an der Oberfläche umgekehrt.

Eine weitere Methode zur Unterdrückung von unspezifischen Wechselwirkungen durch noch freie aktivierte Bindungsstellen in Self-Assembling-Schichten ist die Reaktion mit einem Überschuss an reaktivem Amin, z.B. Ethylamin oder Aminoethanol [173].

3. Zielstellung

Anhand der vorangegangenen Kapitel wurde die mannigfaltige und universelle Einsetzbarkeit der Quarzmikrowaage in den Biowissenschaften gezeigt. Dabei wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Anwendungsbeispielen entwickelt. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag geleistet werden, den Einsatz der Quarzmikrowaagentechnik auf dem Feld der Biosensorik zu erweitern und für die Untersuchung weiterer Bindungsereignisse vorzubereiten.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit ist eine Weiterentwicklung und Optimierung der experimentellen Basis der Quarzmikrowaagentechnik für biosensorische Anwendungen vor Allem auf folgenden Versuchsfeldern vorgesehen:

1. spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen
2. rezeptorvermittelte Zelladhäsion an Oberflächen und
3. Adhäsionsprozesse liposomaler Systeme bzw. anderer supramolekular präsentierter Bindungsstrukturen

Im Mittelpunkt der Arbeit steht dabei die Entwicklung von Verfahren zur reproduzierbaren Modifizierung der Goldelektroden, die es erst ermöglicht, spezifische Bindungsereignisse zu detektieren und näher zu untersuchen. Dabei wird ausdrücklich Wert auf eine möglichst universelle Anwendbarkeit der zu entwickelnden Methoden gelegt.

Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Charakterisierung von molekularen Erkennungsprozessen, wie sie z.B. bei Ligand-Rezeptor-Bindungen verwirklicht werden. Die vorhandene Quarzmikrowaagentechnik soll weiterentwickelt werden, um solche Bindungsereignisse zu detektieren und näher zu analysieren. Dabei soll die zeitgenaue Verfolgung der Bindungsereignisse zur Bestimmung von kinetischen Parametern, wie zum Beispiel Bindungskonstanten, benutzt werden. Die Möglichkeiten und Grenzen der Quarzmikrowaagentechnik als Alternative zu optischen Bestimmungsmethoden, insbesondere der Surface-Plasmon-Resonance-Technik, sollen experimentell ermittelt werden.

In einem weiteren Schwerpunkt soll die Einsetzbarkeit der QCM-Technik zur Detektion zellulärer Haftungsabläufe an Oberflächen geprüft werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Quantifizierung rezeptorvermittelter Zelladhäsionsprozesse. Speziell wird eine detaillierte Untersuchung über die Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen durch die Rezeptorfamilie der Selektine durchgeführt. Das Ziel besteht in der Entwicklung eines

Testsystems zur schnellen und effizienten Quantifizierung von Selektin-vermittelten Zelladhäsionen im Hinblick auf ein mögliches Screening potentieller Selektin-Inhibitoren, die einen aussichtsreichen Ansatzpunkt in der Therapie von chronisch-entzündlichen Prozessen darstellen. Eine Grundvoraussetzung auf diesem Weg ist es, die Messsignale der Quarzmikrowaage im komplexen System lebender Zellen zu verstehen und zu interpretieren. Um dieses Verständnis zu vertiefen und weitere Einblicke in die QCM-Sensorantwort komplexer, supramolekularer Systeme zu gewinnen, sollen detaillierte Bindungsstudien mit liposomalen Systemen durchgeführt werden. Dabei können die gefundenen Ergebnisse zur Charakterisierung von liposomalen Bindungsereignissen herangezogen werden. Der Einsatz liposomaler Systeme dient auch der vereinfachenden Modellierung des komplexen Zellverhaltens.

4. Materialien und Methoden

4.1. Quarzmikrowaagensystem „LiquiLab21“

Das verwendete Quarzwaagensystem „LiquiLab21“ stammt vom Institut für Automation und Kommunikation (ifak) Magdeburg, Deutschland. Es besteht aus vier Messplätzen, die die Resonanzfrequenz von 10 MHz Schwingquarzen gleichzeitig in einer Zeitauflösung von einem Messwert pro Sekunde erfassen können. Gleichzeitig wird für jeden Messplatz die Dämpfung ermittelt, die sich aus der Spannung ergibt, die benötigt wird, den Quarz mit konstanter Amplitude schwingen zu lassen. Je höher die Dämpfung der Quarzschwingung ist, desto mehr Spannung wird zur Aufrechterhaltung einer konstanten Schwingung benötigt. Einzelheiten der elektrotechnischen Realisation der Quarzbeschaltung werden detailliert in der Arbeit von Borngreber behandelt [6]. Zur Stabilisierung der Umgebungstemperatur ist die gesamte Quarzmikrowaage in einem beheizbaren Behälter verbaut. Eine verbesserte Temperaturkontrolle konnte durch den Einbau zusätzlicher Kühlelemente erreicht werden, wie unter 5.3 beschrieben. Durch zwei 12-Walzenpumpen werden die Messflüssigkeiten in die Messzellen gepumpt. Verbindungen werden durch Teflonschläuche mit 0,2 mm Innendurchmesser realisiert.



Abbildung 4: Das komplette QCM-System „LiquiLab21“

4.2. Quarzsensoren

Bei den verwendeten Quarzsensoren handelt es sich um 10 MHz, AT-geschnittene Schwingquarze mit zwei unterschiedlichen Goldelektroden auf Ober- und Unterseite. Gold wird im Vakuum auf die Quarzscheiben aufgedampft. Die Schichtdicke beträgt etwa 1000 Å. Zur Haftungsverbesserung wird vorher eine Schicht Chrom (~200 Å) ebenfalls im Vakuum

aufgedampft. Die Schwingquarze haben einen Durchmesser von 14 mm, die obere Elektrode von 12 mm und die untere Elektrode von 6 mm. Die aktive Sensorfläche beträgt $0,28 \text{ cm}^2$. Um die elektrische Kontaktierung von nur einer Quarzseite her zu realisieren, wird die obere Elektrode mit einem auf der Unterseite aufgedampften Goldkontakt über eine Silberleitpaste verbunden.

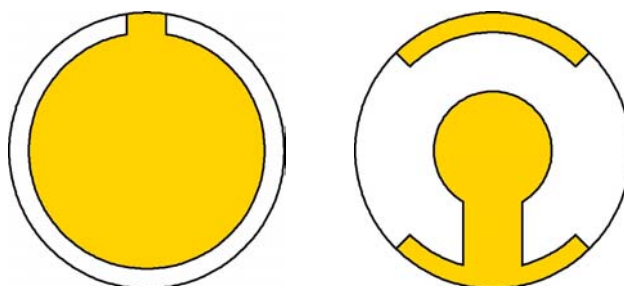


Abbildung 5: Skizze der verwendeten Quarzsensoren: Oberseite (links); Unterseite (rechts)

4.3. Reinigung der Quarzsensoren

Mechanische Reinigung der Quarzsensoren

Vor einer intensiven nasschemischen Reinigung wurden die Quarzelektroden mit Hilfe eines ethanol- oder wassergetränkten Wattestäbchens von grob anhaftenden Verschmutzungen befreit. Dabei darf kein zu großer Druck auf die Goldelektroden ausgeübt werden, da diese sonst verkratzen können.

Reinigung der Quarzsensoren durch Piranha-Lösung

Zur Reinigung der Quarzsensoren werden 1 Teil konzentrierter Wasserstoffperoxid (30%ig) und 3 Teile konzentrierte Schwefelsäure (98%ig) unter Kühlung in einem 250 ml Erlenmeyerkolben gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wird mit einem Tropfer die obere Elektrode des Quarzes mit dieser Piranha-Lösung bedeckt und bis zur Bildung von Gasbläschen auf der Goldoberfläche belassen (ca. 20 s bis 3 min). Anschließend wird mit destilliertem Wasser gespült und die Reinigung insgesamt dreimal durchgeführt. Abschließend wird mit Ethanol (96%ig) gespült und in einem Strom aus Stickstoff getrocknet.

Reinigung der Quarzsensoren mittels Gasentladungslampe

Alternativ können die Quarzsensoren durch eine UV/Ozon-Behandlung gesäubert werden. Dazu werden zuerst die Quarze mit destilliertem Wasser und Ethanol gründlich gespült und abschließend unter einem Strom aus Stickstoff getrocknet. Anschließend werden die Quarze mit der oberen Elektrode unter einer Xeradex-Gasentladungslampe (Osram, München, Deutschland) für fünf Minuten einer starken UV-Strahlung von 172 nm

Wellenlänge ausgesetzt. Die anschließende Weiterbehandlung des Quarzes sollte sehr schnell erfolgen.

Reinigung der Quarzsensoren durch Detergens-haltige Lösungen

Als Detergens wurden eine 0,5 %ige Triton-X-100-Lösung in PBS und kommerziell erhältliche 2 %ige HellmanexII-Lösung (Hellma GmbH, Mülheim, Deutschland) verwendet. Die Reinigung mit Triton erfolgte bei eingebauten Quarzen in den Durchflusszellen durch einfaches Spülen. Die Reinigung mit HellmanexII-Lösung erfolgte in einem 100ml Erlenmeyerkolben. Zur Verbesserung der Reinigungswirkung wird vom Hersteller eine zusätzliche Ultraschallbehandlung von 5-10 min empfohlen. Abschließend wird mit destilliertem Wasser gespült und unter einem Strom aus Stickstoff getrocknet.

4.4. Beschichtung der Quarze

4.4.1. Beschichtung der Quarzsensoren mit Thiolen durch Self-Assembling

Zur Beschichtung der Goldelektroden des Quarzsensors durch Self-Assembling mit Thiolen wurden 1 mM Lösungen des entsprechenden Thiols in Chloroform oder Ethanol hergestellt. Die zu beschichtenden und vorher gereinigten Quarze werden über Nacht in dicht schließenden Gefäßen in der Lösung des gewünschten Thiols eingelegt. Nach der Entnahme der Quarze wird mit Ethanol (96%ig) gespült und mit einem Strom aus Stickstoff getrocknet.

4.4.2. Kopplung von Proteinen und anderen Molekülen mit reaktiven Aminogruppen mit der Cyanurchlorid-Methode

Ein mit 6-Mercaptohexan-1-ol beschichteter Quarz wird 2 h in einer 1 %igen Lösung von Cyanurchlorid (ACROS Organics, Geel, Belgien) bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird kurz mit Ethanol (96%ig) gespült und unter einem Strom aus Stickstoff getrocknet. Auf die so aktivierte obere Goldelektrode wird die Protein- bzw. Aminogruppen-haltige Substanzlösung (0,1-10 mg/ml in 10mM Boratpuffer, pH 8,8) 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach abgeschlossener Beschichtung wird mit destilliertem Wasser gespült unter einem Strom aus Stickstoff getrocknet.

4.4.3. Kopplung von Proteinen und anderen Molekülen mit reaktiven Aminogruppen mit der 16-Mercaptohexadecansäure-Methode

Die obere Elektrode eines mit 16-Mercaptohexadecansäure beschichteten Quarzes wird mit einer 10%igen Lösung von EDC in destilliertem Wasser, dessen pH-Wert mit 0,1 N HCl auf pH 3,5 eingestellt wurde, für 10 min bei Raumtemperatur aktiviert. Anschließend wird kurz mit einem Strom aus Stickstoff getrocknet. Auf die so aktivierte obere Goldelektrode

wird die Protein- bzw. Aminogruppen-haltige Substanzlösung (10 – 0,1 mg/ml in 10mM Boratpuffer, pH 8,8) 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Abschließend wird mit destilliertem Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet.

4.4.4. Beschichtung des Quarzsensors durch die Langmuir-Blodgett-Technik

Die Lösung eines Amphiphils in Chloroform oder Chloroform/Methanol wird auf die Wasser-Luft-Grenzfläche eines Langmuir-Troges mittels Mikroliterspritze aufgebracht. Dabei richten sich die Moleküle mit ihrem lipophilen Teil zur Luft und dem hydrophilen Teil zur Wasserseite hin aus. Die benötigte Menge kann anhand des Platzbedarfes eines Moleküls vorher berechnet werden. Als Subphase dient destilliertes Wasser. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels nach etwa 15 min wird der Film bis zum gewünschten Lateraldruck mit einer Geschwindigkeit von 7 mm²/s komprimiert. Ein mit Oktadekanthiol beschichteter Quarz wird senkrecht durch den komprimierten Film an der Grenzfläche des Langmuir-Troges in die Subphase eingetaucht. Dabei wird das Amphiphil durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Oktadekanthiol-Schicht gebunden. Es entsteht eine support-fixierte Bilayer. Durch mehrfaches Durchschreiten der Grenzfläche können Multilayer erzeugt werden. Die Transfargeschwindigkeit beträgt 5 mm/min und wird über einen Filmlift geregelt. Bei der Handhabung der support-fixierten Bilayer ist darauf zu achten, dass kein Kontakt mit Luft erfolgt, da es sonst zu Fehlstellen in der Schicht kommt. Deshalb wurden Quarze mit übertragenen LB-Filmen immer unter Wasser in die Flusskammer eingebaut. Die Unterseite des Quarzes wird nach Schließen der Messzelle mit Stickstoff getrocknet.

4.5. Ellipsometrie

Zur Bestimmung von Schichtdicken wurde ein Ellipsometer SE 400 der Firma Sentech (Berlin, Deutschland) verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 632,8 nm (Ar-Laser) und einem Einfallswinkel von 60°. Eine Probe wurde in einem Gebiet von 4 x 4 mm vermessen und aus 16 Messpunkten (max. Auflösung eines Messpunktes 1 mm²) der Mittelwert gebildet.

4.6. Randwinkelmessungen

Randwinkel auf verschiedenen Oberflächen wurden mit einem Krüss G-23 Kontaktwinkel-Goniometer (Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland) ermittelt. Mit einer Pipette wurde 5 µl destilliertes Wasser auf das Präparat aufgetropft und sofort der Kontaktwinkel vermessen.

4.7. Zellen und Zellpräparation

E-CHO- Zellen

Für Selektin-Bindungsstudien wurden E-Selektin-exprimierende Chinesische Hamsterovarialzellen verwendet. Die Zellen wurden in MEM- α Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Penicillin/Streptomycin kultiviert. 5×10^4 Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5% CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert. Nach einer dreiminütigen Trypsinisierung mit 2 ml 0,25% Trypsin in EDTA wurden die Zellen in Zentrifugationsröhrchen überführt und dann für 3 min bei 430×g zentrifugiert und dreimal mit Puffer gewaschen.

U937- und KG1A-Zellen

Die Zellen wurden in HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium (c.c.pro GmbH, Neustadt/W, Deutschland), mit 10% inaktiviertem, fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 nM Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 30 µg/ml Refobacin® (Merck, Darmstadt, Deutschland), und 2,5 µg/ml Fungizone® (Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Vor einem Versuch wurde die entsprechende Zellzahl aus der Kulturflasche entnommen, abzentrifugiert, gewaschen und innerhalb von vier Stunden für die Experimente verwendet. Eine Fluoreszenzmarkierung kann durch Zusatz von Calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) zur Zellsuspension erfolgen.

Leukozyten

Leukozyten wurden aus humanem Blut isoliert und sofort für die Experimente verwendet. Frischblut (12,5 ml) wird mit Natriumcitratlösung (2,5 ml 3,8%ig in Wasser) versetzt, 5 min im Eisbad gekühlt und 10 min bei 300×g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml isotonomischer NaCl-Lösung und 30 ml Lysispuffer (8,3 g NH₄Cl, 0,84 g NaHCO₃, 37,2 mg EDTA auf 1l Wasser) dreimal für 5 min auf Eis inkubiert und mit isotonomischer NaCl-Lösung gewaschen.

4.8. Liposomen

Die Liposomenpräparation erfolgte durch die Filmhydratationsmethode. Dabei werden alle Lipide in Chloroform gelöst in einen Rundkolben einpipettiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum bei 30 – 50 °C abgezogen. Es entsteht ein an der Kolbenwand haftender Lipidfilm, der anschließend durch Schütteln mit Puffer und Glaskugeln ca. 16 h hydratisiert wird. Dabei bilden sich spontan multilamellare Vesikel, die durch einen Membranfilter (Porengröße 100 nm, Nucleopore, Deutschland) 6- bis 10-mal extrudiert werden (Extruder

Lipex, Vancouver, Kanada). Die so gewonnen Liposomen hatten einen Durchmesser von etwa 90 nm und sind unilamellar. Die Größenbestimmung erfolgte mit Photonenkorrelation (Autosizer 2c, Malvern Instruments,).

4.9. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Mercapto-PEG-10000 mit Methoxy- und Hydroxy-Endgruppe wurden von Rapp Polymere (Tübingen, Deutschland) bezogen.

Lipide

Dioleyolphosphatidylethanolamin (DOPE), Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Biotin-PE (N-Biotinyl-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin), PEG-PE (N-Methoxy(Polyethylenglykol)-2000-Distearoylphosphatidylethanolamin) und Biotinyl-PEG-PE (N-[Biotinyl(Polyethylenglykol)-2000]-Distearoylphosphatidylethanolamine) wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) erworben. SPC (Sojaphosphatidylcholin) und EPS (Ei-Phosphatidylserin) wurden freundlicherweise von Lipoid (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. sLe^x-Lipid (GG126, [17-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid) wurde von Christian Gege synthetisiert und zur Testung überlassen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Reinigung der Quarzsensoren

Zur Reinigung der Quarzsensoren wurden verschiedene Methoden herangezogen, wobei der Reinigungseffekt durch Ellipsometrie, Randwinkelmessungen und Resonanzfrequenzerfassung der Quarze kontrolliert wurde. Die Ausgangswerte wurden mit sauberen, fabrikneuen Goldelektroden vermessen. Dabei stellen die optischen Werte des Quarzes (Brechungsindex n_s und Absorptionskoeffizient k_s) sowie die Grundfrequenz individuelle Größen der Quarze dar, während der Randwinkel für eine reine Goldoberfläche $55 \pm 5^\circ$ ($n=8$) betrug. Nach der Ermittlung der Anfangsparameter wurde eine Self-Assembling-Schicht von Oktadekanthiol auf die Quarze aufgebracht. Die Schichtdicke wurde ellipsometrisch zu $1,79 \pm 0,87$ nm ($n=7$) bestimmt. Der Randwinkel lag bei $102 \pm 2^\circ$ ($n=4$). In der Literatur werden Werte von 2,0 nm und $110 \pm 3^\circ$ angegeben [153]. Die Resonanzfrequenz sinkt durch die Masse der Oktadekanthiol-Schicht um 80 ± 7 Hz [174], was auch in eigenen Untersuchungen bestätigt wurde (77 ± 14 Hz, $n=3$).

Die einfachste Möglichkeit zur Reinigung der Goldelektroden besteht im Spülen des Quarzes mit Detergens-haltigen Lösungen. Nach Behandlung mit einer 0,5%igen Tritonlösung konnte aber nur eine leichte Abnahme des Randwinkels auf $98 \pm 2^\circ$ ($n=2$) festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Self-Assembling-Schicht des Oktanthiols allein durch die Detergens-Behandlung nicht von der Goldelektrode abgelöst werden kann. Die zusätzliche Anwendung von Ultraschall zur Verstärkung der Reinigungswirkung konnte nicht genutzt werden, da bei der Ultraschallbehandlung die Kontaktierung der oberen Goldelektrode des Quarzes beschädigt wird und so der Anschluss von der Unterseite nicht mehr möglich war.

Die Detergens-Behandlung beeinträchtigt zwar Frequenz (Erniedrigung) und Dämpfung (Erhöhung) des Schwingquarzes, dieser Effekt ist aber vollkommen reversibel und wahrscheinlich auf die Änderung der Viskosität und/oder der Dichte des Puffers durch den Tritonzusatz zurückzuführen. Somit konnte, wie auch aus Abbildung 6 ersichtlich ist, kein detergensbedingter Reinigungseffekt (Massenabnahme) für Oktadekanthiol-Self-Assembling-Schichten festgestellt werden.

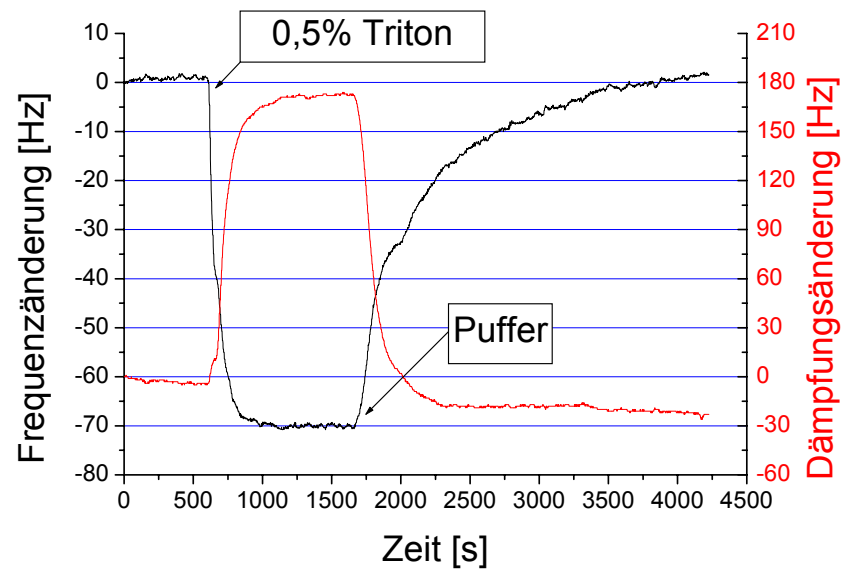


Abbildung 6: Frequenz- und Dämpfungsverlauf beim Spülen einer Oktadecanthiol-Self-Assembling-Schicht mit 0,5 %iger Triton-Lösung in PBS

Auch andere Thiol-Self-Assembling-Schichten konnten durch Detergenwaschung nicht desorbiert werden.

Dagegen reicht die Reinigungswirkung einer 0,5 %igen Triton-Lösung aus, um unspezifisch an unterschiedlichen Oberflächen adsorbierte Liposomen abzuwaschen, wie in Abbildung 7 am Beispiel unterschiedlich großer SPC-Liposomen auf einer 16-Mercaptohexadekansäure-Schicht gezeigt wird.

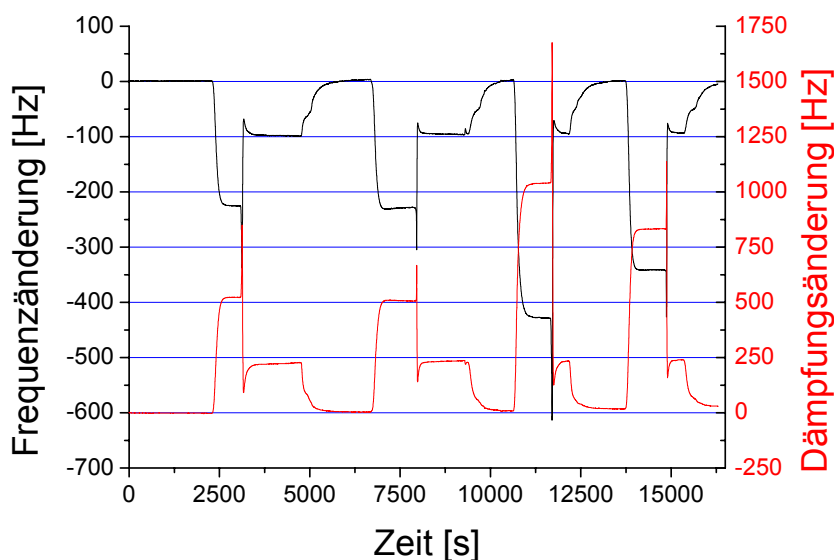


Abbildung 7: Frequenz- und Dämpfungsverlauf der Adhäsion von SPC-Liposomen unterschiedlichen Durchmessers auf einer 16-Mercaptohexadecansäureschicht und anschließendem Spülen mit 0,5 %iger Triton-Lösung.

Eine drastischere Regenerierung beschichteter Quarzsensoren erhofften wir uns von einer Inkubation mit Piranha-Lösung oder einer UV/Ozon-Behandlung. Dabei konnte mit beiden Verfahren die Thiolschicht komplett entfernt werden. Es wurden ellipsometrische Schichtdicken bzw. n_s und k_s Werte wie vor der Beschichtung gefunden. Auch die Randwinkel gingen nach einer Piranha-Behandlung wieder auf ihre Ausgangswerte zurück. Durch die OV/Ozon-Behandlung wird dagegen ein niedrigerer Randwinkel von $12 \pm 4^\circ$ ($n=8$) erreicht. Dies kann durch die Bildung einer Au_2O_3 -Schicht und der damit verbundenen starken Erhöhung der Hydrophilie erklärt werden [175]. Der Randwinkel nähert sich allerdings nach dem Stehen lassen der Quarze an Luft innerhalb von 48 h asymptotisch dem Ausgangswert von 55° an.

Ein Vergleich zeigte für beide Reinigungsverfahren, dass eine mehrmalige Neubeschichtung der Quarze möglich ist und zu den gleichen Self-Assembling-Schichten führt. Auch konnten wir zeigen, dass die Au_2O_3 -Basisschicht nach der UV/Ozon-Behandlung keine störenden Einflüsse hat, da sich die bekannten Randwinkel und Schichtdicken reproduzieren ließen. Allerdings scheint die UV/Ozon-Reinigung schonender für die Quarzoberflächen zu sein. Durch Piranha-Lösung wird die Goldschicht langsam abgelöst, so dass sich daraus eine begrenzte Regenerationsfähigkeit der Quarze von etwa 10 - 20 Reinigungszyklen ergibt. Die Lebensdauer konnte durch ein werksseitiges Tempern der Goldschicht bei $120^\circ C$ für 24 h etwas auf ca. 30 Zyklen verlängert werden. Bei der OV/Ozon-Reinigung konnten wir bisher keine Goldabtragung beobachten.

Ergebnis

Die besten Ergebnisse wurden mit der UV/Ozonbehandlung erreicht. Sie liefert hervorragende Reinigungsergebnisse und erlaubt die nahezu unbegrenzte Wiederverwendbarkeit der Quarzsensoren.

5.2. Beschichtung der Quarzsensoren

5.2.1. Self-Assembling-Schichten

Zur Beschichtung des Quarzsensors wurden mehrere Methoden herangezogen. Als sehr einfache und reproduzierbare Methode zur Beschichtung von Goldelektroden wird das Self-Assembling von Thioalkanen beschrieben. Zur Kontrolle der verwendeten Self-Assembling-Schichten kamen Randwinkelmessungen und ellipsometrische Schichtdickenbestimmung zum Einsatz. Tabelle 6 zeigt die gefundenen Ergebnisse für die verwendeten Substanzen.

Substanz	Randwinkel	Schichtdicke
Oktadecanthiol	$102 \pm 2^\circ$	$1,79 \pm 0,87$ nm
16-Mercaptohexadecansäure	$55 \pm 2^\circ$	$2,51 \pm 0,80$ nm
6-Mercaptohexan-1-ol	$44 \pm 2^\circ$	$0,30 \pm 0,20$ nm
Perfluorhexanthiol	$95 \pm 8^\circ$	$2,44 \pm 0,93$ nm

Tabelle 6: Randwinkel und ellipsometrische Schichtdicken verschiedener Self-Assembling-Schichten auf den Quarzsensoren

Mit den verwendeten Substanzen kann eine vielfältige Modifizierung des Quarzsensors erfolgen. Die Oktadecanthiol-Schicht führt zu hydrophoben Oberflächen, auf die leicht in einem weiteren Arbeitsschritt an einer Wasser-Luft-Grenzfläche vororganisierte Lipidschichten durch die Langmuir-Blodgett-Technik übertragen werden können.

Die Beschichtung mit 16-Mercaptohexadecansäure liefert dagegen eine relativ hydrophile Oberfläche von Carboxylgruppen, an die nach Aktivierung mit EDC leicht Aminogruppen gekoppelt werden können. Die Hydroxylgruppen der 6-Mercaptohexan-1-ol-Schicht lassen sich mit Cyanurchlorid umsetzen, so dass in einem Folgeschritt weitere Moleküle fixiert werden können.

Die gefundenen Randwinkel und Schichtdicken stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein [153].

5.2.2. Kovalente Fixierung von Proteinen

Zur Immobilisierung von Substanzen mit reaktiven Aminogruppen wurden zwei Methoden verwendet. In einer ersten Prozedur wird in einem Self-Assembling-Schritt 6-Mercaptohexan-1-ol auf dem Quarz immobilisiert. In einem zweiten Schritt wird der bivalente Crosslinker Cyanurchlorid (Trichlortriazin) an die so eingeführten Hydroxygruppen gebunden. Es entsteht eine aktivierte Oberfläche, an der nun Substanzen mit reaktiven Aminogruppen in wässriger Lösung bei leicht basischem pH-Wert binden können. Der Ablauf der Beschichtung ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

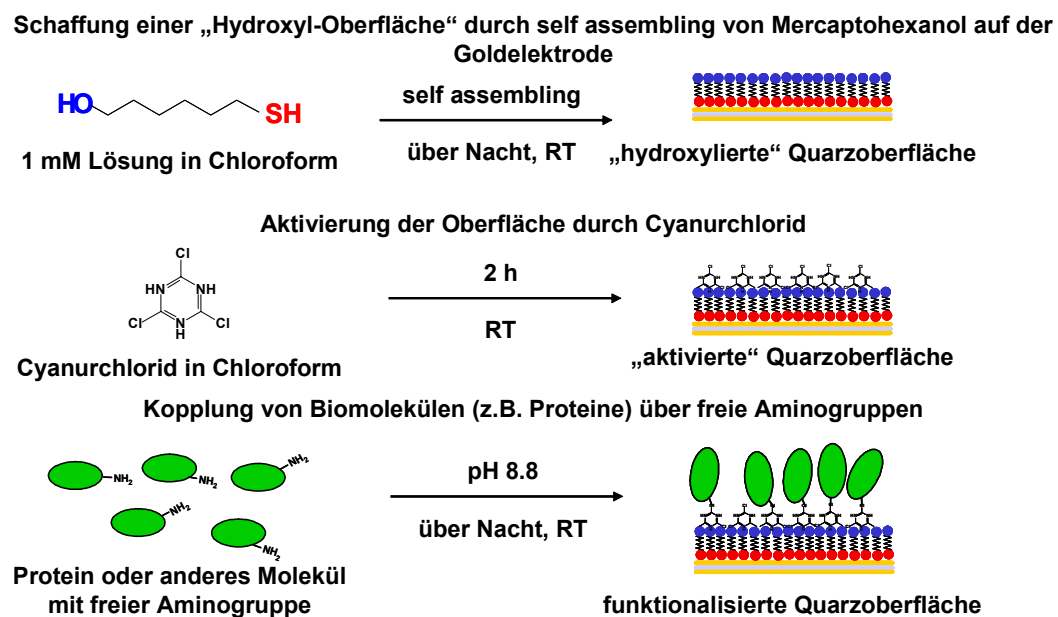


Abbildung 8: Schema der Cyanurchlorid-Methode zur Beschichtung des Quarzsensors mit Proteinen bzw. Substanzen mit reaktiven Aminogruppen

Als Modellsystem zur Kontrolle der Immobilisierungstechnik wurde Avidin gewählt. Avidin ist ein basisches Protein aus Hühnereiweiß mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. Es stellt ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten dar und besitzt eine sehr hohe Affinität zu Biotin. Die Avidin-Biotin-Bindung ist die stärkste bekannte Protein-Ligand-Bindung mit einer Bindungskonstante von 10^{15} M^{-1} [176]. Die erfolgreiche Immobilisierung von Avidin sollte durch die Bindung von Biotin an das oberflächenfixierte Avidin mit der QCM-Technik nachgewiesen werden. Wurde das Experiment mit gelöstem Biotin durchgeführt, konnte keine Frequenzabnahme bei der Bindung festgestellt werden. Die nach der Sauerbrey-Gleichung berechnete theoretische Frequenzabnahme für die Biotinbindung an Avidin beträgt nur 0,003 Hz (60 nm² Fläche und zwei freie Bindungsstellen pro Avidinmolekül). Die geringe Frequenzabnahme liegt unterhalb der Nachweisgrenze, da die

Frequenz nur zu 0,3 Hz genau bestimmt werden kann und typischerweise ein Schwanken der Frequenz von ± 1 Hz in Flüssigkeiten vorliegt. Daher wurde versucht, die „Masse“ des Biotins durch Kopplung an ein Makromolekül zu erhöhen. Dazu wurde eine kovalente Kopplung an BSA durchgeführt. Das Biotinyl-BSA zeigte eine Frequenzabnahme von 140 Hz. Dieser Wert ist sehr hoch und wir erklären ihn mit einer unspezifischen Adsorption von Biotinyl-BSA auf einer 6-Mercaptohexan-1-ol/Cyanurchlorid-Schicht. Natives BSA wird ebenfalls unspezifisch adsorbiert, was zu einer Frequenzabnahme in Höhe von 210 Hz führt. Die unspezifische Adsorption ist zum Teil auf die hohe verwendete Proteinkonzentration von 5 mg/ml zurückzuführen. Die geschilderten Probleme machen eine Interpretation im Sinne einer erfolgreichen Avidinimmobilisierung auf der Goldelektrode unmöglich. Daher wurde versucht, die „Masse“ des Biotins durch Einbau in Liposomen zu vergrößern. Die Verwendung von Liposomen als Signalverstärker wurde für einige QCM-Anwendungen beschrieben. Die Bindung von SPC-Liposomen mit 5 mol% Biotin konnte mit einer Frequenzabnahme von 76 Hz gemessen werden, während an einer BSA-Schicht keine Frequenzänderung hervorgerufen wurde. Ebenso verursachen SPC-Liposomen ohne Biotin keine Frequenzänderung an Avidin-beschichteten Quarzen. Die Adhäsion kann also nur durch die spezifische Avidin-Biotin-Wechselwirkung erreicht worden sein. Es kann also von einer erfolgreichen Immobilisierung des Avidins an die Quarzelektrode ausgegangen werden, wobei die Bindungsfähigkeit des Avidins erhalten bleibt.

Durch AFM-Aufnahmen konnte das immobilisierte Avidin ebenfalls nachgewiesen werden. Ein Vorteil der Cyanurchlorid-Methode ist die leichte Übertragbarkeit der Kopplungschemie auf andere Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, welches bereits über freie OH-Gruppen verfügt, an die das Cyanurchlorid direkt bindet.

Als zweite Methode kam die kovalente Bindung von Proteinen an eine 16-Mercaptohexadecansäure-Schicht über eine EDC-Aktivierung zum Einsatz. Die Verwendung von 16-Mercaptohexadecansäure zur Einführung einer Säurefunktion auf eine Goldelektrode wird von Riepl et al. für den Einsatz in wässrigen Medien empfohlen um Langzeit-stabile Schichten zu erhalten [159]. Die erfolgreiche Immobilisierung konnte analog zur Cyanurchlorid-Methode mit Avidin und Biotin-SPC-Liposomen gezeigt werden. Auch hier konnte das fixierte Avidin mit der AFM-Technik dargestellt werden (Abbildung 9).

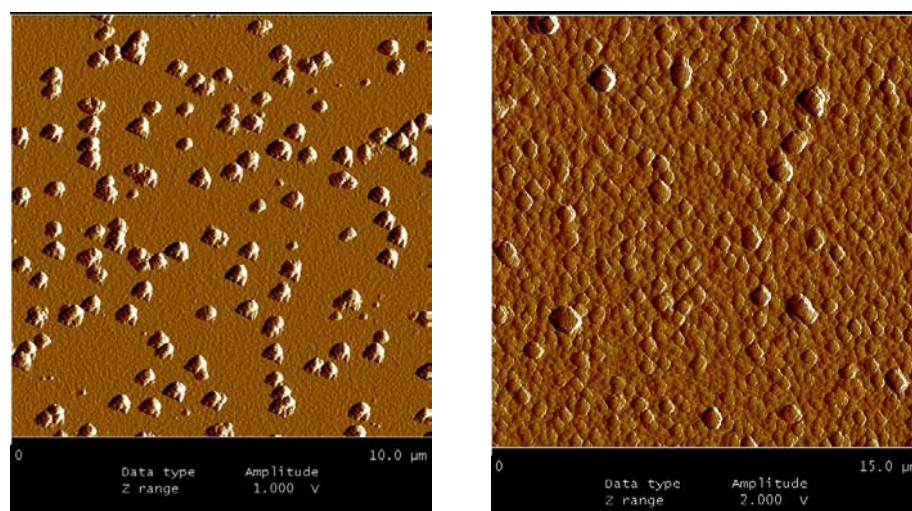


Abbildung 9: AFM-Aufnahmen von Avidin immobilisiert mit 16-Mercaptohexadecansäure/EDC (links) und mit 6-Mercaptohexan-1-ol/Cyanurchlorid (rechts)

Damit stehen zwei Methoden zur Immobilisierung von Proteinen und anderen Substanzen mit freien, reaktiven Aminogruppen zur Verfügung, die zur Herstellung von sensitiven Schichten auf den Quarzsensoren benutzt werden können. Dabei sind beide Methoden bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit und Handhabbarkeit vergleichbar.

Die Cyanurchlorid-Kopplungsmethode wurde in Anlehnung an ein Verfahren zur Beschichtung von Glasplättchen, wie von Vogel beschrieben, weiterentwickelt [177]. Wir verfügen damit über ein Verfahren zur Beschichtung der Quarzsensoren, das bereits auf Glaträgern erprobt wurde.

5.2.3. Aufbau einer support-fixierten Bilayer mit der Langmuir-Blodgett-Technik

Die Anwendung der Langmuir-Blodgett-Technik erlaubt die Übertragung von vorformierten Lipidmonoschichten auf einen festen Träger.

Zur Verifizierung eines erfolgreichen Bilayer-Aufbaus wurde nach erfolgter Filmübertragung die Schichtdicke des Lipidfilms ellipsometrisch bestimmt. Es wurde für eine reine DSPC-Schicht eine Dicke von $2,7 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$ gefunden. Bemerkenswert ist bei diesen Ergebnissen, dass hier zwischen den einzelnen Präparationen eine sehr geringe Abweichung gefunden wurde. Dies verdeutlicht, dass mit dieser Methode sehr definierte Modellmembranen erzeugt werden können.

Eine funktionale Kontrolle der LB-Schichten erfolgte durch den Nachweis einer spezifischen Avidin-Bindung an eine Biotin-dotierte DSPC-Membran. Dazu wurde in die DSPC-Lipidmatrix 5 mol% Biotinlipid eingebaut. Die Bindung von $1 \text{ } \mu\text{g}$ gelöstem Avidin

wurde mit 29 Hz Frequenzabnahme detektiert, während auf einer reinen DSPC-Schicht keine Frequenzabnahme beobachtet wurde.

Ergebnis

Mit den oben beschriebenen Methoden können die Quarzsensoren selektiv mit verschiedensten Molekülen funktionalisiert werden. Neben dem Self-Assembling von einfachen Thiolverbindungen können Proteine durch kovalente Bindung auf die Quarze aufgebracht werden. Auch die Immobilisierung von amphiphilen Molekülen gelingt mit der LB-Technik.

5.3. Temperatureinfluss und Verbesserung der Temperaturstabilität

Wie bereits beschrieben (2.4.2), wirkt sich der Einfluss der Temperatur störend auf die Schwingungseigenschaften des Quarzresonators aus. Dabei ist in flüssigem Medien nicht nur der direkte Einfluss der Temperatur auf die Resonanzfrequenz eines Quarzsensors von Bedeutung, auch indirekte Auswirkungen zum Beispiel auf die Viskosität und Dichte der Flüssigkeit spiegeln sich im Schwingungsverhalten des Quarzes wieder. Borngräber gibt für die Temperaturabhängigkeit eines 10 MHz-Quarzes mit einseitiger, wässriger Belegung einen Wert von 15 Hz/K im Bereich von 30 bis 50°C an [6]. In eigenen Untersuchungen wurde mit dem hier verwendeten LiquiLab-System der Temperatureinfluss quantifiziert. Es wurden unbeschichtete Quarze in PBS-Puffer, pH 7,4 verwendet. In Abbildung 10 ist ein repräsentativer Kurvenverlauf wiedergegeben.

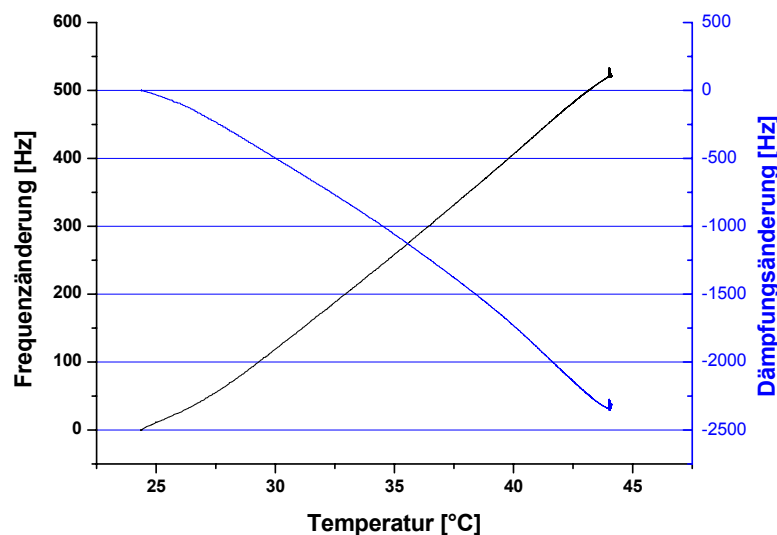


Abbildung 10: Frequenz- und Dämpfungsänderung eines 10 MHz-Quarzes durch Temperaturerhöhung von ca. 0,5 K/min im Bereich von 25-45°C

Es ist ein deutlicher, nahezu linearer Zusammenhang zwischen Temperaturänderung und Frequenzänderung zu erkennen. Auch die Abnahme der Dämpfung ist nahezu linear von

der Temperatur abhängig. Durch lineare Regression wurden die in Tabelle 7 angegebenen Werte für die Temperaturabhängigkeit von Frequenz und Dämpfung, sowie D/F-Quotient ermittelt.

Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Quotient
$24,2 \pm 1,1 \text{ Hz/K}$	$-100 \pm 9 \text{ Hz/K}$	$-4,0 \pm 0,5$

Tabelle 7: Temperaturabhängigkeit der Frequenz- und Dämpfungsänderung und des D/F-Verhältnisses in Puffer

Dabei fällt auf, dass der experimentell ermittelte Wert mit 24 Hz/K deutlich höher ausfällt als der von Borngräber angegebene mit 15 Hz/K [6]. Der Oszillatorschaltkreis ist im hier verwendeten LiquiLab-System in der temperierten Kammer angeordnet, so dass die elektronische Schaltung ebenso den Temperaturänderungen ausgesetzt ist. Da insbesondere elektrische Widerstände stark von der Temperatur beeinflusst werden, könnte sich der ermittelte höhere Temperaturkoeffizient daraus ergeben.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass während Messungen in wässrigen Medien die Temperatur möglichst exakt konstant gehalten werden muss, um störende Einflüsse zu minimieren.

Die Temperaturkontrolle im LiquiLab-System wird durch einen temperierbaren Inkubator verwirklicht, der die Luft innerhalb des Inkubators bei konstanter Temperatur hält und mittels Lüfter umwälzt. Es zeigte sich jedoch, dass diese Temperierung stark durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Luftbewegung im Labor und Änderung der Umgebungstemperatur beeinflusst wird. Daher wurde eine aktive Kühlung in das System inkorporiert. Dazu wurde im Boden des Inkubators eine Metallplatte eingebaut, die durch einen externen Kryostaten temperiert wird. Zusätzlich wurden im Deckel des Inkubators zwei Kühler platziert, die ebenfalls durch den externen Kryostaten temperiert werden. Platte und Kühler werden auf 10°C, der Inkubator auf 25°C temperiert. Mit dieser Vorgehensweise konnte eine ausgezeichnete Langzeit-Temperaturkonstanz erreicht werden. Abbildung 11 verdeutlicht die Verbesserung der Temperierung.

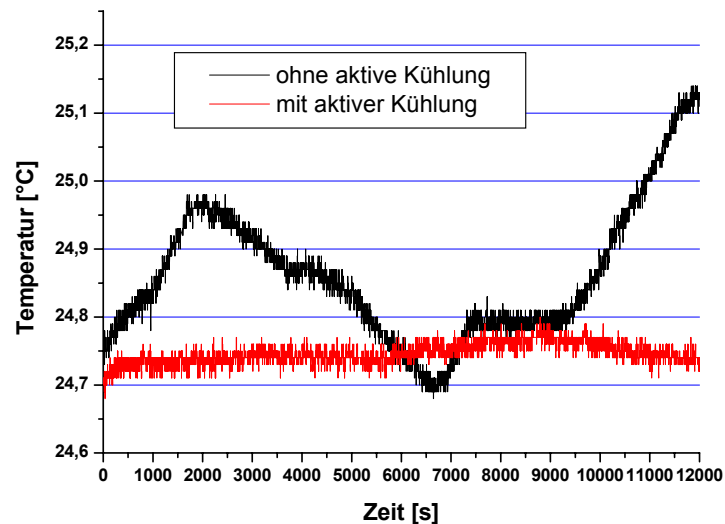


Abbildung 11: Temperatur-Zeit-Diagramm mit und ohne aktiver Kühlung

Durch diese verbesserte Temperierung konnte die Empfindlichkeit des Systems gemessen am Signalrauschen der Frequenzfassung von ± 3 Hz auf etwa ± 1 Hz erhöht werden.

5.4. Messzelle

Zur Durchführung von Messungen mit Schwingquarzen ist eine optimale Halterung für die empfindlichen, nur 160 μm dicken Quarzscheiben erforderlich. Zusätzlich muss durch die Quarzhalterung die elektrische Kontaktierung der Elektroden ermöglicht werden. Außerdem sollen die Quarzsensoren leicht auswechselbar sein.

Um alle diese Anforderungen zu erfüllen, wurden Quarzhalterungen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Automation und Kommunikation (ifak e.V., Magdeburg) entwickelt.

5.4.1. Messungen an Luft

Für Messungen an Luft stehen einfache Quarzhalterungen mit Federkontakten für die obere und untere Elektrode zur Verfügung. Die Kontaktierung erfolgt durch Einklemmen der Quarze in die Kontakte. Mit dieser Methode kann die Frequenz eines Quarzes sehr schnell erfasst werden, während die Dämpfung erheblich von der Art und Weise des Einklemmens der Quarze in die Halterung und vom Zustand der Federkontakte abhängt. Die Erfassung der Dämpfung spielt jedoch in gasförmigen Umgebungen nur eine untergeordnete Rolle, so dass diese Methode ausreichend gute Messergebnisse liefert. Die Abbildung 12 zeigt ein Foto der beschriebenen Quarzhalterung.



Abbildung 12: Quarzhalterung für Messungen an Luft

5.4.2. Statische Versuchsanordnung in Flüssigkeiten

Für statische Versuche, d.h. für Messungen der Quarzschwingung in unbewegten Flüssigkeiten, wurde eine Messzelle mit einem Deckel aus Edelstahl oder Polycarbonat verwendet. Diese Materialien weisen eine gute Beständigkeit gegen Ethanol und alle wässrigen Medien auf. Im Deckel befindet sich eine Bohrung von 12 mm Durchmesser, die den Austausch der Flüssigkeit und die Zugabe von Analyt ermöglicht. Der Quarzsensor wird mit einem O-Ring aus sehr weichem Silikon auf den Kontaktgummi, der den elektrischen Kontakt mit den Goldelektroden verwirklicht, gepresst und mit Schrauben auf dem Unterteil fixiert. Die Verbindung der Messzelle mit dem Oszillatorschaltkreis wird über vergoldete Steckkontakte realisiert. Als essentiell zur Anwendung dieser Messzelle erwies sich eine Abdeckung der Öffnung im Deckel mit einem runden Glasplättchen. So konnte eine Verflüchtigung des Mediums vermieden werden. Die Änderung des Flüssigkeitsspiegels hätte sonst einen Einfluss auf die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes und würde so zu Störungen führen [13, 92]. Das Volumen der Messzelle fasst 200 bis 450 μl . Die Abbildung 13 zeigt ein Foto der statischen Messzelle.



Abbildung 13: Messzelle zur Messung in Flüssigkeiten unter statischen Bedingungen

5.4.3. Versuchsanordnung mit Flussbedingungen

Für die Versuche unter Flussbedingungen wurde nur der Deckel der statischen Messzelle verändert. Er besteht aus Polyacryl und besitzt einen Ein- und Auslasskanal aus Edelstahl. Abbildung 14 gibt eine schematische Zeichnung der Flussmesszelle wieder.

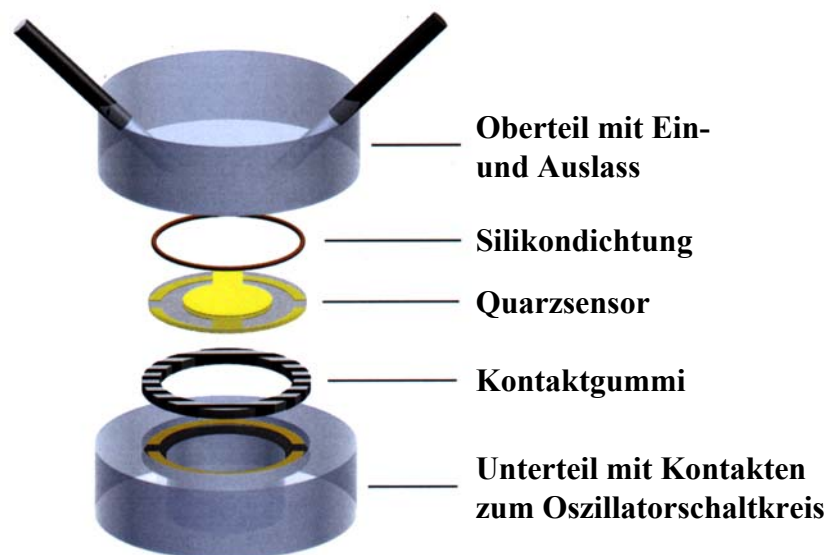


Abbildung 14: Schematische Zeichnung der Flusskammer

Das Volumen der Messzelle beträgt weniger als 200 μl . Mit Hilfe einer 12-Walzenpumpe wird über Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm die Flüssigkeit über die obere Quarzelektrode gespült. Vor den Messzellen wird eine so genannte Blasenfalle eingebaut, die die Abscheidung von eventuell auftretenden Luftblasen bewirkt. Zusätzlich werden Fluktuationen im Flüssigkeitsdruck, die durch die Walzenpumpe erzeugt werden, durch ein Gummiseptum im Deckel der Blasenfalle abgepuffert. Abbildung 15 gibt eine schematische Zeichnung der Blasenfalle wieder.

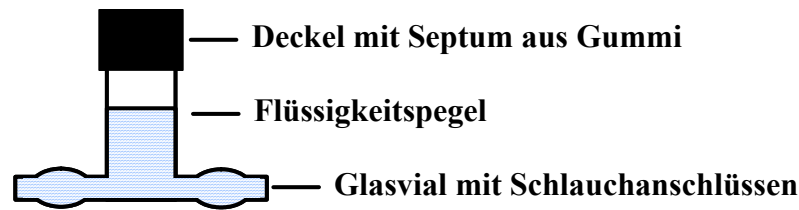


Abbildung 15: Schematische Zeichnung der Blasenfalle

Ursprünglich war es vorgesehen, die Probe mit Hilfe einer Spritze durch das Septum der Blasenfalle zu applizieren. Dies führte jedoch zu unkontrollierbaren Druckschwankungen, die eine Änderung von Resonanzfrequenz und Dämpfung des schwingenden Quarzes hervorriefen. Zusätzlich war das Septum nur bei geöffneter Inkubatorklappe zugänglich, so dass zusätzliche Störungen durch Temperaturänderungen hervorgerufen wurden. Daher war es notwendig, die Probe außerhalb des Inkubators und vor der 12-Walzenpumpe in den Flüssigkeitsstrom zu injizieren. Dazu wurde ein kurzes Schlauchstück zwischen Vorratsgefäß und Pumpe aus dem Gehäuse herausgeführt und mit einem Dreiwege-Hahn versehen. Über diesen kann der Analyt zugegeben werden, der dann über den Sensor gespült wird. Dabei lässt sich jeder Quarzsensoren einzeln spülen. Es können aber auch zwei oder vier Sensoren in Reihe geschaltet werden. Der Auslass der Messzelle wird mit einem Auffanggefäß verbunden, dem ein Überlaufgefäß vorgeschaltet ist. Dieses dient zur Konstanthaltung des hydrostatischen Druckes, dessen Änderung störend auf die Messung wirkt [92]. Für Versuche, in denen ein Analyt in einem Kreislauf fortwährend über den Sensor gespült werden soll, kann das Überlaufgefäß mit dem Drei-Wege-Hahn verbunden und so ein geschlossener Kreislauf hergestellt werden. Diese Versuchsanordnung ist in Abbildung 16 als schematisches Schaltbild dargestellt.

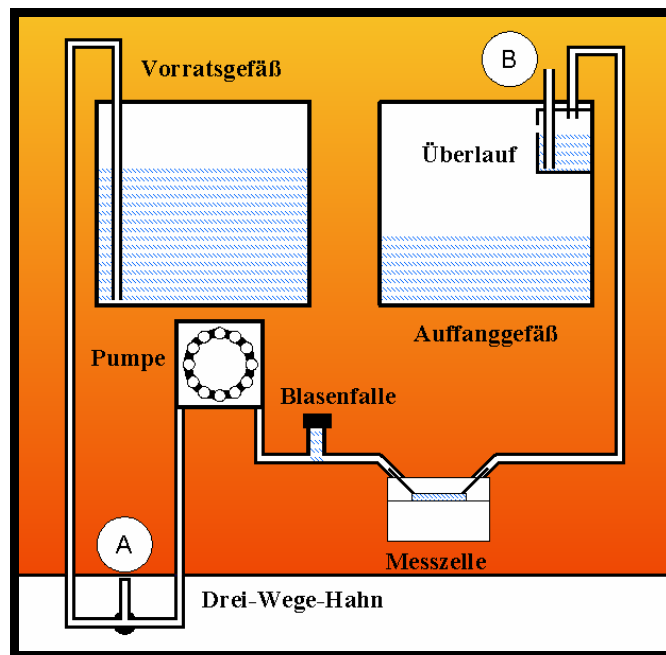


Abbildung 16: Schema der Versuchsanordnung für Messungen unter Flussbedingungen. Der farblich unterlegte Teil befindet sich im Inkubator und wird temperiert. Für Versuche mit geschlossenem Kreislaufsystem können die Stellen A und B verbunden werden.

Bei Versuchen unter Flussbedingungen muss die Pumpengeschwindigkeit und damit der Fluss extrem konstant gehalten werden, da jede Änderung dieser Parameter einen Einfluss auf sowohl Resonanzfrequenz als auch Dämpfung der Quarzsensoren hat. Wird beispielsweise die Pumpe gestoppt, um den Fluss anzuhalten und so ein Sedimentieren des zugegebenen Analyten zu ermöglichen, ändern sich Frequenz und Dämpfung sprunghaft. Nach wenigen Minuten wird dann eine neue konstante Frequenz bzw. Dämpfung erreicht. Diese druckbedingte Frequenz- und Dämpfungsänderung verhindert aber die Aufnahme einer Bindungskinetik, da Bindungsereignisse und Druckänderung zeitgleich vom Sensor erfasst werden. Daher können bei solch einer Versuchsplanung nur die Absolutwerte der Frequenz- und Dämpfungsänderung erfasst werden. Abbildung 17 gibt die Änderungen in Frequenz und Dämpfung durch das Unterbrechen des Flusses für vier Quarzsensoren wieder. Alle Quarze wurden mit identischer Flussgeschwindigkeit gespült.

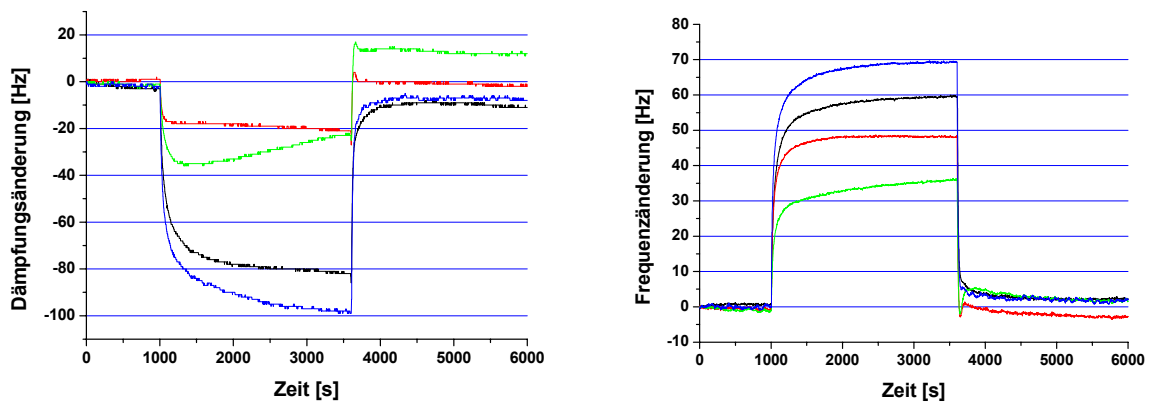


Abbildung 17: Änderungen von Frequenz (links) und Dämpfung (rechts) durch Anhalten der Pumpe für vier unbeschichtete Quarze

Wie aus Abbildung 17 zu erkennen ist, ist der Einfluss durch Unterbrechung des Flusses für jeden Quarz unterschiedlich. Beim Einbau der Quarze treten kleinste Unterschiede in der Fixierung durch die Gummidichtung auf, was durch unterschiedliche Grundfrequenzen beim wiederholten Einbau desselben Quarzes in die gleiche Flusszelle erkennbar ist. Diese Differenz wird durch kleinste mechanische Verspannungen hervorgerufen. Diese Vorspannungen innerhalb der Quarze verursachen dann die beschriebene unterschiedliche Sensorantwort auf die Änderungen der Flussgeschwindigkeit. Die Verwendung sehr weicher Gummidichtungen brachte zwar eine erhebliche Verbesserung, insbesondere erfolgte ein Schutz vor zu großen mechanischen Spannungen, die oftmals zum Bruch des Quarzes führen, Störeinflüsse konnten jedoch nicht vollständig umgangen werden.

5.5. Unspezifische Proteinadsorption an verschiedenen Oberflächen

Die Leistungsfähigkeit der vorhandenen QCM-Apparatur sollte anhand der Untersuchung von Adsorptionsphänomenen unterschiedlicher Proteine an verschiedenen Oberflächen gezeigt werden. Dazu wurden drei Proteine ausgewählt, die sich vor allem in ihrer räumlichen Struktur stark unterscheiden. Humanes Myoglobin weist in seiner Sekundärstruktur einen sehr hohen Anteil von α -Helices (70%) aber keinerlei Faltblatt-Struktur auf. Ebenso besteht BSA ebenfalls nur aus α -Helix und random-coil-Strukturen. Zusätzlich wird die Struktur des BSA durch 17 intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Concanavalin A besteht dazu im Gegensatz hauptsächlich aus β -Faltblatt-Strukturen. Die folgenden 3D-Darstellungen (Abbildung 18) verdeutlichen die Unterschiede in den Proteinstrukturen.

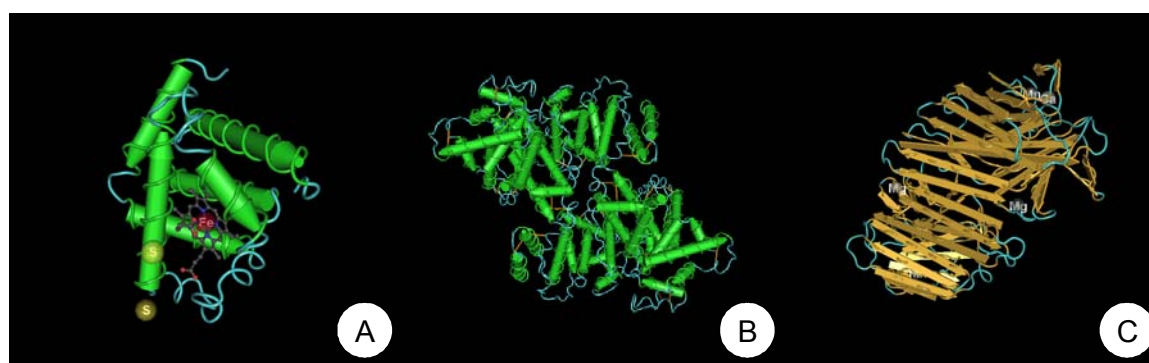


Abbildung 18 3D-Darstellungen der Proteinstrukturen von A) Myoglobin, B) humanem Serumalbumin und C) Concanavalin A. α -Helices sind durch grüne, β -Faltblattstrukturen durch gelbe Pfeile verdeutlicht. Random-coil-Bereiche sind hellblau dargestellt [178].

Tabelle 8 gibt die wesentlichen Unterschiede der drei verwendeten Proteine wieder.

	BSA	Myoglobin	Concanavalin A
Molekulargewicht	68 kDa	18 kDa	102 kDa
Isoelektrischer Punkt	4,7	6,8	5,1
Anteil random-coil	45 %	30 %	34 %
Anteil α -Helix	55 %	70 %	0 %
Anteil β -Faltblatt	0 %	0 %	66 %
Disulfid-Brücken	17	keine	keine

Tabelle 8: Eigenschaften von BSA, Myoglobin und Concanavalin A

Die Oberfläche der Quarzsensoren wurde durch verschiedene Methoden modifiziert. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die durchgeführten Modifizierungen.

Substanz	Art der Modifizierung	Randwinkel von Wasser
Gold	keine	$55 \pm 8^\circ$
Oktadekanthiol	Self-Assembling	$102 \pm 2^\circ$
Perfluorhexanthiol	Self-Assembling	$95 \pm 8^\circ$
Mercaptohexanol	Self-Assembling	$44 \pm 2^\circ$
Glucosamin	Kovalente Bindung an Mercaptohexadekansäure/EDC	$59 \pm 1^\circ$
Polyethylenimin	Kovalente Bindung an Mercaptohexadekansäure/EDC	$46 \pm 8^\circ$
Bovines Serumalbumin	Kovalente Bindung an Mercaptohexadekansäure/EDC	$51 \pm 5^\circ$
Diamino-PEG-3000	Kovalente Bindung an Mercaptohexadekansäure/EDC	$36 \pm 2^\circ$

Tabelle 9: Herstellung und Randwinkel der untersuchten Oberflächenmodifizierungen der Quarze

Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, werden mit diesen Beschichtungen sowohl hydrophobe (Oktadekanthiol und Perfluorhexanthiol) als auch relativ hydrophile Oberflächen (PEG-Derivate, BSA, Mercaptohexanol) erzeugt. In einer Versuchsreihe wurde die Adsorption der jeweiligen Proteinlösungen (0,1 mg/ml) in PBS-Puffer gemessen. Tabelle 10 gibt die erhaltenen Messergebnisse wieder.

Oberfläche	BSA		Myoglobin		Concanavalin A	
	Δf	D/F- Quotient	Δf	D/F- Quotient	Δf	D/F- Quotient
Gold	-61 ± 21 Hz	$0,6 \pm 0,2$	-27 ± 8 Hz	$0,9 \pm 0,3$	-61 ± 6 Hz	$1,4 \pm 0,2$
Oktadecanthiol	-72 ± 6 Hz	$0,8 \pm 0,1$	-33 ± 2 Hz	$1,2 \pm 0,1$	-63 ± 2 Hz	1,2
Perfluorhexanthiol	-79 ± 14 Hz	$0,8 \pm 0,2$	-16 Hz	1,8	-77 ± 11 Hz	$0,8 \pm 0,1$
Mercaptohexanol	-53 ± 17 Hz	$1,6 \pm 1$	-26 ± 6 Hz	$1,3 \pm 0,3$	-238 ± 113 Hz	$1,9 \pm 0,1$
Glucosamin	-79 ± 6 Hz	$0,9 \pm 0,1$	-10 ± 1 Hz	$1,5 \pm 0,5$	-88 ± 16 Hz	$1,8 \pm 0,4$
Polyethylenimin	-93 ± 1 Hz	$1,0 \pm 0,1$	-36 Hz	1,5	-117 Hz	0,7
Bovines Serumalbumin	-33 Hz	1,56	-12 Hz	0,8	-13 Hz	0,1
Diamino-PEG- 2000	-32 ± 2 Hz	$1,2 \pm 0,2$	-12 Hz	0,9	-23 Hz	1,8

Tabelle 10: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis für die drei untersuchten Proteine bei der Adsorption auf verschiedenen beschichteten Quarzen

Aus den Ergebnissen kann man erkennen, dass die stärkste Eiweißadhäsion an hydrophoben Oberflächen von Oktadecanthiol und Perfluorhexanthiol stattfindet. Diese Tendenz ist bei allen drei Proteinen gleichermaßen zu erkennen. Die große Adsorptionsneigung von Proteinen an hydrophobe Oberflächen ist hinreichend aus der Literatur bekannt.

Ebenso ist die Adsorption an einer reinen Goldoberfläche bei allen drei verwendeten Proteinen relativ groß. Dies kann durch die starke Wechselwirkung schwefelhaltiger Aminosäuren (Cystein und Methionin) mit der Goldoberfläche erklärt werden. An einer Polyethylenimin-Oberfläche, die unter den Versuchsbedingungen positiv geladen ist, findet sich für alle untersuchten Proteine eine sehr starke Proteinadhäsion. Diese könnte sich durch elektrostatische Anziehungskräfte der zumindest teilweise negativ geladenen Proteine mit der positiv geladenen Oberfläche erklären.

Vergleichsweise geringe Adhäsionen finden sich dagegen bei den hydrophilen Oberflächen. Beschichtung der Goldelektroden mit PEG oder BSA zeigt bei allen drei Proteinen die geringste Adhäsion. Erstaunlich ist jedoch das Verhalten der Mercaptohexanol-beschichteten Oberflächen. Obwohl diese ebenfalls mit einem Randwinkel von 44° hydrophilen Charakter aufweisen, beobachten wir hier eine sehr starke Adhäsion aller drei Proteine. Das D/F-Verhältnis ist ebenfalls sehr hoch im Vergleich zu den anderen

Beschichtungen. Das lässt auf eine voluminöse, relativ bewegliche Adsorbatschicht mit viskoelastischen Eigenschaften schließen. Der Ursprung dieser Wechselwirkung kann nicht hinreichend erklärt werden. Eventuelle Fehlstellen in der Self-Assembling-Schicht, wie sie von wasserlöslichen Thiolen an Gold in wässrigen Systemen berichtet werden, könnten zu einer Wechselwirkung zwischen Schwefel und Gold führen. Da aber bei Concanavalin A mehr als dreimal so große Frequenzänderungen (-238 Hz) wie für eine reine Goldoberfläche (-61 Hz) gemessen wurden, kann diese Erklärung zumindest für das Concanavalin A nicht ausreichend sein. Da Concanavalin A jedoch eine Affinität zu Glukose- und Mannose-Strukturen aufweist und diese Bindung hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen verwirklicht werden, könnten über die OH-Gruppen des Mercaptohexanols eventuell ebenfalls Wasserstoffbrücken zu Con A ausgebildet werden. Dass in dem verwendeten Versuchsaufbau eine starke Bindung zum Concanavalin A realisiert werden kann, zeigt die erwartete hohe Adsorption an einer Glucosamin-Oberfläche. Dennoch wird hier nur etwa ein Drittel der Con A-Menge im Vergleich zur Mercaptohexanol-Schicht gebunden. Für Myoglobin wird im Falle einer Glucosamin-Beschichtung die geringste Adhäsion gefunden, während BSA eine vergleichsweise hohe Adsorption zeigt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Unterdrückung einer unspezifischen Adsorption von Proteinen hydrophile und räumlich ausgedehnte Beschichtungen bevorzugt werden sollten. Dazu eignen sich besonders Polyethylenglykol-Derivate und Proteine wie BSA. Besonders durch eine Steigerung der räumlichen Ausdehnung der hydrophilen Beschichtung, zum Beispiel durch Verwendung eines höhermolekularen PEG-Derivates kann die unspezifische Proteinadsorption weiter verringert werden. So konnte durch Verwendung eines Mercapto-PEG-10000 die unspezifische Adsorption von BSA unter den Versuchsbedingungen vollständig unterdrückt werden. Dabei zeigte sich kein Einfluss der terminalen Gruppe des PEG, da sowohl OH- als auch CH₃-terminierte PEG-Derivate nur eine sehr geringe unspezifische Adsorption zeigten.

Die durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass die unterschiedliche Adsorptionsneigung der einzelnen Proteinen nicht allein durch einfache Unterschiede in der Sekundärstruktur erklärt werden können. Es konnte ein sehr ähnliches Adsorptionsmuster von Proteinen mit hauptsächlich α -helikaler Struktur und überwiegend β -Faltblatt-Struktur gezeigt werden. Unterschiede im Adsorptionsverhalten können dagegen meist durch proteinspezifische Eigenschaften, wie zum Beispiel Bindungsaffinitäten zu bestimmten Liganden (Zucker) erklärt werden.

Es wird deutlich, dass beim Arbeiten mit Proteinen stets mit einer unspezifischen Adhäsion zu rechnen ist. Das Ausmaß der unspezifischen Adsorption kann zwar durch entsprechende Beschichtungen verringert werden, doch zeigen die Versuche, dass an nahezu allen Oberflächen mit allen getesteten Proteinen eine unspezifische Adsorption beobachtet wird.

Es besteht daher die Anforderung, stets entsprechende Negativkontrollen durchzuführen und die mit der Quarzmikrowaage gefundenen Ergebnisse kritisch zu interpretieren.

5.6. Spezifische Adsorption an funktionalisierten Oberflächen

5.6.1. Untersuchungen am Avidin-Biotin-System

Zur Erkennung der prinzipiellen Leistungsfähigkeit der vorhandenen Quarzmikrowaage wurde in einem ersten Versuchsaufbau die Bindung des sehr gut untersuchten Ligand-Rezeptor-Paares Avidin und Biotin untersucht. Deshalb wurde Biotin-Hydrazid kovalent auf die Goldelektroden des Quarzsensors gebunden. Dazu kamen sowohl die Cyanurchlorid-Methode als auch die 16-Mercaptohexadecansäure-Methode zum Einsatz. Da eine hohe unspezifische Adsorption von Avidin, besonders an einer 16-Mercaptohexadecansäure-Schicht, beobachtet wurde, haben wir der Beschichtungslösung 0,5% BSA zur Unterdrückung der unspezifischen Adsorption zugesetzt. Abbildung 19 zeigt den typischen Frequenzverlauf bei der Bindung von gelöstem Avidin an Biotin-funktionalisierte Quarzsensoren.

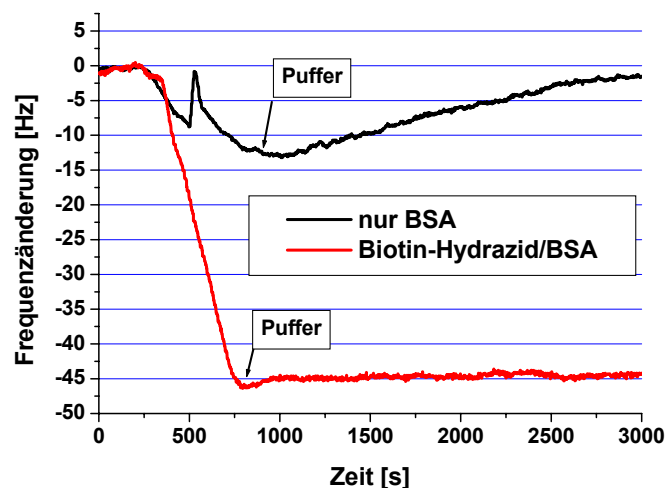


Abbildung 19: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von Avidin an Biotin-Hydrazid/BSA modifizierte Quarze

Abbildung 19 zeigt deutlich, dass eine Bindung von Avidin an das oberflächengebundene Biotin detektiert werden kann. Im gleichen Versuchsansatz wurde die unspezifische Adsorption von Avidin an Quarzen mit einer reinen BSA-Schicht untersucht.

Auch hier wurde eine signifikante Frequenzabnahme (-13 Hz) gemessen. Allerdings konnte diese Belegung durch Spülen mit Puffer komplett wieder abgewaschen werden. Im Gegensatz dazu erkennt man eine nur sehr geringe Frequenzzunahme durch Spülen mit Puffer für den Biotin-modifizierten Quarz. Dies lässt den Schluss zu, dass die Frequenzänderung von -45 Hz durch die spezifische Wechselwirkung von Avidin mit Biotin-Hydrazid hervorgerufen wird.

In einem inversen Experiment sollte die Bindung von gelöstem Biotin an Oberflächengebundenes Avidin untersucht werden. Abbildung 20 gibt den ermittelten Frequenzverlauf wieder.

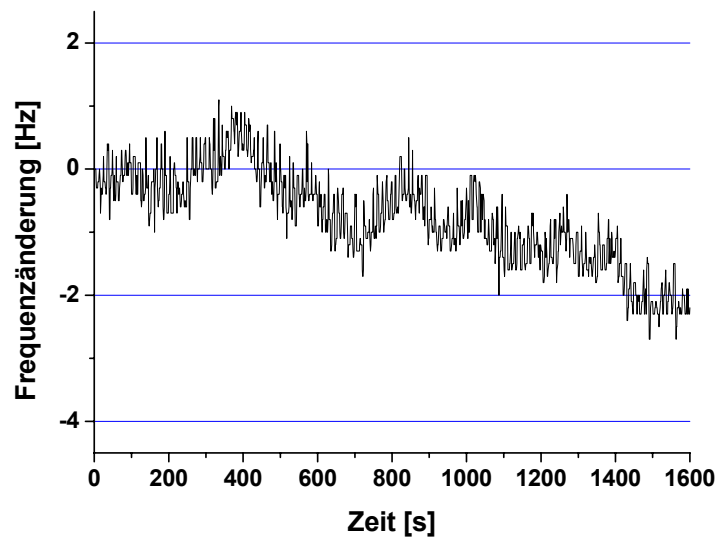


Abbildung 20: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von Biotin an Avidin-modifizierte Quarze

Es wird deutlich, dass die Biotinbindung als Masseanlagerung nicht sicher detektiert werden kann. Eine Berechnung der theoretisch zu erwartenden Frequenzabnahme soll die Interpretation dieses Ergebnisses erleichtern.

Die verwendeten Quarzsensoren haben eine sensitive Oberfläche von $0,28 \text{ cm}^2$. Ein Avidin-Tetramer hat eine Fläche von etwa $57,6 \text{ nm}^2$. An dieses Tetramer können vier Biotinmoleküle ($M = 244 \text{ g/mol}$) gleichberechtigt binden, wobei jedoch jeweils zwei Bindungs epitope gegenüber angeordnet sind, so dass bei einem immobilisierten Avidin nur von zwei zugänglichen Bindungsstellen ausgegangen werden kann. Geht man von einer 100%igen Belegung der Sensoroberfläche mit Avidin aus, so würde man eine Masse von $0,004 \text{ ng}$ detektieren müssen. Nach der Sauerbrey-Gleichung beträgt die Empfindlichkeit eines 10 MHz -Quarzes $4,4 \text{ ng/cm}^2 \times \text{Hz}$. Bei einer sensitiven Fläche von $0,28 \text{ cm}^2$ ergibt sich eine Sensitivität von $1,24 \text{ ng/Hz}$ und Quarz, d.h. es ist eine Frequenzabnahme von $0,003 \text{ Hz}$ zu erwarten. Maximal kann aber nur eine Frequenzänderung von etwa 1 Hz detektiert werden.

Aus dieser Rechnung wird eine entscheidende Limitierung der Quarzmikrowaage deutlich. Der zu untersuchende Analyt sollte eine ausreichend große Masse aufweisen, um detektiert werden zu können. Korrekter sollte formuliert werden, dass eine ausreichend hohe Massedichte, d.h. Masse pro Sensorfläche erreicht werden muss. Wird zum Beispiel ein sehr „leichter“ Analyt dicht gepackt, so kann er ebenfalls analytisch erfasst werden, wie am Beispiel der Adsorption von Wassermolekülen an oberflächengebundene Lipidschichten gezeigt wurde [179].

Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung zur Korrelation von Frequenzabnahmen durch Masseanlagerungen in Flüssigkeiten nur eine relativ grobe Orientierung darstellen kann. Wie bereits dargelegt, wird die Frequenz auch durch andere Parameter beeinflusst, insbesondere durch Änderungen in den viskoelastischen Eigenschaften der Grenzfläche Sensor-Flüssigkeit. Ebenfalls ist zu beachten, dass jede akustisch auf dem Quarz gekoppelte Masse eine Frequenzänderung bewirkt, also auch anhaftende und „mitschwingende“ Wassermoleküle, sei es als Hydratwasser oder als physikalisch gebundenes Kapillarwasser. Dadurch erhöht sich die detektierbare Masse insbesondere von Proteinen erheblich, was zu höheren Werten führt als mit der Sauerbrey-Gleichung vorhergesagt.

Deshalb versuchten wir in einem neuen Ansatz, die Masse des Biotins zu erhöhen, indem es an BSA kovalent gekoppelt wurde. Diesmal ergibt sich bei der gleichen Modellrechnung wie oben, jedoch mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, eine theoretische Frequenzabnahme von etwa einem Hz. Bei der Adhäsion von Biotinyl-BSA fanden wir jedoch eine Frequenzabnahme von 138 Hz. In einem Vergleichsexperiment mit einer reinen BSA-Schicht wurden allerdings ähnlich hohe Frequenzabnahmen gefunden, so dass der gefundene Wert zum größten Teil auf unspezifischen Wechselwirkungen beruht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bindung von Avidin an eine biotinylierte Oberfläche sehr gut detektiert werden kann, da die Masse des Avidins für eine deutliche Sensorantwort ausreicht. Der umgedrehte Fall, die Biotinbindung auf einer Avidin-Oberfläche, kann dagegen bedingt durch die kleine Masse des Biotins nicht mit der QCM-Technik verfolgt werden.

5.6.2. Antigen-Antikörper-Reaktionen

Die Antikörper-Antigenerkennung ist die Grundvoraussetzung für die spezifische Immunantwort höherer Lebewesen. Antikörper lassen sich gegen nahezu jedes Antigen herstellen und sind seit langem in Wissenschaft und Diagnostik Standard. Auch therapeutisch nutzbare Antikörper sind auf dem Arzneimittelmarkt zu finden. Die Grundlage für die breite

Anwendbarkeit ist die sehr spezifische und feste Bindung zwischen Antikörper und Antigen. Die Einsetzbarkeit der vorhandenen QCM-Apparatur zur Detektion der Antigen-Antikörperbindung wurde anhand mehrerer Beispiele untersucht.

Anti-HSA und HSA

Als ein Modellsystem wurde ein käuflicher polyklonaler Antikörper gegen humanes Serumalbumin und humanes Serumalbumin als Antigen verwendet. Beide Bindungspartner lassen sich leicht auf den Goldsensoren immobilisieren. In einem ersten Versuchsaufbau wurde der Antikörper auf der Goldelektrode gebunden. Anschließend wurde eine definierte Menge humanes Serumalbumin über den Quarz gespült und die Frequenzänderung aufgenommen. Um eine mehrmalige Anwendung des Sensors zu ermöglichen, versuchten wir nach erfolgter Bindung durch Spülen mit 100 mM Glycin-HCl pH 2,0 zu regenerieren. Dadurch wurde allerdings die Bindungsfähigkeit des Sensors auf etwa 45% des unregenerierten Wertes herabgesetzt, d.h. 55% der Bindungsfähigkeit des Antikörpers werden durch die Regeneration zerstört oder gebundenes Antigen kann nicht mehr abgelöst werden. Abbildung 21 zeigt die typische Antwort des Sensors vor und nach der Regeneration.

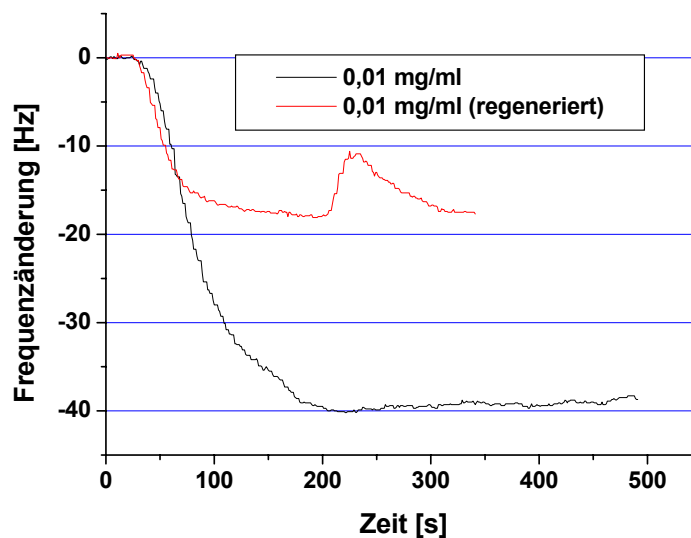


Abbildung 21: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von HSA an immobilisierten Anti-HSA-Antikörpern vor (schwarz) und nach (rot) erfolgter Regeneration mit Glycin-HCl pH 2,0

Der Zeitverlauf der Bindungsreaktion ist von der Konzentration des Analyten abhängig. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von HSA vermessen. Der Sensor wurde dazu jedes Mal mit Glycin HCl pH 2,0 regeneriert. Abbildung 22 zeigt typische Frequenzverläufe mit drei unterschiedlichen Konzentrationen.

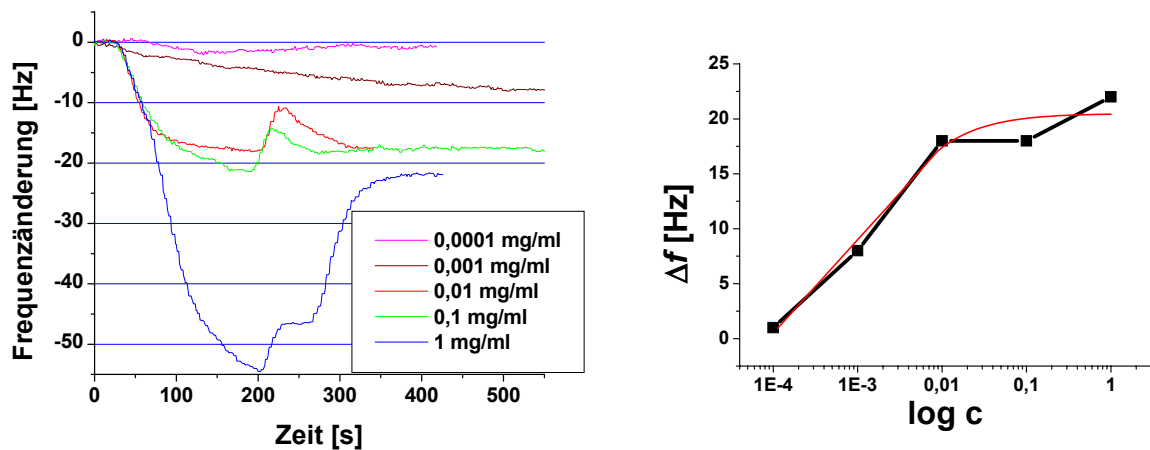


Abbildung 22: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von HSA an immobilisierten Anti-HSA-Antikörper in Abhängigkeit von der Konzentration (links) und Betrag der Frequenzänderung gegen den Logarithmus der HSA-Konzentration (rechts).

Es ist zu erkennen, dass mit höheren Konzentrationen des Analyten größere Frequenzabnahmen erreicht werden. Theoretisch sollte jedoch die Geschwindigkeit der Frequenzänderung konzentrationsabhängig sein. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 23 der theoretische Frequenzverlauf dargestellt, der für eine ideale Bindung eines Antigens an Antikörper-modifizierte Quarze nach Gleichung (16) berechnet wurde ($k_{\text{Ass}}=10^{-6} \text{ M s}^{-1}$, $k_{\text{Diss}}=10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\Delta f_{\text{Max}}=-100 \text{ Hz}$).

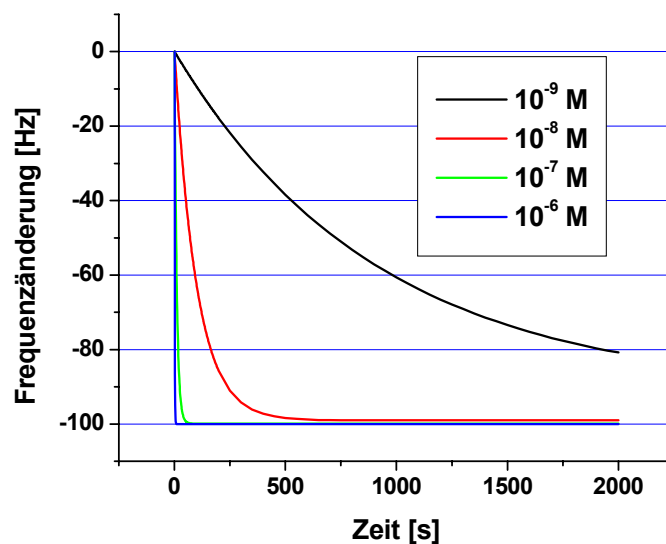


Abbildung 23: Idealer Frequenzverlauf der Antigen-Antikörper-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten (maximale Sensorantwort: -100 Hz)

Im vorliegenden Beispiel ist diese Konzentrationsabhängigkeit deutlich für die Konzentrationen von 0,0001 bis zu 0,01 mg/ml zu erkennen (Abbildung 22). Bei den hohen Konzentrationen von 0,1 und 1 mg/ml kann kein steilerer Abfall der Frequenz mit der Zeit

beobachtet werden. Ebenso muss kritisch angemerkt werden, dass bei der höchsten Konzentration von 1 mg/ml zwischenzeitlich eine sehr große Frequenzabnahme von 54 Hz erreicht wird, die jedoch nach Spülen mit Puffer auf einen Wert von -22 Hz absinkt. Dieser Wert ist wiederum nicht sehr viel größer als bei den kleineren Konzentrationen. Ebenso fällt auf, dass die Konzentrationen von 0,1 und 0,01 mg/ml HSA mit 18 Hz die gleiche Frequenzänderung nach Spülen mit Puffer bewirken.

Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass der Sensor „überladen“ wurde und mit der verwendeten geringsten Konzentration bereits die maximale Bindungsfähigkeit des Sensors erreicht ist. Eine weitere Konzentrationserhöhung kann dann keine „größere“ Frequenzabnahme mehr hervorrufen, bzw. eine weitere Massebeladung erfolgt dann nur unspezifisch und kann wieder abgespült werden. Im $\Delta f/\log c$ -Diagramm kann man ein Plateau in der Antwort des Sensors ab etwa 0,01 mg/ml erkennen, welches auch auf die Sättigung des Sensors hindeutet.

Auch der umgekehrte Fall, immobilisiertes Antigen und gelöster Antikörper wurde untersucht. Abbildung 24 zeigt die typischen Frequenzverläufe bei der Bindung von Anti-HSA-Antikörpern an immobilisiertes HSA.

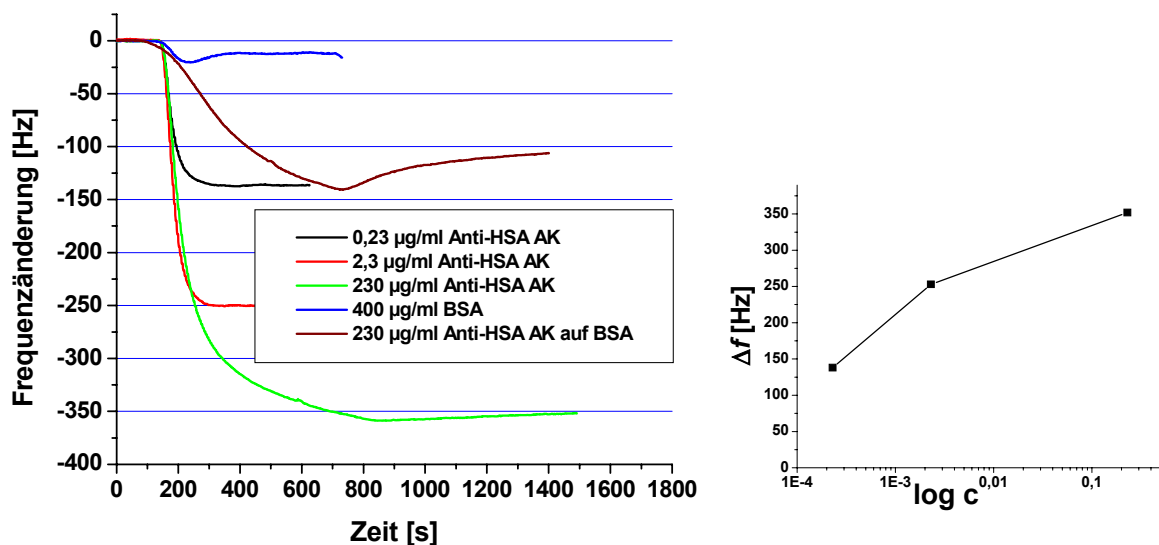


Abbildung 24: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von Anti-HSA-Antikörper an immobilisiertem HSA in Abhängigkeit von der Konzentration und unspezifische Adhäsion von BSA und Anti-HSA-Antikörper auf einer BSA-Schicht (links) und Betrag der Frequenzänderung gegen den Logarithmus der Konzentration des Antikörpers (rechts)

Deutlich ist die spezifische Bindung des Antikörpers in einer konzentrationsabhängigen Weise an das Antigen zu erkennen. Die unspezifische Adsorption kann vernachlässigt werden, wie der Kurvenverlauf einer 0,4 mg/ml BSA-Lösung zeigt (Abbildung 24, blaue Linie). Zusätzlich wurde die unspezifische Adsorption von Anti-HSA-Antikörper an einer

BSA-Schicht getestet. Hier ist eine messbare Bindung zu erkennen (Abbildung 24, braune Linie). Diese kann durch eine vorhandene Kreuzreaktivität des verwendeten polyklonalen Antikörpers gegen bovines Serumalbumin erklärt werden.

Humanes Cathepsin B und monoklonaler Anti-human-Cathepsin B-Antikörper

Weiterführende Untersuchungen zum Bindungsmechanismus und der Möglichkeit des Einsatzes der Quarzmikrowaage wurden mit einem weiteren Modellsystem getestet. Dazu kam ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Cathepsin B und das entsprechende Antigen zum Einsatz. Beide Substanzen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Dr. Weber, Martin Luther Universität Halle, Institut für Physiologische Chemie, zur Verfügung gestellt. Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers kann die Bindung zwischen Antikörper und Antigen wesentlich spezifischer untersucht werden.

Abbildung 25 gibt die konzentrationsabhängige Bindung des monoklonalen Antikörpers an immobilisiertes Cathepsin B wieder.

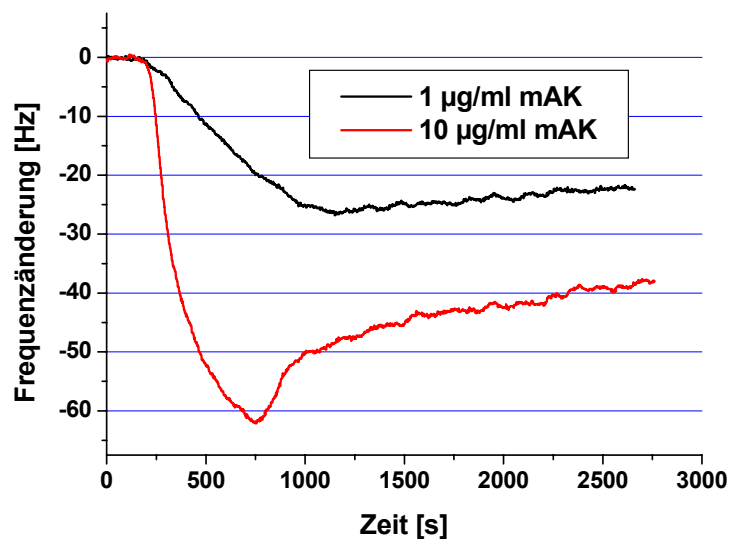


Abbildung 25: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von monoklonalem Anti-human-Cathepsin-B-Antikörper an immobilisiertes humanes Cathepsin B in Abhängigkeit von der Konzentration

Auch hier wurde zuerst der Antikörper immobilisiert und mit gelöstem Antigen gespült, wobei die Bindung von gelöstem Cathepsin B an immobilisierten monoklonalen Antikörpern nicht sicher detektiert werden konnte, da nur eine Frequenzabnahme von etwa 5 Hz gemessen wurde. Aus diesem und dem Ergebnis der vorangegangenen Untersuchungen mit HSA und polyklonalem Anti-HSA-Antikörper kann geschlossen werden, dass die Immobilisierung des Antikörpers zu einer starken Verringerung oder sogar zum Verlust der Bindungsfähigkeit führen kann. Durch die statistische Kopplung der Antikörper über freie Aminogruppen muss

davon ausgegangen werden, dass ein nicht unerheblicher Teil des immobilisierten Antikörpers durch eine ungünstige Orientierung der Antigen-bindenden Region keine Bindung mit dem gelösten Antigen eingehen kann. Hinzu kommt, dass bei Betrachtung der Größenverhältnisse von Antigen ($MG_{\text{HSA}}=69$ kDa, $MG_{\text{Cathepsin B}}=38$ kDa) und Antikörper ($MG=150$ kDa) eine „falsche“ Orientierung auf der Sensoroberfläche beim Antigen weniger dramatisch ausfällt, als beim Antikörper, da aufgrund des höheren Platzbedarfes des gelösten Antikörpers sowieso nicht jedes immobilisierte Antigen bindungsfähig ist.

Eine gerichtete Kopplung von Antikörpern gelingt durch die Bindung an Protein A. Protein A und Protein G sind Proteine, die spezifisch den Fc-Teil von Antikörpern binden, so dass der Antigen-bindende Fab-Teil frei zugänglich bleibt. Zahlreiche Arbeiten berichten von so immobilisierten Antikörpern zur Durchführung von Immunoassays [180, 181, 182].

Auch mit unserer Quarzmikrowaage haben wir die Bindung von Antikörpern an Protein A und G untersucht. In einem Experiment wurde die Bindung von humanen IgG an immobilisiertes Protein A und G untersucht. Abbildung 26 gibt den Frequenzverlauf bei der Bindung von humanem IgG (1 mg/ml) an Protein A und G-funktionalisierte Sensoren wieder.

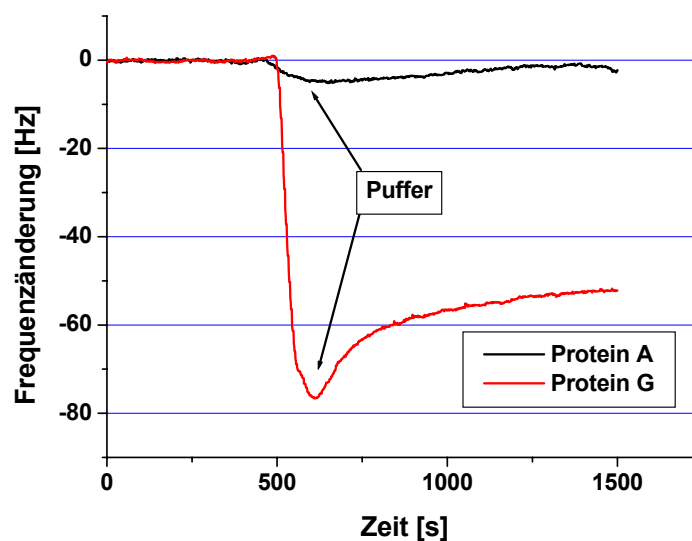


Abbildung 26: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von 1 mg/ml humanem IgG an immobilisiertes Protein A oder G

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Bindung stattfindet. Dabei ist die Bindung an den mit Protein G beschichteten Sensor etwa 10fach größer, während die Bindung an das Protein A nur schwach ausfällt und unter den eingesetzten Flussbedingungen ($0,3 \mu\text{l/s}$) wieder gelöst wird. Auch bei Protein G-gebundenem IgG wird eine langsame Abwaschung durch Puffer beobachtet. Diese Versuche zeigen, dass die Immobilisierung des Antikörpers mit Hilfe von Protein A oder G nicht die erhoffte Verbesserung der Sensitivität erreicht, da es unter den

eingesetzten Flussbedingungen zu einer deutlichen Ablösung der Antikörper kommt, die zu einer Drift in der Frequenzgrundlinie führt und die genaue Detektion der Antigenbindung erschwert oder gar unmöglich macht. Eine mögliche Umgehung dieses Problems könnte die kovalente Fixierung der Protein A-IgG-Bindung durch Dimethylpimelimidat sein [52, 183].

L-Selektin und monoklonaler Anti-L-Selektin-Antikörper

Als weiteres Beispiel für die Detektion der Erkennung zwischen Antigen und Antikörper wurde die Bindung eines monoklonalen Anti-L-Selektin-Antikörpers an immobilisiertes L-Selektin untersucht. Ein spezieller Anti-L-Selektin-Antikörper befindet sich zurzeit in klinischer Testung zur Behandlung nach ischämischen Zuständen und Multi-Organ-Versagen [184]. Mit Hilfe der Quarzmikrowaage kann leicht die Bindung des Antikörpers detektiert werden. Anhand dieses Beispiels wurden die beiden Immobilisierungsmethoden für Proteine (Mercaptohexadecansäure/EDC und Cyanurchlorid) verglichen. Wie in der Abbildung 27 zu erkennen ist, kann kein Unterschied zwischen beiden Fixierungsarten festgestellt werden. Ebenso wird nochmals deutlich, dass die Unterdrückung der unspezifischen Adsorption mit einer BSA-Beschichtung für die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen zufrieden stellende Ergebnisse liefert.

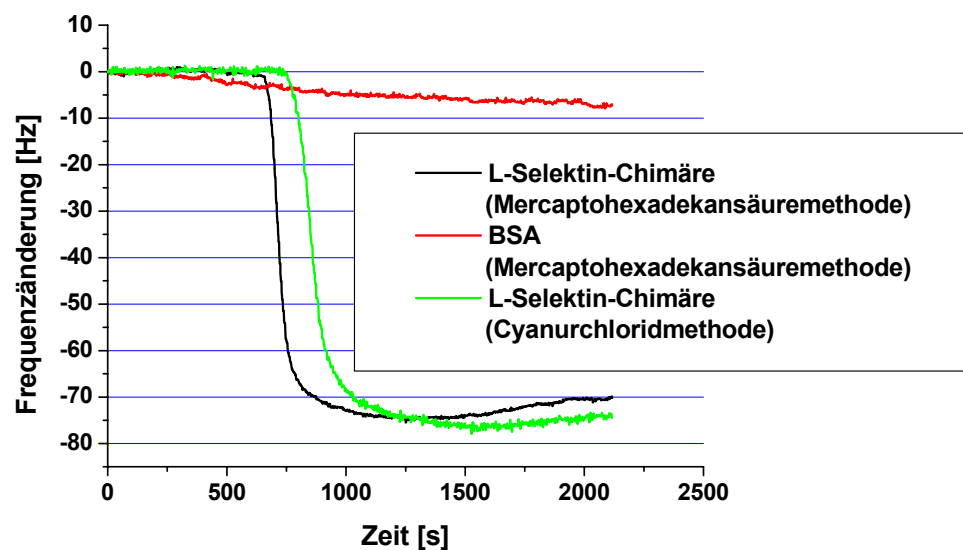


Abbildung 27: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von monoklonalem Anti-L-Selektin-Antikörper an immobilisierte L-Selektin-Chimäre

Die schnelle Detektion der Antikörperbindung kann zu einer Qualitätskontrolle während der Reinigung oder auch zur Selektion von Antikörpern genutzt werden. Aufgrund der zeitlichen Verfolgung der Bindung ist es möglich, Bindungskonstanten aus den Sensogrammen direkt zu ermitteln.

5.6.3. Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Quarzmikrowaage kann nicht nur zum qualitativen Nachweis einer Bindung eingesetzt werden, sondern sie bietet ebenfalls die Möglichkeit, verschiedene Bindungsparameter einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu quantifizieren. Von besonderem Interesse ist dabei die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D , sowie den Bindungskonstanten k_{Ass} für die Assoziation und k_{Diss} für die Dissoziation der Bindung. Mit Hilfe einer nicht-linearen Regression können die Frequenzverläufe, die bei der Bindung eines Analyten erfasst werden, an die folgenden Gleichungen angepasst werden.

$$\Delta F = \Delta F_0 \times e^{-k_{Diss}(t-t_0)} \quad \text{Gleichung (18)}$$

$$\Delta F = -\frac{k_{Ass} \times [A] + F_{\max}}{k_{Ass} \times [A] + k_{Diss}} \times (1 - e^{-[k_{Ass} \times [A] + k_{Diss} \times (t-t_0)]}) \quad \text{Gleichung (16)}$$

Beim Spülen des belegten Sensors nach der erfolgten Bindung mit Puffer, bei dem nur die Dissoziation der Bindung erfolgt, kann die Dissoziationsratenkonstante k_{Diss} aus der Anpassung der Frequenzänderung an Gleichung (18) ermittelt werden. Mit Hilfe der Dissoziationskonstanten wird dann die Frequenzänderung während des Bindens von Analyt an den Sensor an Gleichung (16) angepasst und daraus die Assoziationsratenkonstante k_{Ass} errechnet. Mit Hilfe von

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}} \quad \text{Gleichung (19)}$$

kann dann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ermittelt werden. Abbildung 28 verdeutlicht am Beispiel der Bindung von Anti-Cathepsin B-Antikörper an Cathepsin B-beschichtete Sensoren die Vorgehensweise der Bestimmung der Bindungskonstanten.

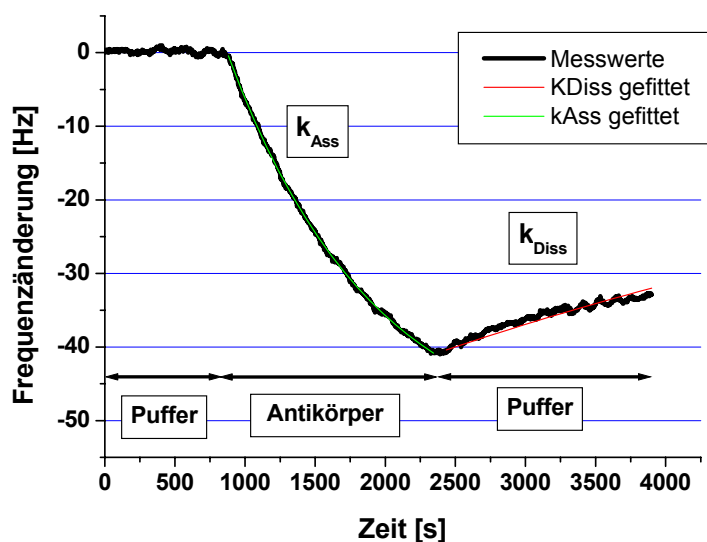


Abbildung 28: Frequenz vs. Zeit Diagramm der Bindung von monoklonalem Anti-Cathepsin B-Antikörper (1 $\mu\text{g/ml}$) an immobilisiertes Cathepsin B

Auf diese Art wurden vier unabhängige Bestimmungen der Bindungskonstanten k_{Ass} und k_{Diss} für den monoklonalen Anti-Cathepsin B-Antikörper vorgenommen und daraus K_D errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle wiedergegeben.

k_{Diss}	k_{Ass}	K_D
$0,00011 \pm 0,00003 \text{ s}^{-1}$	$137720 \pm 11866 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$	$8,17 \times 10^{-10} \pm 2,88 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$

Tabelle 11: Ermittelte Bindungskonstanten für die Bindung von monoklonalem Antikörper gegen humanes Cathepsin B an humanes Cathepsin b

Die errechnete Bindungskonstante K_D liegt mit $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ in dem Bereich, der für eine feste Antikörperbindung erwartet wird. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, wie mit einfachem experimentellem und geringem zeitlichem Aufwand Bindungskonstanten von Antikörpern ermittelt werden können. Im Vergleich zu den herkömmlichen ELISA-Methoden liefert diese Methode darüber hinaus noch Erkenntnisse zum Verlauf der Bindungsassoziation und -dissoziation.

Analog wurde auch das Bindungsverhalten des polyklonalen Anti-HSA-Antikörpers untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle zusammengefasst.

k_{Diss}	k_{Ass}	K_D
$0,000016 \pm 0,000012 \text{ s}^{-1}$	$40652 \pm 10141 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$	$4,76 \times 10^{-10} \pm 4,74 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$

Tabelle 12: *Ermittelte Bindungskonstanten für die Bindung von polyklonalem Anti-HSA-Antikörper an HSA*

Da es sich hier um ein Gemisch aus vielen Antikörpern mit jeweils unterschiedlichen Bindungseigenschaften für das Antigen handelt, werden im Vergleich zum vorherigen monoklonalen Antikörper größere Standardabweichungen gefunden. Die Angabe einer Bindungskonstante für einen polyklonalen Antikörper ist daher auch nicht sinnvoll, vielmehr kann man bestenfalls einen Bereich angeben, in dem der Grossteil der Bindungskonstanten der einzelnen Antikörper liegt.

Aber nicht nur die Bestimmung der Bindungskonstanten von Antikörpern ist möglich, die quantitative Auswertung kann prinzipiell für jede gemessene Frequenzänderung unter Flussbedingungen angewendet werden. Auch das System Avidin-Biotin wurde so analysiert. Aus der Literatur sind sehr genaue Daten zur Bindungskinetik der Avidin Biotinbindung bekannt¹⁷⁶. Tabelle 13 gibt die ermittelten Bindungskonstanten wieder.

k_{Diss}	k_{Ass}	K_D
$0,00032 \pm 0,00039 \text{ s}^{-1}$	$217318 \pm 83120 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$	$1,49 \times 10^{-10} \pm 0,57 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$

Tabelle 13: *Ermittelte Bindungskonstanten für die Avidin-Biotin-Bindung*

Die von uns ermittelte Bindungskonstante von etwa 10^{-10} M ist um fünf Zehnerpotenzen kleiner als die Angaben in der Literatur (10^{-15} M) [176]. Allerdings wurde dieser Wert mit gelösten Molekülen bestimmt, während in den hier durchgeführten Experimenten das Biotin an einer Oberfläche fixiert ist. In detaillierten Studien konnte am (Strept-)Avidin-Biotin-System gezeigt werden, dass teilweise erhebliche Unterschiede zwischen Bindungen in Lösung und an Oberflächen gefunden werden [185, 186, 187]. Dabei hängen die Ergebnisse entscheidend von der Oberflächenstruktur und der Ligandenverteilung und -zugänglichkeit ab. So wurde für Oberflächen-fixierte LB-Filme von Biotinlipiden eine größere Bindungskonstante für Biotinderivate mit Spacer zwischen Lipidanker und Biotinkopf ($\sim 0,2$ bis $3,7 \times 10^{-11}$ M) als ohne Spacer gefunden ($\sim 0,1$ bis $8,6 \times 10^{-10}$ M) [185]. Die von uns ermittelte Bindungskonstante aus den QCM-Versuchen liegt in derselben Größenordnung.

Niedrigere Bindungskonstanten für immobilisierte Rezeptoren im Vergleich zu Werten in homogener Lösung wurden auch für das System Carboanhydrase und Benzolsulfonamid-Schichten berichtet [188].

Für die Unterschiede zwischen den ermittelten Bindungskonstanten in Lösung und oberflächenfixierten Bindungspartnern gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits muss angeführt werden, dass die Oberfläche oft nicht exakt charakterisiert werden kann. Es können nicht statistisch verteilte Bindungsstellen, sog. Cluster auftreten. Ebenso ist die Orientierung der Bindungsstellen oftmals undefiniert, d.h. es können leicht bzw. weniger leicht zugängliche Areale vorkommen. Ein weiterer Punkt ist die entropische Behinderung des Bindungsvorganges eines gelösten Analyten an einen Oberflächen-fixierten Rezeptor. Ebenso muss mit unspezifischen Wechselwirkungen gerechnet werden, die parallel zu den spezifischen Erkennungsprozessen ebenfalls stattfinden. Da sie im Messsignal nicht getrennt werden können, führen sie bei der Auswertung zu kleineren Bindungskonstanten.

Im Gegensatz dazu berichten Towery et al. von identischen Bindungskonstanten der Hybridisierung von DNA in Lösung und an der Oberfläche eines QCM-Sensors [145]. Die DNA wurde über einen Photografting-Prozess auf Polystyren beschichteten Quarzen immobilisiert. Bei der Hybridisierung von DNA handelt es sich um einen supramolekularen Prozess, bei dem nach einer Initialbindung von passenden Basenpaaren eine Kettenreaktion zur vollständigen Hybridisierung führt. Diese nachgeschaltete Kettenreaktion könnte unabhängig davon, ob sie in Lösung oder an einer Oberfläche stattfindet, mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen, wenn sie nicht durch die Immobilisierung behindert wird. Tatsächlich berichten Su und Thompson aber von kleineren Bindungskonstanten, wenn die DNA auf PdO-Oberflächen immobilisiert ist [189]. Auch auf Nitrozellulose fixierte DNA hybridisiert langsamer als in Lösung [190]. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die ermittelten Bindungskonstanten stets kritisch zu interpretieren sind und Unterschiede in der Immobilisierung der Liganden eine große Rolle spielen können.

Die Anwendung der QCM-Technik zur Bestimmung von Bindungskonstanten biologisch relevanter Bindungen ist trotz der oben diskutierten Diskrepanzen zwischen homogenen Systemen in Lösung (3D) und Erkennungsprozessen an Oberflächen (quasi-2D) gerechtfertigt. Die Methode liefert genaue Ergebnisse und detaillierte Aussagen zur Bindungskinetik. Ein Großteil der biologischen Erkennungsprozesse findet in der Natur an Oberflächen statt, beispielhaft seien hier die Zellmembran-ständigen Rezeptoren genannt, die eine Bindung mit in Körperflüssigkeiten gelösten Liganden eingehen. Die QCM-Technik empfindet genau diese Konstellation nach.

5.7. Zelladhäsion

5.7.1. Selektin-vermittelte Zelladhäsion

5.7.1.1. Einleitung

Die Quarzmikrowaagentechnik wurde bisher kaum eingesetzt, um spezifische Wechselwirkungen zwischen Zellen und Oberflächen zu detektieren. Bei den bisherigen Versuchen, die Quarzmikrowaage als massensensitiven Biosensor zur Detektion von zellulären Systemen einzusetzen, standen hauptsächlich adhärente Zellen und deren Wechselwirkungen mit verschiedenen Oberflächen im Mittelpunkt. Dabei kamen jedoch fast ausschließlich statische Versuchsanordnungen zum Einsatz. Nur eine Arbeit von Nivens et al. untersuchte die Biofilmbildung des Bakteriums *Pseudomonas cepacia* an Quarzsensoren unter Flussbedingungen [92].

In unserer Arbeitsgruppe sollte die QCM-Technik zur Quantifizierung von Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen, die durch bestimmte Adhäsionsrezeptoren vermittelt werden, eingesetzt werden. Rezeptoren von besonderem pharmazeutischem Interesse sind die Selektine. Dabei handelt es sich um Lektine, d.h. Zucker-bindende Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle bei der Extravasation von Leukozyten im vaskulären System spielen. Der Übergang von weißen Blutkörperchen aus der Blutbahn in angrenzendes Gewebe ist essentiell für die zelluläre (Immun-)Antwort des Organismus auf Entzündungen aller Art und Genese.

Entsprechend ihres natürlichen Vorkommens werden die Selektine in L-, P- und E-Selektin unterteilt. Die Selektine sind dabei sowohl auf den Leukozyten (L-Selektin) als auch auf den Endothelzellen (E- und P-Selektin) zu finden. Durch ihre Wechselwirkung mit zuckerhaltigen Liganden, wie zum Beispiel PSGL-1, ELAM-1 und GlyCAM-1, werden Leukozyten aus dem Blutstrom durch ein Rollen entlang der Blutgefäße verlangsamt. Eine von allen drei Selektinen gleichermaßen erkannte Bindungsstruktur stellt das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X dar. Die Verlangsamung der Leukozyten ist essentiell, um ein nachfolgendes festes Anhaften durch Integrine zu ermöglichen, die dann ihrerseits den Durchtritt der adhären Leukozyten in das subendotheliale Gewebe vermitteln.

Bisherige Untersuchungen zur Selektin-vermittelten Zelladhäsion verwenden meist mikroskopische Techniken. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Flusskammersystem entwickelt, mit dem die dynamische Zelladhäsion mikroskopisch verfolgt werden kann. Die aus pharmazeutischen Gesichtspunkten angestrebte Hemmung der Selektin-vermittelten Zelladhäsion kann aber bei mikroskopischer Auswertung nur auf ein relativ kleines Blickfeld beschränkt und mit hohem zeitlichem Aufwand ausgewertet werden. Ziel war es deshalb, mit Hilfe der Quarzmikrowaage einen größeren Bereich in kürzerer Zeit quantifizieren zu können.

Die Anwendung der Quarzmikrowaage unter den für die Selektin-Bindung wichtigen Scherstrombedingungen kann durch die von uns entwickelte Flusskammer leicht verwirklicht werden.

5.7.1.2. Selektin-vermittelte Adhäsion von U937-Zellen

Zur Untersuchung Selektin-vermittelter Zelladhäsion wurden verschiedene Zelllinien ausgewählt. In einem ersten Ansatz sollte die P-Selektin-vermittelte Adhäsion von U937-Zellen an Oberflächen untersucht werden. U937-Zellen sind humane, myeloide, d.h. Monozyten-ähnliche Zellen, die konstitutiv den P-Selektin-Liganden PSGL-1 tragen.

Die Quarzsensoren wurden kovalent mit einer P-Selektin-Chimäre beschichtet. Zur Unterdrückung unspezifischer Zelladhäsion wurde der Beschichtungslösung 0,5 % BSA beigemischt. Diese Konzentration an unspezifischem Eiweiß wurde während der Entwicklung des Rollkammersystems am Mikroskop als optimal ermittelt [191].

Bindungsassay unter Flussbedingungen

Zuerst sollte die optimale Konzentration des P-Selektins ermittelt werden. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Dabei wurde die Frequenzabnahme bei der Wechselwirkung mit U937-Zellen (jeweils $4,5 \times 10^6$ Zellen) aus dem Fluss heraus gemessen, d.h. die Zellen wurden in den strömenden Puffer injiziert und ohne Unterbrechung des Scherstromes über die Quarzoberfläche gespült. Tabelle 14 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder.

Menge P-Selektin in 0,5 % BSA je Quarz	Frequenzänderung
0	-16 ± 8 Hz
0,3 μ g	-19 ± 9 Hz
0,6 μ g	-6 ± 20 Hz
1,5 μ g	-15 ± 12 Hz
3 μ g	-45 ± 19 Hz

Tabelle 14: Frequenzänderung in Abhängigkeit der P-Selektin-Menge von $4,5 \times 10^6$ U937-Zellen

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass trotz der Verwendung von 0,5 % BSA zur Unterdrückung unspezifischer Adhäsionen eine Frequenzabnahme von 10 bis 20 Hz detektiert wurde, die auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Dadurch gelingt es für kleine P-Selektin-Konzentrationen nicht, spezifische, Selektin-vermittelte Zelladhäsion von unspezifischen Wechselwirkungen zu unterscheiden. Zum Nachweis einer Zelladhäsion wurden die U937-Zellen zuvor mit Calcein-AM angefärbt und mit einem Stereo-

Fluoreszenzmikroskop die Oberfläche der Quarze nach dem Experiment untersucht. Die Transparenz der Kammerdeckel reichte dabei aus, um die Quarze ohne Ausbau aus der Flusszelle zu beobachten. Abbildung 29 zeigt die mikroskopischen Bilder.



Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Quarzoberfläche nach der Adhäsion von Calcein-AM-gefärbten U937-Zellen an einer 0,5% BSA-Schicht (links) und 3 μg P-Selektin / 0,5 % BSA-Schicht (rechts). Die hellen Punkte sind adhärierte U937-Zellen. (Vergrößerung 10x)

Die visuelle Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen zeigt nur eine sehr geringe Adhäsion von lebenden Zellen an einer reinen BSA-Schicht. Daher stellt sich die Frage nach dem Ursprung der beobachteten Frequenzabnahme von etwa 10 bis 20 Hz. In einem Kontrollexperiment ohne Zellen konnte gezeigt werden, dass die unspezifische Adhäsion durch Bestandteile des Kulturmediums hervorgerufen wird. Das Zellkulturmedium besteht zu 10 % aus fötalem Kälberserum (FKS). Die darin enthaltenen Proteine scheinen für die Masseanlagerung verantwortlich zu sein. Deshalb wurde in allen weiteren Untersuchungen nur PBS als Puffer verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte bei einer Belegung mit 3 μg P-Selektin auch eine wesentlich höhere Frequenzabnahme von $208 \text{ Hz} \pm 168 \text{ Hz}$ festgestellt werden. Wir postulieren, dass Bestandteile des Nährmediums durch ihre unspezifische Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche Bindungsstellen des P-Selektins blockieren. Eine verstärkte Zelladhäsion bei der Verwendung von PBS wurde aber nur bei der höchsten getesteten P-Selektin-Konzentration beobachtet, während bei den kleineren Konzentrationen keine signifikanten Änderungen gesehen werden konnten. Der Ursprung dieser erhöhten Frequenzantwort auf die Adhäsion von U937 Zellen in Abwesenheit serumhaltiger Medien konnte nicht genauer geklärt werden. In einer Arbeit von Richert et al. wird aber ebenfalls eine stärkere Wechselwirkung von Zellen mit Polyelektrolyt-Schichten in Abwesenheit von Serum berichtet [33]. Sie stellten einen nivellierenden Effekt von Serum auf die Wechselwirkungen von Zellen mit geladenen Schichten fest. Da auch die P-Selektin-Bindung zum großen Teil durch elektrostatische Wechselwirkungen verwirklicht wird, könnte die zu

geringe Frequenzänderung durch eine Abschirmung der P-Selektin-Bindungsstellen durch Serumproteine erklärt werden.

Um eine mögliche Blockade der P-Selektin-Kopplung an die Quarzoberfläche durch BSA auszuschließen, wurde eine reine P-Selektin-Schicht auf den Quarz gebracht. Diese zeigte die gleiche Frequenzabnahme im Verlauf der Zelladhäsionen wie die P-Selektin-BSA-Mischung.

Zum Vergleich wurde im etablierten Flusskammersystem durch videomikroskopische Beobachtungen die P-Selektin-vermittelte Rollbewegung von U937 Zellen aufgezeichnet. Dabei konnte die Rollbewegung der Zellen verfolgt und deren Geschwindigkeit analysiert werden. Im Flusskammersystem wurde eine Konzentration von 300 ng P-Selektin-Chimäre in 0,5 % BSA verwendet. Bei dieser Konzentration ist der Großteil der Zellen nicht fest adhärirt, sondern rollt entlang der P-Selektin-Schicht. Da im QCM-Testsystem bei diesen geringen P-Selektin-Konzentrationen keine spezifische Frequenzabnahme detektiert werden konnte, vermuten wir, dass auch hier die Zellen in eine rollende Bewegung versetzt werden und so nur kurzzeitig mit der Sensoroberfläche in Wechselwirkung treten. Dies könnte eine Erklärung der geringen Frequenzabnahmen liefern, denn bedingt durch die Messelektronik kann nur ein Messwert pro Sekunde erfasst werden. Da sich aber die Zellen mit Geschwindigkeiten von etwa 2 $\mu\text{m/s}$ bewegen, wird eine wesentlich geringere Masseanlagerung bedingt durch den ständigen Wechsel zwischen Bindungsbildung und -lösung gemessen. Bei der höheren P-Selektin-Konzentration (3 $\mu\text{g/Ansatz}$) geht die Rollbewegung vermehrt in eine feste Zelladhäsion über. Dies konnten wir bei der mikroskopischen Inspektion bereits früher feststellen [191]. Im QCM-Assay wird deshalb erst bei der höchsten P-Selektin-Konzentration eine Masseanlagerung in Form einer deutlichen Frequenzänderung detektiert. Diese wird sehr schnell erreicht und auch durch lang andauerndes Spülen kaum verändert. Dies deutet daraufhin, dass die Zellen fest adhärieren und nicht mehr von der massensensitiven Oberfläche des Quarzes „herunter rollen“. Um zu testen, ob die niedrigen Frequenzabnahmen bei den kleineren P-Selektin-Konzentrationen durch „rollende Zellen“ verursacht werden, wurden Bindungsstudien unter statischen Bedingungen mit U937 Zellen durchgeführt.

Bindungsassay unter statischen Bedingungen

Im statischen Versuchsaufbau wurden wiederum jeweils $4,5 \times 10^6$ U937-Zellen in die Messzellen eingespritzt. Tabelle 15 gibt die gefundenen Messergebnisse wieder.

Menge P-Selektin in 0,5 % BSA je Quarz	Frequenzänderung
0 μg	-54 Hz \pm 19 Hz
0,3 μg	-38 Hz \pm 8 Hz
3 μg	-38 Hz \pm 6 Hz

Tabelle 15: Frequenzänderung durch Zelladhäsion von U937-Zellen im statischen Versuch bei unterschiedlichen P-Selektin-Konzentrationen

Entgegen unserer Annahme konnte im statischen Versuch keine Erhöhung des Messsignals mit steigender P-Selektin-Konzentration gefunden werden. Es wurde eine größere Frequenzabnahme bei unspezifischer Sensorbelegung mit reinem BSA ersichtlich. Somit konnte auch im statischen Versuch keine P-Selektin-spezifische Zelladhäsion nachgewiesen werden. Da es sich bei U937-Zellen nicht um fest anwachsende, d.h. adhärenente Zellen handelt, wird die unspezifische Zelladhäsion wahrscheinlich nur durch das schwerkraftbedingte Absinken der Zellen auf die Sensoroberfläche bedingt hervorgerufen. Zusätzlich können die Zellen Stoffe sezernieren, die dann Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche eingehen. Fredriksson et al. finden z.B. für CHO-Zellen ebenfalls eine geringe Frequenzabnahme bereits vor dem Aufspreiten und festem Anwachsen an Polystyren [113]. Durch Spülen des Quarzes mit Puffer konnten wir interessanterweise keine Frequenzerhöhung erreichen, d.h. es wurde kein Material von der Quarzoberfläche abgespült. Da jedoch die mikroskopische Paralleluntersuchung zeigt, dass die Zellen auf einer BSA-Schicht nicht adhären und wieder abgespült werden können, liegt die Vermutung nahe, dass die vom Quarzsensor gemessene Frequenzänderung nicht durch die Zellen an sich sondern durch abgeschiedene Stoffe verursacht wurde, die auch nach dem Spülen an der Oberfläche des Quarzes verbleiben.

Um die störende unspezifische Sensorantwort weiter zu minimieren, wurde auch eine Beschichtung mit einem Amino-Polyethylenglykol (2000) getestet. Die flexiblen, hydrophilen Ketten des PEG sollen theoretisch einer Zell- und Proteinadhäsion entgegenwirken. Jedoch zeigte sich in unseren Versuchen eine noch größere Frequenzabnahme von -86 Hz \pm 23 Hz, so dass auch mit PEG-beschichteten Quarzen keine geringere unspezifische Frequenzabnahme erzielt werden konnte.

Dass durch den Einsatz von BSA bzw. PEG-Derivaten aber ein Großteil der unspezifischen Wechselwirkungen unterdrückt werden kann, zeigt der Vergleich mit einer Mercaptohexadecansäure-Schicht. Hier finden wir eine Frequenzabnahme von 194 Hz. In

Abbildung 30 ist das Ausmaß der unspezifischen Adhäsion anhand der Frequenzverläufe für BSA, PEG- und Mercaptohexadecansäure-Schichten dargestellt.

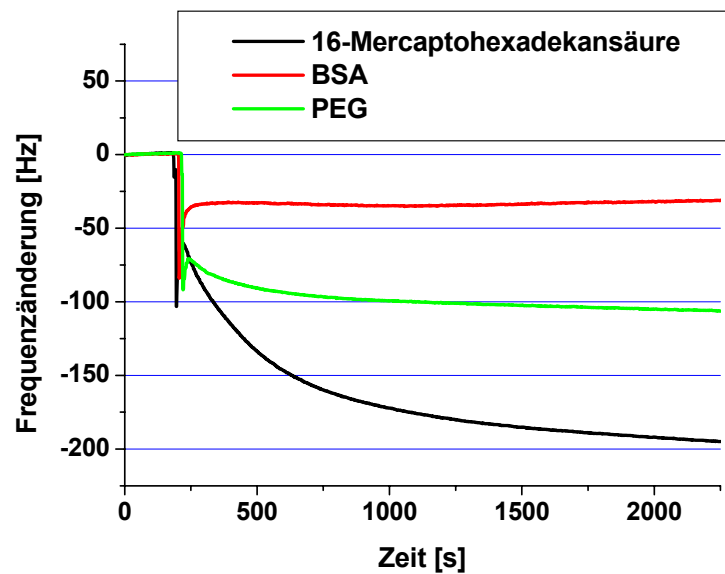


Abbildung 30: Frequenzverlauf bei der Adhäsion von $4,5 \times 10^6$ U937-Zellen auf 16-Mercaptohexadecansäure, BSA und Bisamino-PEG-2000 beschichteten Quarzsensoren

In weiteren Untersuchungen sollte die L-Selektin-vermittelte Zelladhäsion untersucht werden. Es wurden wiederum U937-Zellen verwendet, da PSGL-1 auch ein Ligand für L-Selektin darstellt. Aus Untersuchungen mit dem Flusskammersystem war bereits bekannt, dass die L-Selektin-Bindung von U937-Zellen schwächer ist, als die P-Selektin-Wechselwirkung. Dies wirkt sich im Rollkammertestsystem dadurch aus, dass die Zellen erst bei höherer L-Selektin-Konzentration und dann mit größerer Geschwindigkeit rollen [192]. Im Versuch mit U937-Zellen auf L-Selektin-beschichteten Quarzen wurde eine Konzentration von $6,4 \mu\text{g}$ L-Selektin-Chimäre pro Quarz in 0,5 % BSA verwendet. Abbildung 31 zeigt die Zeitabhängigkeit der Frequenzänderung für P- und L-Selektin-beschichtete Quarze.

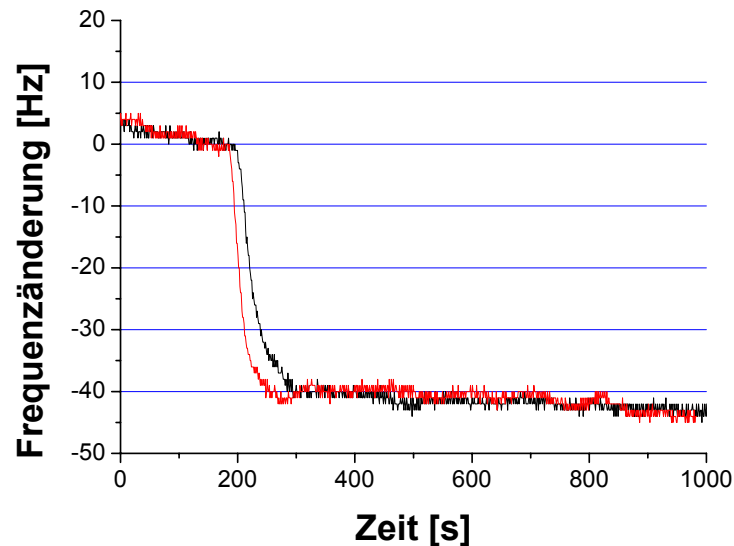


Abbildung 31: Frequenzverlauf bei der Adhäsion von $4,5 \times 10^6$ U937-Zellen auf P-Selektin (schwarz) und L-Selektin (rot) beschichteten Quarzsensoren

Wie aus der graphischen Darstellung zu erkennen ist, findet sich in der Gegenwart von Kulturmedium kein Unterschied in der Frequenzantwort des Sensors zwischen beiden Selektinen. Da die Konzentrationsbereiche für beide Selektine so hoch gewählt wurden, dass mit einer festen Adhäsion der Zellen zu rechnen ist, zeigt das Ergebnis, dass sowohl mit L- als auch P-Selektin die gleiche Frequenzabnahme erzielt wird.

5.7.1.3. Selektin vermittelte Adhäsion von KG1A-Zellen

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse mit U937-Zellen wurden KG1A-Zellen für die Untersuchung der P-Selektin-vermittelten Zelladhäsion benutzt. KG1A-Zellen sind humane, promyeloide Zellen, die ebenso wie U937-Zellen konstitutiv PSGL-1, jedoch in höheren Konzentrationen exprimieren [193]. Dadurch erhofften wir uns eine bessere Detektierbarkeit bei der Selektin-vermittelten Zelladhäsion. Die KG1A-Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Tauber in Berlin zur Verfügung gestellt. Doch auch bei der Adhäsion von KG1A-Zellen an einer P-Selektin-Schicht wurde eine Frequenzabnahme im Bereich der U937-Zellen gefunden. Die Frequenzabnahme für KG1A-Zellen betrug $34 \text{ Hz} \pm 7 \text{ Hz}$. Die unterschiedliche Frequenzantwort für unterschiedliche Zelltypen wurde bereits für adhärenzte MDCK-Zellen beschrieben [115]. Unterschiedliche Zelllinien zeigen dabei zelltypische Unterschiede in der Frequenzantwort, selbst bei „identischer“, d.h. konfluenter Bedeckung des Quarzsensors. Die in unserem Testsystem detektierten Frequenzabnahmen von 34 Hz für KG1A-Zellen und von 204 Hz für U937-Zellen unterscheiden sich erheblich. Erwartet wurde jedoch aufgrund des höheren

Ligandenbesatzes mit PSGL-1 eine größere Frequenzabnahme für KG1A-Zellen. Genauere Aussagen über die Herkunft dieses Unterschiedes können anhand der experimentellen Befunde nicht gemacht werden. Die unspezifische Adhäsion an einer BSA-Schicht ist bei beiden Zelllinien gleich groß (-15 Hz für KG1A und -16 Hz für U937-Zellen). Daraus lässt sich nicht direkt ableiten, dass sich beide Zelllinien stark in frequenzrelevanten Eigenschaften wie zum Beispiel dem viskoelastischen Verhalten unterscheiden. Die Differenz in der Frequenzabnahme bei der spezifischen, P-Selektin-vermittelten Adhäsion deutet aber auf unterschiedliche Zellcharakteristika hin, da die Versuchsbedingungen für beide Zelllinien identisch gewählt wurden.

5.7.1.4. E-Selektin vermittelte Adhäsion von E-CHO-Zellen

In einem weiteren Ansatz sollte die E-Selektin-vermittelte Zelladhäsion mit der Quarzmikrowaage untersucht werden. Dazu wurden chinesische Hamsterovalialzellen (E-CHO-Zellen) verwendet, die durch Gentransfektion zur Expressierung von E-Selektin befähigt sind. Als Ligand fungiert das Tetrasaccharid Sialyl Lewis X, welches über Ethylenoxid-Spacer an einen Lipidanker gekoppelt ist. Der Lipidanker ermöglicht es, den Liganden in Langmuir-Monofilme von Lipiden an Wasser-Luft-Grenzflächen einzubauen. Diese Filme können dann per Langmuir-Blodgett-Technik auf hydrophobisierte Quarze übertragen werden. Diese so genannten LB-Filme sind gut charakterisiert und das Rollverhalten von E-CHO-Zellen wurde im mikroskopischen Rollkammersystem untersucht [177].

Zur Untersuchung in den QCM-Experimenten wurde ein Hexaethylenoxid-gespacertes sLe^x mit Ceramidanker benutzt, welches die interne Bezeichnung GG126 trägt. Der Konzentrationsbereich, in dem E-CHO-Zellen rollen, beträgt für diesen Liganden 0,0025 bis 0,05 mol% in einer DSPC-Matrix. Zur Untersuchung einer festen E-Selektin vermittelten Zelladhäsion wurde eine Konzentration von 0,1 mol% GG126 in einer DSPC-Matrix gewählt. Da in den vorangegangenen Experimente ein störender Einfluss vom serumhaltigen Medium auf die Sensorantwort erkannt wurde, kam nur PBS-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} Zusatz zum Einsatz.

Die Adhäsion von E-CHO-Zellen an die quarzfixierte Ligandenschicht zeigte die in der Tabelle dargestellten Frequenzänderungen.

Konzentration des sLe ^x -Liganden in DSPC-Matrix	Frequenzänderung
0 mol%	-46 Hz ± 4 Hz
0,1 mol%	-55 Hz ± 46 Hz

Tabelle 16: *Frequenzänderung durch Zelladhäsion von E-CHO-Zellen bei unterschiedlichen sLe^x-Konzentrationen*

Es fällt wiederum eine hohe unspezifische Frequenzabnahme bei einer reinen DSPC-Schicht von 46 Hz auf. Dieser Messwert steht im Gegensatz zu den mikroskopischen Befunden des Rollkammersystems, wo keine Zelladhäsion von E-CHO-Zellen an einer DSPC-Schicht nachgewiesen werden konnte. Die Ursache der hohen unspezifischen Frequenzabnahme kann an der Adsorption von extrazellulären Matrixbestandteilen liegen. E-CHO-Zellen sind adhärenente Zellen. Sie scheiden bestimmte Substanzen, die so genannte extrazelluläre Matrix, aus, die eine feste Zelladhäsion an einer Vielzahl von Oberflächen vermitteln. Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer ganzen Reihe von Substanzen, zum Beispiel fibrillären Proteinen wie Kollagen und Elastin, sowie Proteoglykanen. Diese Substanzen verursachen bei der Adhäsion an der Sensoroberfläche aufgrund ihrer Masse eine Frequenzabnahme. Die Abscheidung der extrazellulären Matrix verläuft stetig. Daher kann eine Adhäsion von extrazellulären Matrixbestandteilen auch ohne Zelladhäsion erfolgen. Es reicht aus, dass die Zellen über den Quarz gespült werden. Die im Puffer befindlichen extrazellulären Bestandteile können am Sensor anhaften, während die Zellen bedingt durch ihre Größe mit dem Fluss abgespült werden. Die Zeitspanne eines Versuches beträgt dabei nicht mehr als eine Stunde. In dieser Zeit ist nicht mit dem festen Anwachsen von Zellen zu rechnen.

Die spezifische Zelladhäsion an einer 0,1 %igen sLe^x-DSPC-Schicht verursacht nur eine geringfügig höhere Frequenzabnahme von 55 Hz. Dabei wurden jedoch starke Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten beobachtet, so dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Frequenzänderungen für die Ligand-haltigen und Ligand-freien Schichten ergibt. Die Größenordnung der Frequenzabnahme liegt jedoch mit 55 Hz im selben Bereich wie bei den Untersuchungen mit U937- und KG1A-Zellen auf einer P- oder L-Selektin-Schicht.

5.7.1.5. Leukozytenadhäsion an einer sLe^x-haltigen Modellmembran

Als eine vierte Zellart wurden humane Leukozyten verwendet und deren Adhäsion an einer sLe^x-haltigen Modellmembran untersucht. Dazu wurde 1 mol% GG126 in eine DSPC-Matrix eingelagert und per Langmuir-Blodgett-Technik auf hydrophobisierte Quarze

übertragen. Humane Leukozyten präsentieren L-Selektin konstitutiv an ihrer Zellmembran und sollten daher befähigt sein, an eine sLe^x-Membran zu binden. Tabelle 17 gibt die Ergebnisse für die Adhäsion von Leukozyten wieder.

Oberfläche	Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Verhältnis
Oktadekanthiol	-713 Hz	3821 Hz	-6,2
DSPC-LB-Film	-387 Hz	2340 Hz	-6,4
DSPC-LB-Film mit 1 mol% sLe ^x -Ligand	-114 Hz ± 48 Hz	804 Hz ± 544 Hz	-6,0 ± 0,3

Tabelle 17: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis durch Zelladhäsion von humanen Leukozyten an unterschiedlichen Oberflächen

Die Messergebnisse verdeutlichen, dass eine spezifische Adhäsion von humanen Leukozyten an einer sLe^x-haltigen Modellmembran nicht detektiert werden konnten. Die unspezifische Frequenzänderung von -387 Hz für eine reine DSPC-Schicht ist dreimal so groß wie die Frequenzänderung für die 1 mol% sLe^x-DSPC-Schicht. Noch größer ist die Adhäsion von Leukozyten an einer Oktadekanthiol-Schicht. Hier werden -713 Hz Frequenzabnahme und 3821 Hz Dämpfungsänderung gemessen. Das D/F-Verhältnis liegt bei -6,2. Durch die DSPC-Schicht wird also schon ein Großteil der unspezifischen Zelladhäsion zurückgedrängt.

Diese Messergebnisse deuten darauf hin, dass an einer DSPC-Schicht mehr Leukozyten adhäreren als an einer mit sLe^x-Ligand dotierten DSPC-Schicht. Ebenso die Dämpfungsänderung deutet auf eine geringere Adhäsion von Zellen an der sLe^x-Membran hin. Das nahezu gleiche Verhältnis von Dämpfungs- zu Frequenzänderung liegt für beide Schichten bei etwa 6. Dieser sehr hohe Wert verdeutlicht die starke Dämpfung der Quarzoszillation.

Zellen weisen naturgemäß eine große Elastizität auf. Beim Anhaften auf der Sensoroberfläche wird daher nicht nur der Masseffekt der Zellen sondern in erheblichem Ausmaß auch der viskoelastische Effekt zur Beeinflussung des Schwingungsverhaltens der Quarze beitragen. Hinzu kommt, dass bei der Adhäsion von Leukozyten mit einem Durchmesser von 5 bis 15 µm nur ein Bruchteil der gesamten Zellmasse durch den Quarzsensor erfasst werden kann. Bedingt durch die Dämpfung in flüssigen Medien dringt die senkrecht zur Quarzoberfläche erzeugte akustische Welle nur etwa 200 nm in das umliegende Medium ein. Bereiche, die weiter von der Sensoroberfläche entfernt sind, beeinflussen das Schwingungsverhalten des Sensors nicht mehr. Betrachtet man nun adhärerte Zellen, so wird

deutlich, dass nur noch eine geringe Masseanlagerung an der Sensoroberfläche detektiert werden kann, wie die folgende, vereinfachte Abbildung verdeutlicht.

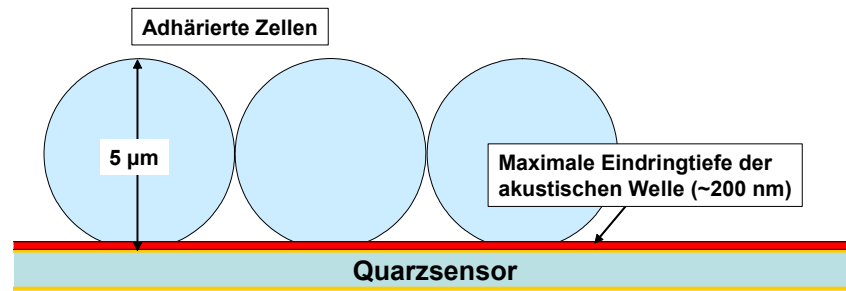


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Eindringtiefe der akustischen Welle im Verhältnis zu adhärenierten Zellen

Der Sensor erkennt also nur eine geringe Masseanlagerung, anhand des D/F-Verhältnisses wird aber deutlich, dass diese geringe Masse eine starke Dämpfung hervorruft, d.h. die viskoelastische Beeinflussung der Schwingung ist im Verhältnis zur Masse sehr groß.

Zur Kontrolle wurden mikroskopische Aufnahmen der Zelladsorbate nach den QCM-Experimenten gemacht. Dazu wurden die Quarze ausgebaut und an einem inversen Laser scanning Mikroskop untersucht. Da die Quarze jedoch durch die Goldelektrodenbelegung nicht mehr lichtdurchlässig waren, wurde mit Laserlicht (543 nm) ein Reflexionsbild der Goldelektrode aufgenommen, welches allerdings nur einen repräsentativen Ausschnitt von 236 x 236 µm wiedergibt.

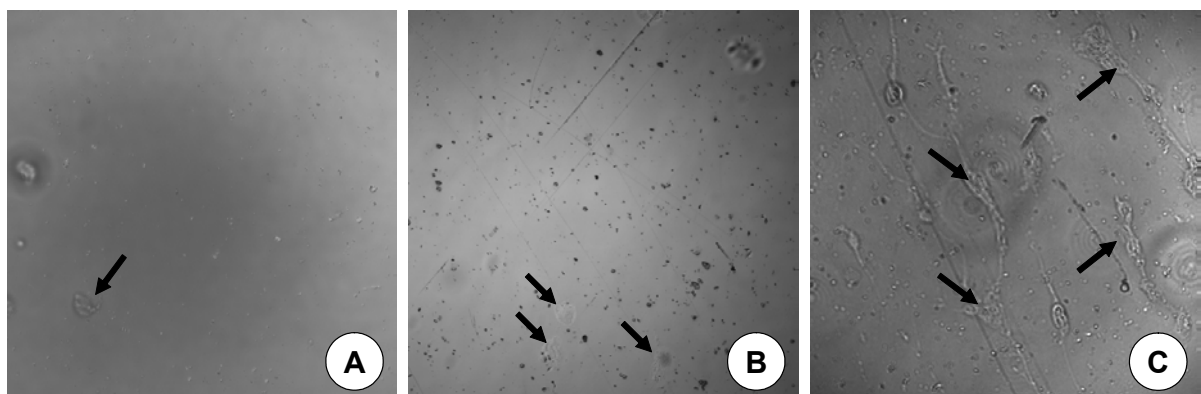


Abbildung 33: Mikroskopische Aufnahmen der Leukozyten A: 1 mol% GG126-DSPC-Membran; B: DSPC-Membran; C: Oktadekanthiol-Schicht. Die Pfeile markieren adhärenierte Leukozyten

Es wird vor allem eine starke Adhäsion von Leukozyten an der Oktadekanthiol-Schicht deutlich. Die Leukozyten belegen eine große Fläche des Sensors und bilden zusammenhängende Zellaggregate. Es ist eine deutliche Abflachung der Zellen erkennbar. Bei sowohl der DSPC und der Ligand-haltigen DSPC-Membran können dagegen eher kugelig

adhärierte Zellen beobachtet werden. Diese Abflachung ist mit verantwortlich für die hohe Frequenzabnahme, wie im folgenden Bild verdeutlicht wird.

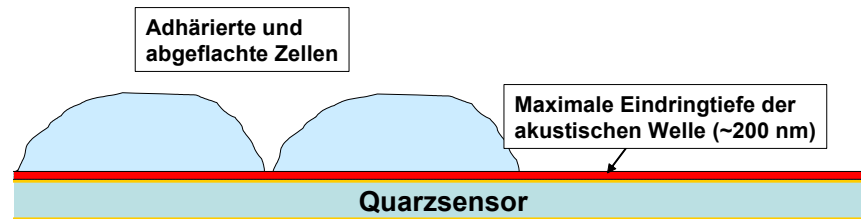


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Eindringtiefe der akustischen Welle im Verhältnis zu adhären und abgeflachten Zellen

Durch diese Annäherung der Zellmasse an den Sensor wird von diesem eine größere Frequenzänderung detektiert. Tatsächlich ist aber nicht mehr Masse auf dem Sensor abgelagert worden.

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse kann die Aussagekraft des D/F-Verhältnisses gezeigt werden. Es gibt die Dämpfungsänderung in Hz pro Frequenzänderung in Hz an. Bei einer unvollständigen Sensorbelegung, zum Beispiel für vereinzelte, adhären Zellen oder nicht durch den Sensor erfasste Massen, wie im Falle der kugelig adhären Zellen, kann das D/F-Verhältnis herangezogen werden, um die Art der Masseanlagerung zu vergleichen. Im Falle der Leukozytenadhäsion kann so gezeigt werden, dass jede angelagerte Masse, als Frequenzänderung erfasst, die gleiche Dämpfungsänderung hervorruft. Beim Vergleich der Absolutdaten ist diese Aussage schwerlich möglich. Als Kernaussage kann festgehalten werden, dass gleiche D/F-Quotienten nur von gleichartigen Masseanlagerungen hervorgerufen werden. So kann also davon ausgegangen werden, dass bei allen drei Schichten eine Zelladhäsion stattfindet und diese Zelladhäsion für die Frequenz und Dämpfungsänderung verantwortlich ist. In einer Arbeit von Rodahl et al. wird ein Überblick über D/F-Quotienten für verschiedene Adsorbatschichten gegeben [194]. Die angegebenen Daten beziehen sich jedoch auf das Q-Sense-System und können daher nicht direkt zum Vergleich der mit dem ifak-System ermittelten Daten herangezogen werden, liefern aber tendenziell gute Anhaltspunkte.

5.7.2. Zusammenfassung

Die Quarzmikrowaage wurde erstmals zur Detektion von spezifischen, rezeptorvermittelten Zell-Substrat-Wechselwirkungen herangezogen. Als spezifische Zelladhäsionsmoleküle wurde die Gruppe der Selektine und deren Wechselwirkung mit Zellen untersucht. Dabei konnte auf Erfahrungen aus einem gut etablierten Flusskammersystem zurückgegriffen werden. In der Literatur wurde die QCM-Technik bisher

nur zur Untersuchung von fest anwachsenden, adhärenen Zellen bei der Bildung einer konfluenten Zellschicht oder eines Biofilms aus Bakterien beschrieben.

Es gelang, die P- und L-Selektin-vermittelte Adhäsion von U937-Zellen sowie die Wechselwirkung von KG1A-Zellen mit P-Selektin modifizierten Oberflächen unter Flussbedingungen zu detektieren. Die Frequenzänderungen zeigten jedoch nur einen geringen Unterschied zu unspezifischen Frequenzänderungen, wie sie bei der Wechselwirkung der Zellen mit einer inerten Rinderserumalbumin-Oberfläche festgestellt wurden. Versuche, die unspezifische Frequenzabnahme zu minimieren blieben wenig erfolgreich. Unter statischen Bedingungen wurden noch höhere unspezifische Frequenzabnahmen beobachtet. Daher war die Anwendung einer Flusskammer zur Detektion der spezifischen P- und L-Selektin vermittelten Wechselwirkungen essentiell.

Das hohe unspezifische Sensorsignal verhinderte auch den Nachweis der E-Selektin-vermittelten Zelladhäsion von E-CHO-Zellen an sLe^x-haltigen Modellmembranen. Obwohl durch mikroskopische Untersuchungen gezeigt wurde, dass es zu keiner Zelladhäsion von E-CHO-Zellen auf einer DSPC-Membran kommt, wurde eine gleich hohe Frequenzabnahme für die sLe^x-Ligand-haltige Membran gefunden.

Bei der Adhäsion von humanen Leukozyten an einer Modellmembran konnte ebenfalls keine Erhöhung der Frequenzabnahme durch eine spezifische Wechselwirkung von L-Selektin und sLe^x-haltiger Bilayer gefunden werden.

Durch die durchgeführten Untersuchungen zur Selektin-vermittelten Zelladhäsion wird deutlich, dass die QCM-Technik nur bedingt zur Untersuchung solcher Phänomene einsetzbar ist. Die Detektion einer festen Zelladhäsion, die durch stärkere Zell-Matrix-Wechselwirkungen, zum Beispiel durch Integrine, vermittelt wird, ist dagegen gut möglich, wie anhand zahlreicher Publikationen gezeigt wurde. Wir vermuten, dass das komplexe Verhalten von Zellen, besonders im Hinblick auf dessen Einflüsse auf das Schwingungsverhalten, die Detektion der relativ schwachen Selektin-Bindungen unmöglich macht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Selektin-Bindung nur einen kleinen Teil der Antwort der Quarzsensoren auf Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen ausmacht. Daher konnte durch den Einsatz der QCM-Technik kein Vorteil gegenüber mikroskopischen Untersuchungen gefunden werden.

5.8. Liposomenadhäsion

5.8.1. Unspezifische Adhäsion von Liposomen an Oberflächen

Um einen tieferen Einblick in die Antwort eines QCM-Sensors auf Zelladhäsionen zu gewinnen, kann man das Verhalten von Zellen durch Liposomen nachahmen. Liposomen

bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber Zellen. Sie können sehr einfach und homogen hergestellt und durch verschiedene Methoden in ihren Eigenschaften modifiziert und funktionalisiert werden.

Die unspezifische, d.h. nicht rezeptorvermittelte Adhäsion von unterschiedlichen Liposomenpräparationen an Oberflächen wurde untersucht. Als Modellliposomen wurden Sojaphosphatidylcholin-Vesikel ausgewählt, deren Adsorptionsverlauf auf einer reinen Goldoberfläche in Abbildung 35 gezeigt wird.

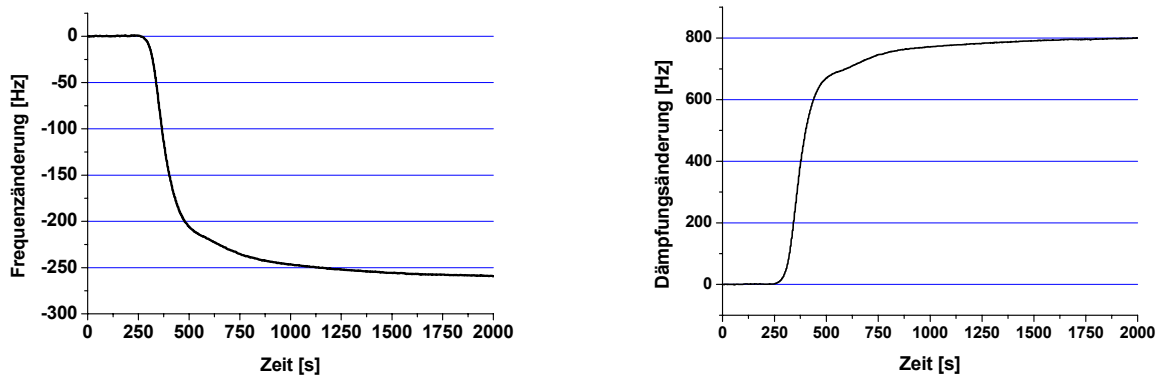


Abbildung 35: Frequenz- (links) und Dämpfungsverlauf (rechts) bei der Adhäsion von SPC-Liposomen auf einem unbeschichtetem Quarz

Dabei zeigt sich eine Frequenzabnahme von $-276 \text{ Hz} \pm 32 \text{ Hz}$ und eine Zunahme der Dämpfung von $788 \text{ Hz} \pm 142 \text{ Hz}$. Nach der Sauerbrey-Gleichung ergibt dies eine Massebeladung von $4,3 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Als Vergleichsrechnung: Würde der Quarz bei Vernachlässigung von mitgewogenem Wasser und Abweichungen von der Sauerbrey-Gleichung eine SPC-Bilayer „wiegen“ (Molgewicht: $760 \text{ g}/\text{mol}$, Platzbedarf für ein Molekül: $0,45 \text{ nm}^2$), wäre die theoretische Frequenzabnahme -128 Hz , das entspricht $2,0 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Es muss sich also ein größeres Gebilde an der Sensoroberfläche befinden. Es kann sich hier also um Multilayer (nach der Frequenzabnahme abzuschätzen etwa 2 Doppelschichten) oder intakte Liposomen handeln. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Dämpfung stark unterschiedlich ausfällt, je nachdem ob nun Bilayer oder intakte Vesikel adhären [126]. Bei der Ausbildung einer Bilayer kann man allenfalls eine geringe Zunahme der Dämpfung feststellen, da sich ein sehr kompaktes, hoch geordnetes Agglomerat an der Oberfläche bildet. Bei der Adhäsion von intakten Liposomen als sphärische Gebilde wird die Dämpfung deutlich größer sein. Bei der Adhäsion von SPC-Liposomen an eine Goldoberfläche kann man aufgrund der hohen Dämpfung von der Adhäsion von intakten Liposomen ausgehen. Als Maß der Dämpfung im Vergleich zur Frequenzabnahme soll hier wiederum der Koeffizient aus Dämpfungsänderung und Frequenzabnahme betrachtet werden. Im vorliegenden Fall liegt dieser über den gesamten zeitlichen Verlauf bei $-2,83 \pm 0,4$. Als Vergleich: Bei der Adhäsion

von Rinderserumalbumin an eine reine Goldoberfläche beträgt dieser Quotient $-0,6 \pm 0,2$ (siehe Tabelle 10). Abbildung 36 verdeutlicht diesen Unterschied graphisch.

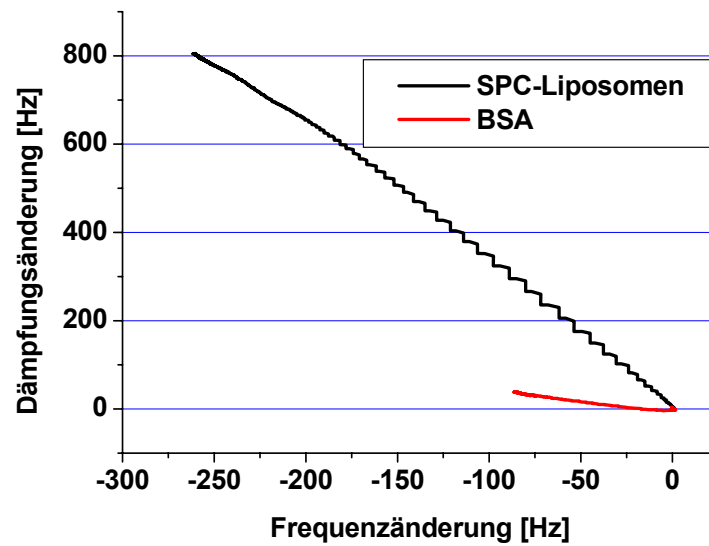


Abbildung 36: Graphische Darstellung des D/F-Verhältnisses im D vs. F Diagramm bei der Adhäsion von SPC-Liposomen und BSA auf einer reinen Goldschicht

Abbildung 37 zeigt einen typischen Frequenz- und Dämpfungsverlauf der Adhäsion von SPC-Liposomen an eine hydrophobe Oktadekanthiol-Self-Assemblierung-Schicht.

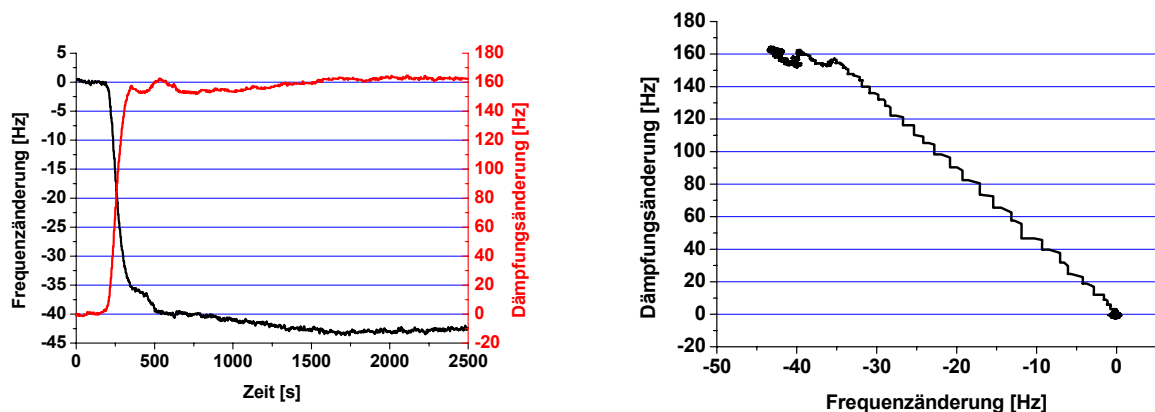


Abbildung 37: Frequenz- und Dämpfungsverlauf (links) und D/F-Verhältnis (rechts) bei der Adhäsion von SPC-Liposomen auf einer Oktadekanthiol-Schicht

Es werden $-34 \text{ Hz} \pm 13 \text{ Hz}$ Frequenzabnahme und $150 \text{ Hz} \pm 42 \text{ Hz}$ Dämpfungszunahme erhalten. Der Quotient aus D und F liegt bei $-4,35 \pm 0,2$. Folgt man der vorangegangenen Interpretation dieser Ergebnisse, so kann man anhand der Frequenzabnahme weder auf die Bildung einer Monolayer (theoretische Frequenzabnahme von -64 Hz) noch auf die Bindung intakter Liposomen (Frequenzabnahme im Vergleich zum vorherigen Experiment viel niedriger) schließen. Der Quotient aus Dämpfungs- und Frequenzänderung deutet aber

wiederum eindeutig auf die Adhäsion von intakten Liposomen hin. Der deutlich höhere Wert im Vergleich zur Bindung an einer reinen Goldoberfläche kann durch ein geringeres Abflachen der Liposomen erklärt werden. Während an der relativ hydrophilen Goldoberfläche die Wechselwirkung mit Liposomen und deren nach außen gerichteten geladenen Kopfgruppen begünstigt sind, kommt es an einer hydrophoben Oberfläche zu weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten. Im Ergebnis flachen die Liposomen an der Goldoberfläche ab um möglichst viele Wechselwirkungen einzugehen. Das Liposom wird sich solange abflachen, bis der Energiegewinn durch die Bindung an die Oberfläche mit der Zunahme der Biegeenergie des Liposoms im Gleichgewicht liegt. Ist die Anziehungskraft der Oberfläche so groß, dass ein kritischer Biegeradius überschritten wird, wird das Liposom aufreißen (sog. „rupture“) und zu einer Bilayer aufspreiten (sog. „spreading“). Im hier zu diskutierenden Fall der Adhäsion von SPC-Liposomen auf einer Gold- oder Oktadekanthiol-Schicht kommt es nicht zu solch einem Spreading. Vielmehr reichen die Wechselwirkungskräfte von Liposom und Oberfläche nur zu einem Abflachen der Liposomen aus. Im Falle der Goldoberfläche ist die Wechselwirkung stärker als bei der hydrophoben Thioalkan-Schicht, d.h. die Liposomen werden auf der Goldoberfläche stärker abflachen und dadurch eine geringere Dämpfung verursachen. Auf der hydrophoben Schicht finden nur wenig Wechselwirkungen statt, die Liposomen flachen weniger ab und verursachen durch ihr größeres Volumen auf der Quarzoberfläche eine höhere Dämpfung. Gleichwohl adhären weniger Liposomen insgesamt auf der Oberfläche, so dass der Betrag der Frequenzänderung kleiner ist. Die verringerte Adhäsion ist auch zu erwarten, da sich, wie oben diskutiert, weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten ergeben.

Die Ergebnisse mit der hydrophoben Thioalkan-Beschichtung zeigen ein anderes Bild als von Keller und Kasemo beschrieben [126]. Diese finden eine Monolayerbildung von Ei-PC-Liposomen auf solch einer hydrophoben Schicht. Als Unterschied zu der hier verwendeten Durchflusszelle führten Keller und Kasemo ihre Untersuchungen in einem statischen Versuchsaufbau durch. Bei durchgeführten statischen Adhäsionsversuchen an den mit Thioalkan beschichteten Goldoberflächen wurden mit unserer Messanordnung eine Frequenzabnahme von -1028 Hz und eine Dämpfungszunahme von 2817 Hz gemessen, dies entspricht einem D/F-Verhältnis von -2,80. Bei der statischen Versuchsanordnung werden also stärkere Adhäsionsvorgänge vorgefunden. Es ist davon auszugehen, dass sich hier nun das Gleichgewicht zwischen gebundenen und in Lösung befindlichen Liposomen eingestellt hat. Das Verhältnis von D zu F zeigt wiederum, dass sich intakte Liposomen an der Quarzoberfläche befinden. Allerdings scheinen diese stärker abgeflacht zu sein als im Experiment unter Flussbedingungen.

5.8.2. Stabilisierung der Liposomen durch Einbau von PEG-PE

Der Einbau von Lipid-gebundenem Polyethylenglykol in Liposomen schafft eine hydrophile Barriere (sterische Stabilisierung) und sollte so das Adsorptionsverhalten der Liposomen verändern. Bei der Adhäsion von SPC-Liposomen mit einem Gehalt von 2 mol% PEG-PE an eine reine Goldoberfläche wird nur eine Frequenzänderung von -15 ± 4 Hz gefunden. Die Dämpfungsänderung beträgt 59 ± 8 Hz und das D/F-Verhältnis wurde zu $-3,51 \pm 0,7$ ermittelt. Abbildung 38 gibt einen charakteristischen Frequenz- und Dämpfungsverlauf wieder.

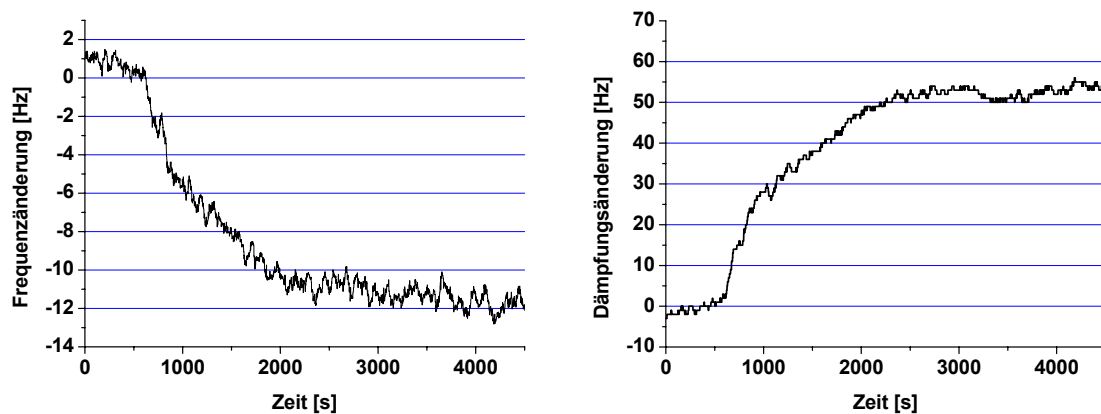


Abbildung 38: Frequenz- (links) und Dämpfungsverlauf (rechts) bei der Adhäsion von SPC-2 mol%-PEG-PE-Liposomen auf einem unbeschichtetem Quarz

Im Vergleich zu den reinen SPC-Liposomen findet man eine drastisch verringerte Frequenzabnahme. Dies bedeutet eine geringere Masseanlagerung. Vergleicht man zusätzlich noch den D/F-Quotienten, so findet sich ein höherer Wert bei den PEG-haltigen Liposomen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass intakte Vesikel an der Goldoberfläche adhäreren. Das Ausmaß der Adhäsion wird jedoch durch den Einbau von PEG-PE stark vermindert. Zusätzlich zur verminderten Adhäsion werden die Liposomen stabilisiert, d.h. sie flachen während des Adhäsionsprozesses weniger ab als PEG-freie Liposomen. Durch den Einbau von PEG-PE in die Liposomenmembran werden die Liposomen mit einer starken Hydratschicht umgeben. Diese stabilisiert die Liposomen gegen Verformungen und schirmt die Oberfläche der Liposomenmembran nach außen hin ab. Dadurch werden Wechselwirkungen zwischen Liposomenmembran und Oberfläche erschwert bzw. ganz verhindert.

5.8.3. Verstärkung der Wechselwirkung von Liposomen mit der Oberfläche

5.8.3.1. Kalziueinfluss

Um die Aufspreitung eines Liposoms auf eine Oberfläche zu erzwingen, muss die durch Wechselwirkungen der einzelnen Lipidbestandteile des Liposoms mit der Oberfläche gewonnene Energie größer sein als die Energiebarriere, die sich aus dem Krümmungsdruck ergibt. Um die Wechselwirkung von negativ geladenen oder zwitterionischen Lipiden mit einer negativ geladenen Oberfläche zu verstärken, können bivalente Metallionen, insbesondere Ca^{2+} - Ionen eingesetzt werden. Bei der Adhäsion von SPC-Liposomen an eine Goldoberfläche in Gegenwart einer 25 mM CaCl_2 -Lösung wurde eine Frequenzabnahme von -400 Hz, eine Dämpfungszunahme von 920 Hz und ein resultierendes D/F-Verhältnis von -2,27 gemessen. Diese Frequenzabnahme ist höher als in der Abwesenheit von Ca^{2+} . Ebenso nimmt der Betrag des D/F-Verhältnisses ab, wie aus Abbildung 39 zu erkennen ist.

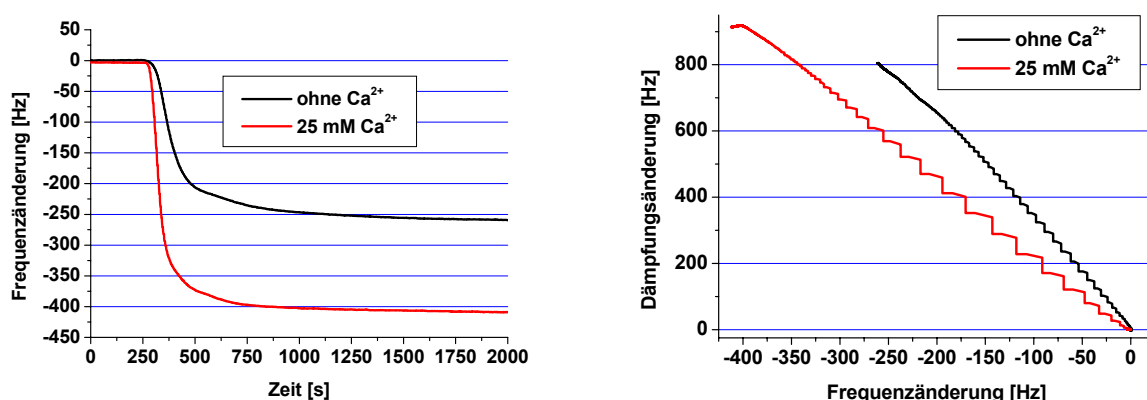


Abbildung 39: Frequenzverlauf (links) und D/F-Verhältnis im D vs. F-Diagramm (rechts) bei der Adhäsion von SPC-Liposomen mit 25 mM und ohne Kalzium

Dies lässt den Schluss zu, dass es zu einer Adhäsions- und Wechselwirkungsverstärkung kommt. Die Liposomen flachen weiter ab, aber der Kalziueffekt reicht nicht aus, um ein Aufspreiten der Liposomen zu erreichen.

5.8.3.2. Ladungseinfluss

Die Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Oberfläche können ebenfalls durch coulombsche Kräfte verstärkt werden, d.h. durch eine unterschiedliche Ladung von Liposomen und Oberfläche kann eine verstärkte Adhäsion erreicht werden. Deshalb wurden positivgeladene DOTAP-Liposomen über eine negativ geladene Schicht von 16-Mercaptohexadecansäure auf Gold gespült. Dabei nahm die Frequenz um 938 ± 23 Hz ab und die Dämpfung stieg um 2054 ± 267 Hz, das D/F-Verhältnis betrug $-2,29 \pm 0,57$. Das sind eine deutliche Zunahme der Adhäsion und eine leichte Abnahme des D/F-Verhältnisses im Vergleich zu reinen SPC-Liposomen auf einer Goldoberfläche. Durch die attraktiven

Wechselwirkungen der unterschiedlichen Ladungen wird eine erhöhte Masseanlagerung auf der Sensoroberfläche detektiert. Die adhärennten Liposomen sind stärker abgeflacht, was man am kleineren Betrag des D/F-Verhältnisses erkennen kann. Wiederum reichen die Wechselwirkungen nicht aus, um das komplette Fusionieren der Liposomen mit der Oberfläche zu erreichen. Auch bei einer Versuchsanordnung mit einer positiv geladenen Sensoroberfläche durch die kovalente Kopplung von Cholamin-HCl und negativ geladenen Liposomen aus äquimolaren Mengen SPC und EPS wurden ähnliche Ergebnisse gefunden ($\Delta f = -361 \pm 163$ Hz, $\Delta D = 887 \pm 387$ Hz, $D/F = 2,43 \pm 0,18$). Hier ist der Ladungseffekt erwartungsgemäß etwas geringer, da nur die Hälfte der Liposomenlipide eine negative Nettoladung trägt. In Abbildung 40 ist die verstärkte Adhäsion für die geladenen Liposomen im D/F-Plot dargestellt.

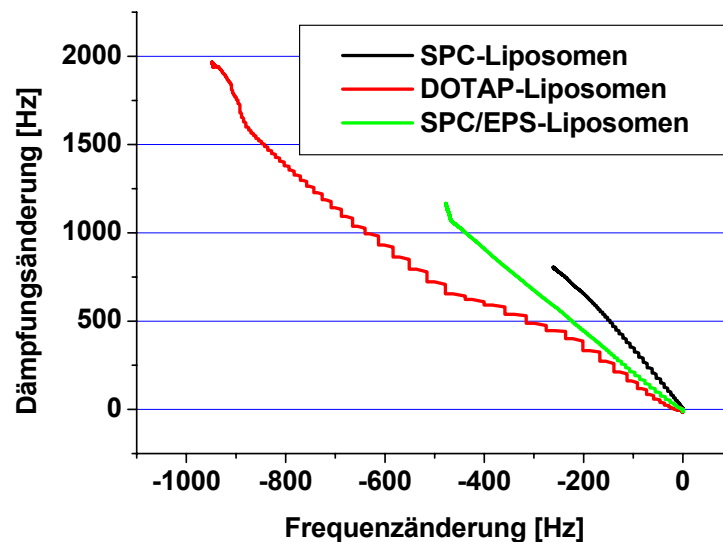


Abbildung 40: D vs. F-Diagramm bei der Adhäsion von SPC-Liposomen auf Gold, DOTAP-Liposomen auf Mercaptohexadecansäure- und SPC/EPS-Liposomen auf Cholamin-Schicht

5.8.3.3. Einbau von Thioalkanen

Durch die hohe Affinität von Schwefel zu Gold könnte ebenfalls eine Steigerung der Wechselwirkung von Liposomen mit der Sensoroberfläche erreicht werden. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden Liposomen aus SPC mit einem Gehalt von 1 und 30 mol% Oktadecanthiol auf einer Goldoberfläche vermessen. Dabei wurden die in Tabelle 18 wiedergegebenen Ergebnisse erhalten:

	SPC	1 mol% Oktadecanthiol	30 mol% Oktadecanthiol
Frequenzänderung	-54 ± 6 Hz	-175 ± 11 Hz	-180 ± 26 Hz
Dämpfungsänderung	153 ± 11 Hz	480 ± 50 Hz	382 ± 125 Hz
D/F-Verhältnis	$-2,75 \pm 0,09$	$-2,80 \pm 0,01$	$-2,07 \pm 0,36$

Tabelle 18: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Oktadecanthiol an eine Goldoberfläche

Der Einbau von 1 mol% Oktadecanthiol führt zu einer deutlichen Zunahme der Adhäsion im Vergleich zu reinen SPC-Liposomen. Ein noch höherer Gehalt an Oktadecanthiol (30 mol%) führte nicht zu einer vermehrten Adhäsion, was an den nahezu identischen Werten für die Frequenzänderung bei 1 und 30 mol% Oktadecanthiol zu erkennen ist. Allerdings zeigte sich ein Unterschied in der Dämpfung. Diese nahm mit steigendem Thiolgehalt ab. Bei einer Beladung der Liposomen mit 1 mol% weist das D/F-Verhältnis keinen signifikanten Unterschied zu reinen SPC-Liposomen auf, während es bei einem Thiolgehalt von 30 mol% zu einer deutlichen Erniedrigung kommt.

5.8.4. Zusammenfassung

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass durch die QCM-Technik die Wechselwirkungen von Liposomen mit einer Festkörperoberfläche quantifiziert und qualitativ untersucht werden können. Anhand der Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes kann die adsorbierte Masse ermittelt werden. Die zusätzliche Erfassung der Dämpfungsänderung erlaubt dazu die Adsorbatschicht näher zu charakterisieren. Besonders empfindlich können Änderungen in den viskoelastischen Eigenschaften des Adsorbats bzw. der Sensoroberfläche detektiert werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse erlauben Rückschlüsse auf die Morphologie der angelagerten Masse, wobei unterschiedliche Einflüsse auf die Adhäsion von Liposomen an einer Oberfläche näher charakterisiert werden konnten.

5.8.5. Spezifische Adhäsion von Liposomen an funktionalisierten Oberflächen

5.8.5.1. Biotin-Liposomen

Die spezifische, rezeptorvermittelte Adhäsion von Liposomen an bindungsfähigen Oberflächen wurde am Beispiel des Biotin-Avidin-Systems untersucht.

In mehreren Versuchen wurde das Adsorptionsverhalten von biotinhaltigen Liposomen untersucht. Dabei richtete sich ein Augenmerk auf den Einfluss des Biotinylierungsgrades der Vesikel auf das Bindungsverhalten an eine Avidin-funktionalisierte Oberfläche.

Biotingehalt	Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Quotient
0,1 mol%	-18 ± 12 Hz	61 ± 34 Hz	3,43 ± 0,57
1 mol%	-68 ± 26 Hz	155 ± 60 Hz	3,38 ± 0,58
5 mol%	-76 ± 20 Hz	238 ± 66 Hz	3,22 ± 0,07
10 mol%	-266 ± 63 Hz	512 ± 57 Hz	1,99 ± 0,28
20 mol%	-359 ± 78 Hz	493 ± 178 Hz	1,42 ± 0,16
30 mol%	-215 ± 59 Hz	219 ± 81 Hz	0,98 ± 0,01

Tabelle 19: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis bei der Adhäsion von SPC-Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Biotin an Avidin-modifizierte Quarzsensoren

Tabelle 19 zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse. Dabei steigt mit dem Biotingehalt zunächst auch die aufgelagerte Masse, das Maximum wird bei einem Gehalt von 20 mol% Biotin erreicht. Durch die höhere Ligandendichte können mehr Liposomen an die Avidin-Oberfläche binden, was zur beobachteten Masseanlagerung führt. Bei noch höherem Gehalt an Biotin in der Liposomenmembran (30mol%) wird wieder eine geringere Frequenzabnahme beobachtet. Um diesen zunächst nicht sofort erkläraren Sachverhalt näher zu untersuchen, kann der Verlauf der Dämpfungsänderung mit zunehmendem Biotingehalt herangezogen werden. Auch hier findet sich eine Erhöhung der Dämpfungsänderung mit steigendem Ligandengehalt. Aber bereits bei 10 mol% Biotin ist das Maximum erreicht, höhere Biotingehalte (20 und 30 mol%) liefern wieder geringere Dämpfungsänderungen. Durch die hohe Ligandendichte werden viele Bindungen zwischen Avidin und Biotin ermöglicht. Durch den bei der Bindung anfallenden Energiegewinn kann der Krümmungsradius der Liposomenmembran verkleinert werden, so dass die Liposomen stärker abflachen können. Platten bei der Bindung an die Oberfläche die Liposomen ab, wird durch die Abweichung von der optimalen Kugelform eine größere Fläche von einem einzelnen Liposom beansprucht. Dadurch können dann auf der Sensoroberfläche weniger Liposomen binden. Dies führt zu der gefundenen Abnahme des Betrages der Resonanzfrequenz bei 30 mol% Biotingehalt. Zusätzlich verringert sich die Menge des eingeschlossenen Wassers zwischen den einzelnen Liposomen, während die Menge des inkorporierten Wassers in den Liposomen solange konstant ist, wie der osmotische Druck des umgebenden Mediums gleich bleibt und die Membran keine Fehlstellen aufweist. Unterschreitet der Krümmungsradius einen kritischen Wert, kommt es zur Läsion der Liposomenmembran und zum Austritt von intraliposomaler Flüssigkeit. Das würde jedenfalls zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen Masse führen. Dieser Schritt ist Voraussetzung zur Bildung einer Bilayer aus Liposomen auf einer Oberfläche. Bei dem Vorhandensein einer Bilayer sollte der eingeschlossene Wassergehalt sehr gering sein.

In einer AFM-Studie konnten Pignataro et al. zeigen, dass sich bei einem Biotingehalt von 30 mol% in der Liposomenmembran eine Bilayer auf der Avidin-Oberfläche bildet [137]. Auch die hier präsentierten Ergebnisse deuten auf die Bildung immer flacherer Liposomen mit steigendem Biotin-Gehalt hin. Am deutlichsten wird diese Interpretation vom D/F-Quotienten widerspiegelt (Abbildung 41). Dieser nimmt mit steigendem Biotingehalt kontinuierlich ab, d.h. die aufgelagerte Masse verursacht eine verhältnismäßig geringere Dämpfung der Quarzoszillation. Dies kann nur durch ein Abflachen und eventuelles Aufspreiten der Liposomen bei höherem Biotin-Gehalt erklärt werden.

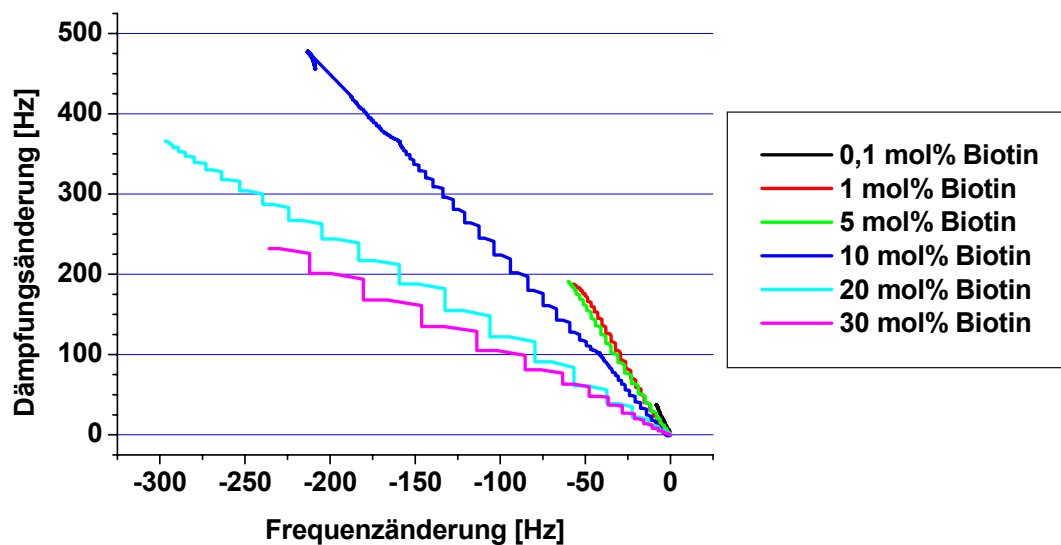


Abbildung 41: *D vs. F-Diagramm bei der Adhäsion von SPC-Liposomen mit unterschiedlichen Biotingehalten an Avidin-modifizierte Quarze*

Im Gegensatz zu den im theoretischen Teil aufgeführten Untersuchungen bezüglich der biotinhaltigen Liposomen ist anzumerken, dass sich die hier gezeigten Ergebnisse aus Versuchen ergeben, die unter dynamischen Flussbedingungen durchgeführt wurden. Dabei steht den Liposomen nur eine sehr kurze Zeit zur Bindungsausbildung zur Verfügung. Bei dem System Avidin-Biotin reicht diese kurze, einmalige Passage der Liposomen über den Sensor aus, um eine Adhäsion/Spreitung der Liposomen zu erreichen.

Mit diesen Ergebnissen konnte eindrucksvoll das Potential der verwendeten Versuchsanordnung zur Detektion der Bindung von Liposomen an einer Oberfläche unter dynamischen Flussbedingungen gezeigt werden.

Die gleichzeitige Erfassung von Frequenzänderung als massenproportionales Messsignal und Dämpfungsänderung als Maß für die Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften an der Quarzoberfläche eröffnet dabei die Quantifizierung der Adhäsionsereignisse und die Ermittlung der Eigenschaften der Adsorbatschicht. Anhand des

D/F-Quotienten (Abbildung 42) können unterschiedliche Liposomenpräparationen auf ihr Adsorptionsverhalten hin untersucht und charakterisiert werden. Dabei kann klar zwischen adhären, intakten Liposomen, abgeflachten und noch intakten Liposomen mit starker Abweichung von der Kugelform und aufgespreiteten, fusionierten Liposomen unterschieden werden.

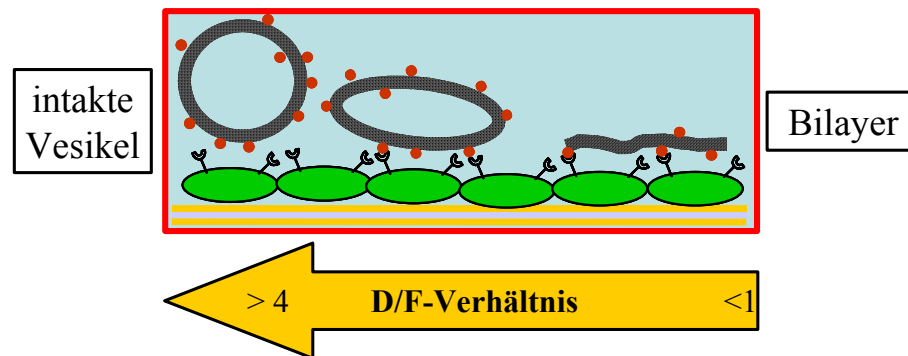


Abbildung 42: Abschätzung des Liposomenverhaltens während der Adhäsion anhand des D/F-Verhältnisses

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss von PEG-PE auf das Adhäsionsverhalten von Biotinhaltigen Liposomen untersucht werden. Dazu wurden Biotinhaltige Liposomen mit 2 bzw. 5 mol% PEG-PE hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 und Abbildung 43 dargestellt.

Biotingehalt	PEG-PE-Gehalt	Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Quotient
5 mol%	2 mol%	-7 ± 1 Hz	34 ± 7 Hz	$4,55 \pm 0,75$
10 mol%	2 mol%	-20 ± 16 Hz	75 ± 49 Hz	$4,15 \pm 0,11$
20 mol%	2 mol%	-38 ± 11 Hz	115 ± 55 Hz	$3,01 \pm 0,66$
30 mol%	2 mol%	-118 ± 36 Hz	382 ± 88 Hz	$3,72 \pm 0,05$
5 mol%	5 mol%	-28 ± 10 Hz	132 ± 18 Hz	$4,12 \pm 0,01$
30 mol%	5 mol%	-40 ± 10 Hz	139 ± 33 Hz	$4,02 \pm 0,70$

Tabelle 20: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Biotin und PEG-PE an Avidin-modifizierte Quarzsensoren

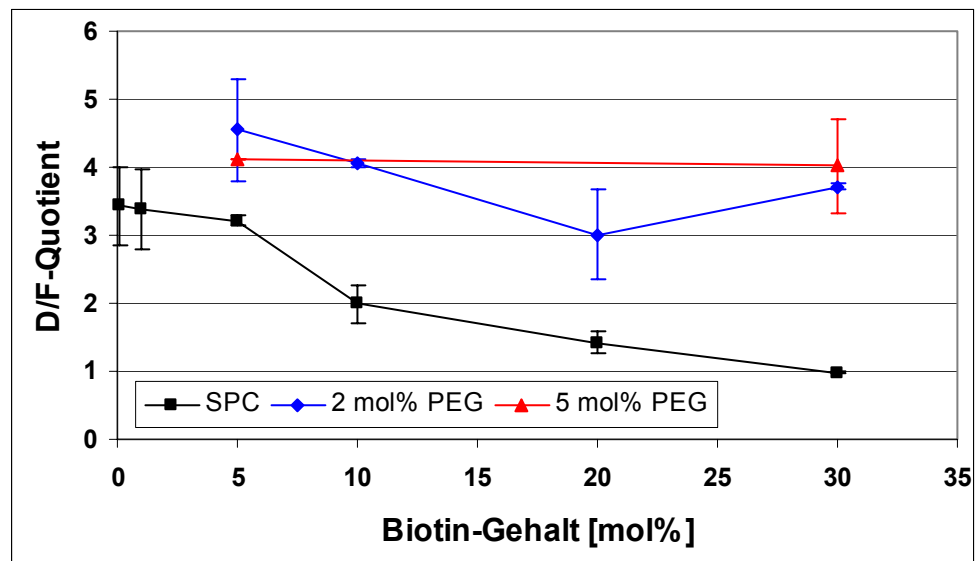


Abbildung 43: D/F-Quotienten bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichen Biotin- und PEG-PE-Gehalten an eine Avidin-modifizierte Oberfläche

Betrachtet man den Verlauf der Frequenzabnahme mit steigender Biotinkonzentration bei konstantem PEG-PE-Gehalt, so zeigt sich eine stetige Erhöhung der Masseanlagerung. Die Änderung der Dämpfung nimmt ebenfalls kontinuierlich zu. Dabei fällt die stark verminderte Masseanlagerung auch bei hohen Biotinkonzentrationen im Vergleich zu den PEG-freien Liposomen auf. Durch den Einbau von PEG-PE werden die Liposomen sterisch stabilisiert. PEG-PE schirmt durch seine starke Hydrathülle die Liposomen nach außen hin ab. Das über einen kurzen Spacer sehr nah an der Membranoberfläche sitzende Biotinlipid kann deshalb weniger gut mit dem Avidin auf der Sensoroberfläche wechselwirken. Durch die permanenten Flussbedingungen während der Messungen können weniger Bindungen zustande kommen. Das Ergebnis ist somit eine verringerte Masse, die sich auf der Sensoroberfläche befindet, da weniger Liposomen adhäreren bzw. weniger Kontaktstellen zwischen den Liposomen und dem Sensor gebildet werden. Richtet man seine Aufmerksamkeit auf die Veränderung des D/F-Verhältnisses, so erkennt man eine Abnahme mit steigender Biotinkonzentration bei konstantem PEG-PE-Gehalt. Diese Abnahme ist aber deutlich kleiner

als bei den reinen SPC-Liposomen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich keine Bilayer bei der Adhäsion der PEG-Liposomen bilden. Die Stabilisierung durch Polyethylenglykol verhindert das Aufspreiten der Liposomen. Sie bleiben als intakte, nur wenig abgeflachte Liposomen auf der Sensoroberfläche bestehen. Abbildung 44 gibt eine schematische Darstellung des unterschiedlichen Adsorptionsverhaltens von Biotin-Liposomen mit und ohne PEG-PE wieder.

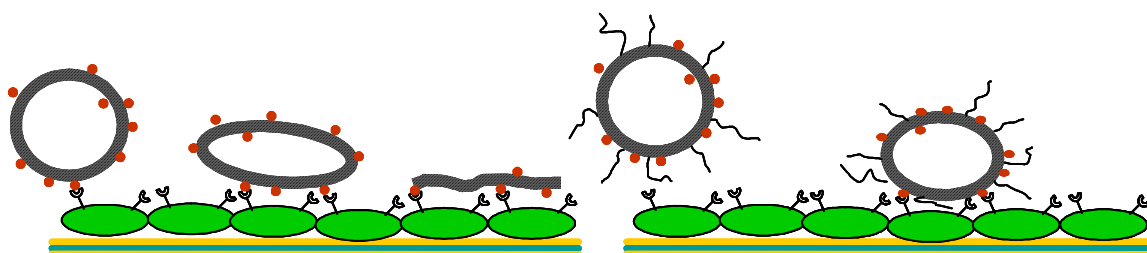


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Adsorptionsverhaltens von Biotin-SPC-Liposomen ohne (links) und mit PEG-PE (rechts) auf einer Avidin-Schicht

Der Einbau von PEG-PE führt also zur Abnahme der Bindung zwischen membranständigem Biotin und auf der Sensoroberfläche immobilisiertem Avidin. Daraufhin werden weniger Liposomen zum Haften auf der Oberfläche veranlasst. Zusätzlich verhindert der Einbau von PEG-PE die Deformation der Liposomen und ein Aufspreiten und damit die Bildung einer Bilayer. Mit steigendem PEG-PE-Gehalt nimmt dieser Effekt zu.

Ob das Verhindern des Aufspreitens durch die Stabilisierung der Liposomenmembran oder durch die Abschirmung der Bindungsstelle des Biotins erfolgt, kann durch diese Versuche nicht geklärt werden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden Liposomen mit PEG-ständigem Biotin hergestellt. Dazu wurde ein Biotin-gelabeltes PEG-PE verwendet, das in SPC-Liposomen eingebaut wurde. Die verwendete Konzentration des Biotinyl-PEG-PE betrug 5 mol% und 30 mol%. Tabelle 21 gibt die Messergebnisse wieder.

Biotinyl-PEG-PE-Gehalt	Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Verhältnis
5 mol%	-192 ± 17 Hz	361 ± 32 Hz	$2,31 \pm 0,33$
30 mol%	-122 ± 6 Hz	111 ± 2 Hz	$1,26 \pm 0,12$

Tabelle 21: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Biotinyl-PEG-PE an Avidin-modifizierte Quarzsensoren

Wie anhand der Frequenzänderung von -192 Hz für 5 mol% und -122 Hz für 30 mol% Biotinyl-PEG-PE-SPC-Liposomen zu erkennen ist, wird im Vergleich zu den PEG-Biotin-SPC-Liposomen mehr Masse an der Sensoroberfläche gebunden. Daraus kann man ableiten,

dass die sterische Abschirmung des membranständigen Biotins durch die PEG-Ketten für die verringerte Bindung der Liposomen an der Avidin-Oberfläche verantwortlich ist. Anhand der Dämpfung, insbesondere anhand des D/F-Verhältnisses, lässt sich erkennen, dass die Biotinyl-PEG-PE-Liposomen bei der Bindung deutlich abflachen. Besonders hervorzuheben ist, dass bei der hohen Konzentration von 30 mol% Biotinyl-PEG-PE ein sehr kleines D/F-Verhältnis von 1,26 festgestellt wurde, welches bei keiner Präparation von PEG-Biotin-Liposomen erreicht wurde. Daraus schlussfolgern wir, dass der Einbau von PEG-PE in Liposomen nicht generell zu einer „Versteifung“ der Liposomenmembran führt, sondern dass die beobachteten geringen Verformungen der PEG-Biotin-Liposomen allein über die sterische Abschirmung der membranständigen Biotinmoleküle durch die voluminösen PEG-Ketten erklärt werden können. Ist das Biotin dagegen frei zugänglich am Kettenende des PEG-Spacers gekoppelt, erfolgt eine effiziente Erkennung und Bindung. Der Energiegewinn reicht dabei aus, um die Liposomen so stark zu verformen dass zumindest bei den Liposomen mit hohem Biotinyl-PEG-PE-Gehalt ein teilweises „Spreading“ induziert wird. Das im Vergleich zu Liposomen mit 5 mol% Biotin deutlich geringere D/F-Verhältnis der Biotinyl-PEG-PE-Liposomen mit 5 mol% (3,22 zu 2,31) zeigt, dass die Liposomen mit endständigen Biotin-Gruppen stärker abflachen. Die bessere Zugänglichkeit und erhöhte Beweglichkeit des Biotins an den PEG-Kettenenden bewirkt, dass sich mehr Bindungen zwischen Avidin und Biotin ausbilden, was die beobachtete stärkere Abflachung erklärt.

5.8.5.2. Immunoliposomen

In weiteren Experimenten sollte nun das Adsorptionsverhalten von anderen Ligandhaltigen Liposomen untersucht werden. Dabei liegt ein Interessenschwerpunkt auf die Untersuchung von pharmazeutisch relevanten funktionalisierten Liposomen. Eine gut etablierte Methode des Liposomentargeting besteht in der Kopplung von Antikörpern, die gegen die gewünschten Targetstrukturen gerichtet sind. Antikörper-gekoppelte Liposomen, so genannte Immunoliposomen, zeigen in vielfältigen Untersuchungen ein großes Potential als Carriersysteme. Ein Vorteil der Verwendung von Liposomen als Arzneistoffvehikel ist die generelle Aufnahmefähigkeit von hydrophilen wie lipophilen Arzneistoffen. Dabei ist es für die Targetierungsversuche durchaus von Bedeutung, ob das Liposom bei der Bindung an seine Zielstruktur stabil adhärert, um beispielsweise zellulär internalisiert zu werden, oder ob es durch die Bindung zu einer Formveränderung veranlasst wird, die durch Abflachen, Aufspreiten letztlich zum Verlust der Integrität und zur Freisetzung des Inhaltes führt. In bestimmten Fällen, wie zum Beispiel der Blockierung/Aktivierung von Rezeptoren auf der Zellmembran, ist dieses Verhalten der Liposomen erwünscht. Es sind aber auch

Applikationen denkbar, bei denen das Liposom intakt an der Zelle binden und durch aktive Transportmechanismen in das Zellinnere aufgenommen werden soll.

Das spezifische Verhalten der Liposomen ist durch verschiedene physikochemische Eigenschaften der Lipide und biophysikalische Gegebenheiten geprägt. Da das Liposomenverhalten experimentell in Targetierungsstudien sehr aufwändig zu steuern ist, kann der Einsatz der QCM-Technik hier zu einem vereinfachten Modellaufbau führen, der Aussagen zur Adsorptionscharakteristik von Liposomen an Oberflächen einfacher zulässt.

Somit wurde die Übertragung der Ergebnisse des Modellsystems Biotin-Liposom – Avidin-Oberfläche auf die Untersuchung mit Immunoliposomen angestrebt. Immunoliposomen wurden gegen das bereits beschriebene Zelladhäsionsmolekül L-Selektin gerichtet.

Der Antikörper wurde hierbei kovalent an einen Lipidanker gekoppelt, der in vorgeformten Liposomen eingebaut war. Bei der Adhäsion von Anti-L-Selektin Immunoliposomen, die 5 mol% N-Glut-PE als Lipidanker für den Antikörper und 95 mol% SPC enthielten, wurde eine durch die Antigen-Antikörper-Reaktion vermittelte Adsorption von Liposomen an einer L-Selektin-funktionalisierten Oberfläche beobachtet. Es wurde eine Frequenzänderung von -32 Hz gefunden. Durch die geringeren Bindungskonstanten von Antikörpern zu ihren Antigenen wurde eine geringere Adhäsion im Vergleich mit den Biotin-Liposomen erwartet. Dazu kommt, dass der Platzbedarf eines Antikörpers auf der Liposomenmembran größer ist als der eines Biotinlipids, d.h. dass es bedingt durch die Krümmung der Liposomenmembran zu weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Antigen auf der Oberfläche und Antikörper an der Liposomenmembran kommen kann. Verglichen mit den SPC-Liposomen, die 5 mol% Biotinlipid enthielten, wurde etwa nur die Hälfte der Masseanlagerung gefunden (-76 Hz). Die Dämpfungsänderung wurde mit 105 Hz bestimmt. Auch hier findet sich ein um etwa 50% verringerter Wert wie bei den 5 mol%-Biotin-SPC-Liposomen (238 Hz) wieder. Wie aus den beiden Werten für Frequenz- und Dämpfungsänderung zu erwarten ist, ist auch das D/F-Verhältnis mit einem Wert von -3,77 etwas größer als für die Biotin-Liposomen mit gleich hohem Ligandgehalt (-3,22). Die leichte Erhöhung kann wiederum zwei Ursachen haben. Zum einen wirken die großvolumigen, an die Liposomenmembran gekoppelten Antikörpermoleküle ähnlich wie PEG-PE stabilisierend und abschirmend. Bei einer Bindungsausbildung an der antigenspezifischen Bindungsseite bleibt dazu noch ein nicht unbeachtlicher Spacer bis zur Liposomenoberfläche bestehend aus dem Fc-Teil des Antikörpers und dem Anker-molekül. In Abbildung 45 ist die Bindung der Immunoliposomen schematisch im Vergleich zu Biotin-Liposomen dargestellt.

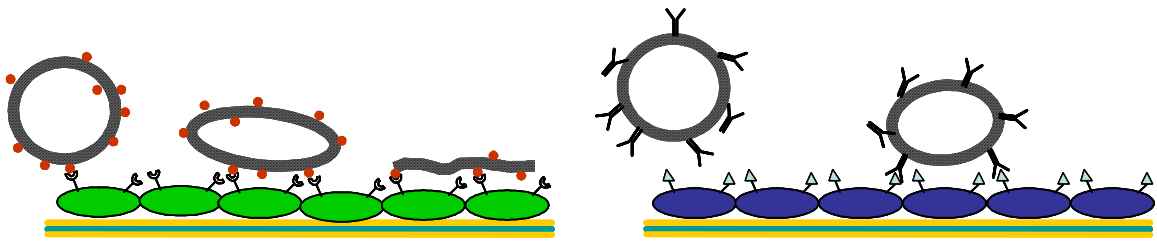


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Adsorptionsverhaltens von Biotin-SPC-Liposomen auf einer Avidin-Schicht (links) und L-Selektin-Immunoliposomen auf einer L-Selektin-Schicht (rechts)

Die geringere Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper kann aber ebenfalls zur weniger intensiven Wechselwirkung zwischen Liposom und Oberfläche beitragen. Anhand der festgestellten Ergebnisse kann gesagt werden, dass sich die hier untersuchten Immunoliposomen bei ihrer Adhäsion an die mit Antigen dotierte Oberfläche nicht wesentlich abflachen und in ihrer sphärischen Form intakt bleiben.

5.8.5.3. sLe^x-Liposomen

Eine weitere Möglichkeit der Targetierung von Liposomen neben der Antikörperkopplung ist der Einbau von Erkennungsstrukturen in die Liposomenmembran. Relativ kleine Moleküle mit amphiphilen Eigenschaften lagern sich spontan in die Liposomenmembran ein. Bei der Verwendung solcher Moleküle können so sehr einfach und elegant Ligand-haltige Liposomen hergestellt werden. Um die Targetierung von Liposomen gegen die pharmazeutisch interessanten Selektine zu erreichen, bietet sich das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X an. Es besitzt eine Affinität zu allen bekannten Selektinen [195]. Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Schmidt aus Konstanz stand uns ein Derivat des sLe^x mit Lipidanker zur Verfügung. Dieses sLe^x-Lipid konnte sehr leicht in Liposomenmembranen inkorporiert werden.

Als Zielstruktur wurde wiederum L-Selektin gewählt. Die Adhäsion von sLe^x-haltigen Liposomen an die mit L-Selektin funktionalisierte Sensoroberfläche wurde in verschiedenen Experimenten untersucht. Analog zu den vorangehend dargestellten Experimenten wurden Liposomen aus SPC mit unterschiedlich hohem sLe^x-Gehalt untersucht. Bei der einmaligen Passage der Liposomen selbst bei hoher Liposomenkonzentrationen (10 mM Gesamtlipid) konnte keine messbare Adhäsion der Liposomen festgestellt werden. Dies kann seine Ursache in der geringen Bindungskonstante des sLe^x zu L-Selektin haben. Bei einer zu geringen Affinität verbleibt den Bindungspartnern zu wenig Zeit zur Bindungsbildung. Da die Versuche wiederum unter den simulierten Scherstrombedingungen des Blutstromes durchgeführt wurden, ist wahrscheinlich die Passagezeit der Liposomen zu kurz. Daher wurden die Liposomen dauerhaft mittels eines Kreislaufsystems über den Quarz gespült, diese

Methode simuliert nicht nur die physiologische Liposomenzirkulation besser als eine einmalige Passage der Sensoren, es sollte sich auch ein Gleichgewicht der Bindungsbildung und Lösung freier sLe^x-Liposomen an L-Selektin einstellen.

Unter diesen Flussbedingungen zeigte sich, dass sich keine konstante Frequenz- und Dämpfungsänderung auch nach mehr als 15 h einstellt. Das kann an der geringen Bindungskonstante und der schnellen Bindungskinetik, d.h. der hohen Rate der Bindungsbildung und -lösung zwischen sLe^x und L-Selektin liegen. Dieser Umstand erschwert die Auswertung der Experimente. Deshalb wurden als Endergebnisse die Änderung der Resonanzfrequenz sowie die Dämpfungsänderung nach 6 h herangezogen. Das Verhältnis von D/F bleibt im gesamten Zeitraum der Adhäsion nahezu konstant, was darauf hindeutet, dass sich die Adsorbatschichten während des zeitlichen Verlaufs nicht ändern, d.h. die adhären Liposomen behalten ihre Form während des gesamten Experiments bei. Tabelle 22 gibt die ermittelten Messergebnisse wieder.

sLe ^x -Gehalt	Frequenzänderung	Dämpfungsänderung	D/F-Quotient
1 mol%	-80 Hz	366 Hz	-4,60
5 mol%	-390 Hz	1717 Hz	-3,74
10 mol%	-133 Hz	388 Hz	-3,58

Tabelle 22: Frequenz-, Dämpfungsänderung und D/F-Verhältnis bei der Adhäsion von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an sLe^x-Lipid an L-Selektin-modifizierten Quarzsensoren

Dabei zeigt sich kein einheitliches Bild wie in den vorangegangenen Versuchen. Hier nimmt die Frequenzabnahme zunächst von 1 mol% zu 5 mol% hin zu, um dann wieder bei 10 mol% geringer zu werden. Dabei bleibt unklar, ob es sich bei den Ergebnissen um einen Artefakt handelt. Eine Erklärung kann für diesen Sachverhalt nur schwer gefunden werden. Eine gleiche Tendenz findet man beim Verlauf der Dämpfungsänderung. Aber anhand der D/F-Quotienten wird deutlich, dass mit steigender sLe^x-Konzentration die Liposomen wiederum stärker abflachen. Bei 10 mol% sLe^x wurde ein ähnlicher D/F-Quotient gefunden wie bei 0,1 mol% Biotinlipid. Daraus wird ersichtlich, dass die viel schwächere Bindung zwischen sLe^x und L-Selektin nicht zu einer so starken Deformation der Ligand-haltigen Liposomen führt wie es durch die Wechselwirkung von Avidin mit Biotin erreicht werden kann.

Baut man in solche sLe^x-SPC-Liposomen nun wiederum PEG-PE mit ein, beobachtet man einen starken stabilisierenden und abschirmenden Effekt. Dabei wurde mit einer Konzentration von 5 mol% sLe^x und 2 mol% SPC eine Frequenzänderung von -77 Hz und eine Dämpfungsänderung von 420 Hz gefunden. Das D/F-Verhältnis betrug -5,54. Dieser hohe Wert deutet ganz klar auf die Adhäsion von vollständig intakten und nur minimal

verformten Liposomen hin. Die Verringerung der Masseanlagerung im Vergleich zu PEG-freien Liposomenpräparationen ist wiederum auf den abschirmenden Effekt des PEG-PE zurückzuführen, die die Zugänglichkeit des sLe^x-Bindungssepitopes herabsetzen.

Mit den bisher hier vorgestellten Liposomen konnte eine Targetierung des L-Selektins erreicht werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl Immunoliposomen wie auch Ligand-haltige Liposomen für die Targetierung verwendet werden können. Durch die spezifische Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor adhären die Liposomen an der Oberfläche und verbleiben dort als intakte Vesikel. Durch die Bindungsbildung flachen die Liposomen teilweise ab. Der Einbau von Polyethylenglykol stabilisiert dabei die Liposomen und verhindert ein starkes Abflachen und damit auch das Aufspreiten. Allerdings wird durch den Einbau von PEG-PE die Zugänglichkeit der Ligandstrukturen verringert und dies führt zu einer verminderten spezifischen Bindung.

Das Verhalten der Liposomen bei der Bindung an eine Oberfläche hängt nicht nur von der Art der Wechselwirkung ab, sondern ebenso von der Zusammensetzung der Liposomenmembran. Mit der Variierung der Zusammensetzung sollte es daher ebenfalls möglich sein, das Adsorptionsverhalten der Liposomen zu beeinflussen und zu steuern.

5.8.5.4. sLe^x-DOPE-Liposomen

Bei der Targetierung des L-Selektins kann es ebenso erwünscht sein, ein Aufspreiten der Liposomen zu bewirken. Um nun die Freisetzung des Arzneistoffes am Ort der Bindung des Liposoms zu verwirklichen, muss eine Liposomenpräparation gefunden werden, die durch die Bindungsereignisse ihre Integrität verliert und daraufhin der Inhalt der Liposomen freigesetzt wird. In Arbeiten von Pinnaduwage und Huang konnte die Targetsensitivität von DOPE/DOPA-Liposomen gezeigt werden [196]. DOPE bildet allein keine Liposomen, da das Verhältnis von Kopfgruppengröße zu Kettendurchmesser ungünstig ist. Die relativ kleine Phosphatidylethanolamin-Kopfgruppe steht den durch die Doppelbindungen gewinkelten beiden Ölsäureresten mit dem dadurch erhöhten Platzbedarf gegenüber. Man kann aber die Bildung von Liposomen durch den Einbau eines Lipids mit geringem Platzbedarf im hydrophoben Bereich und einer großen Kopfgruppe erreichen. Hierdurch wird die Liposomenmembran stabilisiert und die Liposomen sind unter Normalbedingungen stabil. Bei DOPE handelte es sich um ein sehr fluides Lipid. Dadurch wird eine leichte Diffusion von anderen Lipiden innerhalb einer DOPE-Matrix ermöglicht. Baut man nun als stabilisierendes Lipid einen Liganden ein und lässt die resultierenden Liposomen mit einer Oberfläche in Wechselwirkung treten, auf der der korrespondierende Rezeptor vorhanden ist, kommt es natürlich zur Bindung zwischen Ligand und Rezeptor. Dabei können die Liganden aber nur an

der Rezeptoroberfläche binden. Durch die hohe Beweglichkeit der Lipide werden so immer mehr Ligandlipide an der Oberfläche gebunden. Dies führt zu einer Anreicherung auf einer Seite der Liposomen, woraufhin die der Oberfläche abgewandte Seite an stabilisierenden Ligandlipiden verarmt. Bei ausreichender „Verdünnung“ des Ligandlipids an einer Seite der Liposomen wird die Membran instabil und der Inhalt der Liposomen wird freigesetzt. Dabei wird die Membran zu Beginn erst Fehlstellen aufweisen und mit zunehmender Destabilisierung völlig aufspreiten.

Diese theoretischen Erkenntnisse sollten nun in Versuchen mit der Quarzmikrowaage getestet werden. Dazu wurde eine Liposomenpräparation aus 95 mol% DOPE und 5 mol% sLe^x-Lipid hergestellt. Die große Kopfgruppe des sLe^x-Tetrasaccharids ermöglicht die Stabilisierung der Liposomen. Anschließend wurde die Bindung an eine L-Selektin-Oberfläche untersucht. Dabei wurde wiederum ein Kreislauf mit ständig zirkulierenden Liposomen hergestellt. Der Verlauf eines typischen Versuches ist in Abbildung 46 dargestellt.

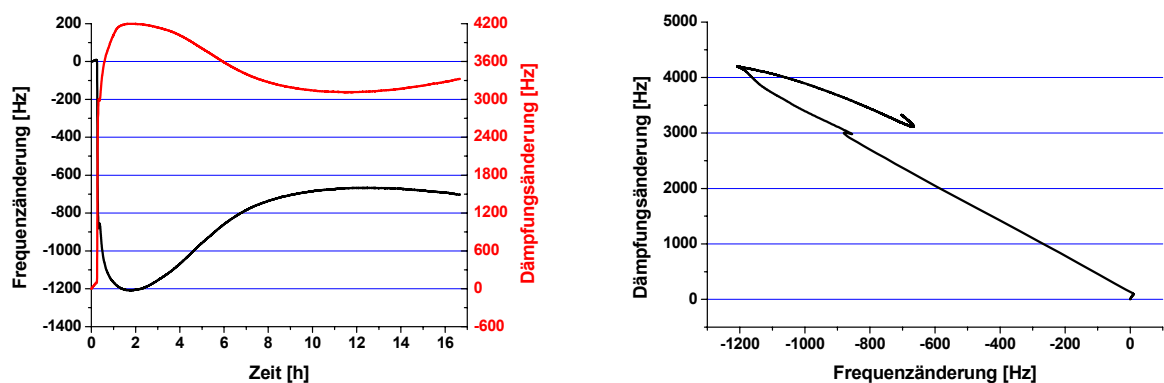


Abbildung 46: Typischer Frequenz- und Dämpfungsverlauf (links) und D/F-Plot (rechts) von DOPE-sLe^x-Liposomen auf einer L-Selektin-Schicht

Es zeigte sich ein abweichendes Verhalten der DOPE-sLe^x-Liposomen von den SPC-sLe^x-Liposomen. Bei den DOPE-Liposomen tritt sehr schnell eine starke Frequenzabnahme ein. Nach ca. 1,5 Stunden wird ein Minimum der Frequenzänderung erreicht. Zum selben Zeitpunkt erreicht auch die Dämpfungsänderung ihren maximalen Wert. Die Werte liegen bei -1205 Hz für die Frequenzänderung und 4055 Hz für die Dämpfungsänderung. Dabei bleibt aber das D/F-Verhältnis von -3,18 während der weiteren Adsorptionsphase konstant. Der Zahlenwert deutet auf die Bindung von intakten Liposomen hin, die allerdings stärker abgeflacht sind als vergleichbare SPC-Liposomen. Das lässt sich aus dem D/F-Quotienten erkennen, der bei den DOPE-Liposomen kleiner ausfällt. Allerdings werden die Liposomen nicht so stark abgeflacht, dass sich eine Aufspreitung auf der Oberfläche mit der Quarzmikrowaage feststellen ließe.

Nach dem Durchschreiten der Extremwerte steigt die Frequenz wieder an und die Dämpfung nimmt ab. Allerdings ändert sich hier das Verhältnis von D/F. Es wird beobachtet, dass die Frequenz stärker wieder zunimmt als die Dämpfung abnimmt. Während der Desorptionsphase beträgt das D/F-Verhältnis -1,91. Anhand der bekannten D/F-Verhältnisse von intakten Liposomen, welche kleiner als -3 sind, erkennt man, dass es sich nicht um die Abspülung intakter Liposomen handelt. Es handelt sich aber auch nicht um die Aufspaltung der intakt adhären Liposomen zu einer Bilayer, denn da wäre genau das gegenteilige Verhalten der Dämpfungsänderung zu erwarten gewesen. Bei der Aufspaltung zu einer Bilayer beobachteten Keller und Kasemo den Rückgang der Dämpfung auf nahezu ihren Ausgangswert, während die Frequenz auf die für eine Bilayer zu erwartende Werte anstieg, dies ergibt ein höheres D/F-Verhältnis der Desorptionsphase als bei der Adsorptionsphase [126]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Überlagerung von Aufspaltung der bereits adhären Liposomen und der weiteren Adhäsion von intakten Liposomen. Anhand der Versuchsergebnisse lässt sich aber keine detailliertere Auswertung eines solchen Sachverhaltes vornehmen.

5.8.6. Zusammenfassung

Die prinzipielle Aussage dieses Kapitels besteht in der Feststellung, dass es mit unserer entwickelten Quarzmikrowaagen-Apparatur möglich ist, die Wechselwirkung supramolekularer Systeme mit der Sensoroberfläche zu erfassen und zu quantifizieren. Dabei spielt die Parallelauswertung der erfassten Parameter Frequenzänderung und Dämpfungsänderung eine entscheidende Rolle. Während anhand des Frequenzverlaufes die Masse der adhären Schicht abgeschätzt werden kann, lässt sich durch die gleichzeitige Erfassung der Dämpfung eine Aussage zur Beschaffenheit dieser Adsorbatschicht treffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Liposomenadhäsion an definierten Oberflächen untersucht, wobei nicht nur das Ausmaß der Adhäsion quantifiziert wurde sondern auch das Verhalten der Liposomen während der Bindung verfolgt werden konnte.

Mit der zeitgleichen Erfassung von Frequenz- und Dämpfungsänderung kann eine klare Aussage über die Beschaffenheit der adhären Liposomen getroffen werden. Am aussagekräftigsten erwies sich dabei das D/F-Verhältnis zur Diskriminierung zwischen intakt adhären, stark abgeflachten bis hin zu vollständig aufgespreiteten Liposomen.

Es zeigte sich, dass bei einem Betrag des D/F-Quotienten kleiner als eins von vollständig adhären platt aufliegenden Liposomen auszugehen ist. Im Bereich von -1 bis -3,5 liegen fest adhären, abgeflachte Liposomen vor. Dabei nehmen mit steigendem Betrag des D/F-Verhältnisses die Abflachung und damit die Abweichung von der Kugelform der

adhärierten Liposomen immer weiter ab. Liegt der Betrag des D/F-Verhältnisses bei Werten größer als 3,5 dann ist das charakteristisch für wenig abgeflachte, nahezu runde Liposomen.

Auch durch Variation der Lipidkomposition lässt sich das Adsorptionsverhalten der Liposomen steuern. Die Ausbildung starker Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Oberfläche begünstigt die Abflachung und Aufspreitung. Solche Wechselwirkungen können durch elektrostatische Kräfte oder spezifische Ligand-Rezeptor-Bindungen realisiert werden. Ebenso konnten wir den fusiogenen Effekt von Ca^{2+} -Ionen reproduzieren. Die Wahl eines fluiden Matrixlipides führt zu einer stärkeren Abflachung der Liposomen während der Adhäsion.

Die Aufspreitung von Liposomen auf einer Oberfläche kann effektiv durch den Einbau von Polyethylenglykol-Seitenketten in die Liposomenmembran verhindert werden. Dabei wird die Liposomenmembran stabilisiert und zudem nach außen hin durch eine starke Hydratschicht abgeschirmt. Als Folge dieser Abschirmung werden die Wechselwirkungen zwischen Liposomenmembran und Oberfläche verringert und zurückgedrängt. Als Resultat wird insgesamt eine verminderte Adhäsion von intakten, kugeligen Vesikeln beobachtet.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten der Quarzmikrowaage als Biosensor zur Analyse von Bindungsereignissen systematisch weiterentwickelt.

Durch apparative Neuerungen konnte das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Es wurden universell einsetzbare Immobilisierungsstrategien für Liganden und Rezeptoren, insbesondere für Proteine auf Goldoberflächen, entwickelt, die den Einsatz der Quarzmikrowaage für nahezu alle Protein-Ligand-Wechselwirkungen ermöglicht. Anhand ausgewählter Beispiele wurde das Potential der Methode zur Bestimmung der kinetischen Konstanten Assoziationsratenkonstante (k_{Ass}), Dissoziationsratenkonstante (k_{Diss}) und Gleichgewichtsbindungskonstante (K_B) untersucht und diskutiert. Damit konnte gezeigt werden, dass die QCM-Technik zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen sehr gut geeignet ist.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen die Quarzmikrowaage als absolut gleichwertigen Konkurrenten zur SPR-Technik erscheinen, da auch Untersuchungen zum direkten Vergleich beider Techniken eine analoge Empfindlichkeit beider Methoden beweisen [197].

Durch die in den letzten Jahren entwickelte Dämpfungsanalyse können zusätzlich die viskoelastischen Eigenschaften der Adsorbatschichten abgeschätzt und Änderungen verfolgt werden. Mit Hilfe des Dämpfungsverlaufs konnte die Adsorption von supramolekularen, speziell liposomalen Systemen an Oberflächen näher charakterisiert werden. Mit der QCM-Technik lässt sich das Verhalten von Vesikeln auf Oberflächen relativ genau abschätzen. Damit bietet sich diese Methode zur Modellierung und Vorhersage des Verhaltens von so genannten Drug-Targeting-Liposomen an. Ein QCM-Screening erlaubt die schnelle und einfache Optimierung von Liposomenformulierungen für einen gezielten Arzneistofftransport zu bestimmten Targetstrukturen. Aufwändige und teure in-vivo und in-vitro Untersuchungen können dadurch eingespart werden.

Der Einsatz der Quarzmikrowaage als Alternative zur mikroskopischen Analyse einer rezeptorvermittelten Zelladhäsion wurde ebenso angestrebt. Es zeigte sich jedoch, dass die Quantifizierung einer Selektin-vermittelten Zelladhäsion mit der QCM-Technik nur bedingt möglich ist und keine Vorteile gegenüber der optischen Auswertung am Mikroskop liefert. Die Ursache ist das komplexe Verhalten lebender Zellen auf das Schwingungsverhalten von Quarzsensoren, welches die schwachen Selektin-Bindungen durch unspezifische Beeinflussungen überdeckt und so deren Erfassung unmöglich macht.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen das große Potential der Quarzmikrowaage zur detaillierten und isolierten Untersuchung vielfältiger biologischer Erkennungsprozesse auf. Da sich bei einer biosensorischen Detektion der zusätzliche Vorteil ergibt, auf Markierungen der Analyten im Gegensatz zu Fluoreszenz- oder radiochemischen Methoden verzichten zu können, ergibt sich ein großes Spektrum potentieller Anwendungsgebiete.

Durch den einfachen Versuchsaufbau bietet sich die QCM-Technik als sehr genaues, schnelles und preiswertes Modellsystem an, das auch für Routineuntersuchungen auf dem Gebiet der pharmazeutischen Analytik verstärkt Anwendung finden sollte. Die hierfür in dieser Arbeit aufgelegte Basis gilt es in weiterführenden Studien in den nächsten Jahren auszunutzen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas. Seine ständige Hilfsbereitschaft und Motivation hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenso gebührt Herrn Dr. Ulrich Rothe mein Dank für die schier unendliche Geduld und Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit, die praktischen Versuche in seinen Arbeitsräumen durchzuführen. Als besonders fruchtbar erwies sich das sehr angenehme Arbeitsklima in beiden Arbeitsgruppen, die mir stets hilfreich und unterstützend zur Seite standen.

AFM-Aufnahmen wurden von Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky angefertigt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Herrn Prof. Dr. Neubert danke ich für die Bereitstellung und die Möglichkeit zur Bearbeitung des sehr interessanten Themas und die freundliche Kooperation.

Finanzielle Unterstützung erhielt ich durch die Deutsche Forschungsgesellschaft und das Wilhelm-Roux-Programm zur Nachwuchs- und Forschungsförderung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Literaturverzeichnis

- 1 Sauerbrey, G.: Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Zeitschrift für Physik* 155 (1959), 206-222.
- 2 Postinkov, I.I.: Effect of temperature on frequency characteristics of contoured quartz thickness-shear-type vibrators. *Acoustical Physics* 40 (1994), 586-592.
- 3 Finkelstein, M., Hahn, H.G.: Schnellschwinger – Schwingquarze in Inverted-Mesa-Technologie erzielen bis 250 MHz in der Grundwelle. *Elektronik Praxis* 14 (2000), 38-42.
- 4 Kanazawa, K.K., Gordon II, G.J.: Frequency of a Quartz Microbalance in contact with liquid, *Anal. Chem.* 57 (1985), 1770-1771.
- 5 Kanazawa, K.K., Gordon II, G.J.: The oscillation frequency of a quartz Resonator in contact with liquid, *Anal. Chim. Acta* 175 (1985), 99-105.
- 6 Borngräber, R.: Quarzresonanzsensoren für flüssige Medien – Systemdesign und Anwendung –, Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2001.
- 7 Sauerbrey, G.: Amplitudenverhalten und elektrische Ersatzdaten von Schwingquarzplatten (AT-Schnitt). Mitteilung aus dem 1. Physikalischen Institut der TU Berlin AEO 18 (1961), 624-628.
- 8 Lucklum, R., Behling, C., Hauptmann, P.: Role of mass accumulation and viscoelastic properties for the response of acoustic-wave-based chemical sensors. *Anal. Chem.* 71 (1999), 2488-2496.
- 9 Larsson, C., Rodahl, M., Höök, F.: Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization on a 2D arrangement of streptavidin on a Biotin-modified lipid bilayer supported on SiO₂. *Anal. Chem.* 75 (2003), 5080-5087.
- 10 Schumacher, R.: Die Quarzmikrowaage: Einen neue Messtechnik zur in-situ-Untersuchung des Phasengrenzbereiches fest/flüssig, *Angew. Chem.* 102 (1990), 347-361.
- 11 Buttry, D.A., Ward, M.D.: Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance, *Chem. Rev.* 92 (1992), 1355-1379.
- 12 O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G.: Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999), 663-670.
- 13 Ali, Z.: Acoustic Wave Mass Sensors, *J. Therm. Anal. Calorim.* 55 (1999), 397-412.
- 14 Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C.: Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik – eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angew. Chem.* 112 (2000), 4164-4195.
- 15 Marx, K.A.: Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface, *Biomacromolecules* 4 (2003), 1099-1120.
- 16 Lu, C.S., Czanderna, A.W.: Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance, Elsevier, New York, 1984.
- 17 King Jr., W.H.: Piezoelectric Sorption Detector, *Anal. Chem.* 36 (1964), 1735-1739.
- 18 Scheide, E.P., Guilbault, G.G.: Piezoelectric Detectors for Organophosphorus Compounds and Pesticides, *Anal. Chem.* 44 (1972), 1764-1768.
- 19 Hlavay, J., Guilbault, G.G.: Detection of Hydrogen Chloride Gas in Ambient Air with a Coated Piezoelectric Quartz Crystal, *Anal. Chem.* 50 (1978), 965-967.
- 20 Hlavay, J., Guilbault, G.G.: Detection of Ammonia in Ambient Air with Coated Piezoelectric Crystal Detector, *Anal. Chem.* 50 (1978), 1044-1046.
- 21 Guilbault, G.G.: Determination of Formaldehyde with an enzyme coated Piezoelectric Crystal, *Anal. Chem.* 55 (1983), 1682-1684.
- 22 Ngeh-Ngwainbi, J., Foley, P.H., Kuan, S.S., Guilbault, G.G.: Parathion Antibodies on Piezoelectric Crystals, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986), 5444-5447.

- 23 MORAGAS – Modular Odor Recognition and Gas Analysis System, Fraunhofer Institut für Biomedizintechnik, Abteilung Sensorsysteme/Mikrosysteme, St. Ingbert
- 24 Höök, F., Rodahl, M., Brzezinski, P., Kasemo, B.: Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance, *Langmuir* 14 (1998), 729-734.
- 25 Höök, F., Rodahl, M., Kasemo, B., Brzezinski, P.: Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998), 12271-12276.
- 26 Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K., Elwing, H.: Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study, *Anal. Chem.* 73 (2001), 5796-5804.
- 27 Xu, H., Schlenhoff, J.B.: Kinetics, Isotherms, and Competition in Polymer Adsorption Using the Quartz Crystal Microbalance, *Langmuir* 10 (1994), 241-245.
- 28 Guo, B., Anzai, J., Osa, T.: Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and the effects of electrode potential, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996), 800-803.
- 29 Caruso, F., Furlong, D.N., Kingshott, P.: Characterization of Ferritin Adsorption onto Gold, *J. Coll. Interf. Sci* 186 (1997), 129-140.
- 30 Stadler, H., Mondon, M., Ziegler, C.: Protein adsorption on surfaces: dynamic contact angle (DCA) and quartz-crystal microbalance measurements, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003), 53-61.
- 31 Cavic, B.A., Thompson, M.: Adsorptions of Plasma Proteins and Their Elutabilities from a Polysiloxane Surface Studied by an On-Line Acoustic Wave Sensor, *Anal. Chem.* 72 (2000), 1523-1531.
- 32 Cavic, B.A., Chu, F.L., Furtado, L.M., Ghafouri, S., Hayward, G.L., Mack, D.P., McGovern, M.E., Su, H., Thompson, M.: Acoustic waves and the real-time study of biochemical macromolecules at the liquid/solid interface, *Faraday Discuss.* 107 (1997), 159-176.
- 33 Richert, L., Lavalle, Ph., Vautier, V., Senger, B., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Picart, C.: Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films, *Biomacromolecules*, 3 (2002), 1170-1178.
- 34 Halthur, T.J., Elofsson, U.M.: Multilayer of Charged Polypeptides As Studied by in Situ Ellipsometry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, *Langmuir* 20 (2004), 1739-1745.
- 35 Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G.D., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Lavalle, P.: Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002), 12531-12535.
- 36 Richert, L., Boulmedais, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.C., Picart, C.: Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking, *Biomacromolecules* 5 (2004), 284-294.
- 37 Baba, A., Kaneko, F., Advincula, R.C.: Polyelectrolyte Adsorption Processes Characterized in-Situ Using the Quartz-Crystal Microbalance Technique - Alternate Adsorption Properties in Ultrathin Polymer-Films, *Colloid Surf. A* 173 (2000), 39-49.
- 38 Salomäki, M., Loikas, K., Kankare, J.: Effect of Polyelectrolyte Multilayers on the Response of a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 75 (2003), 5895-5904.
- 39 Ebara, Y., Okahata, Y.: 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.

- 40 Thompson, M., Arthur, C.L., Dhaliwal, G.K.: Liquid-Phase Piezoelectric and Acoustic Transmission Studies of Interfacial Immunochemistry, *Anal. Chem.* 58 (1986), 1206-1209.
- 41 Davis, K.A., Leary, T.R.: Continuous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for Kinetic Immunoassays, *Anal. Chem.* 61 (1989), 1227-1230.
- 42 Zhang, J., Su, X.D., O'Shea, S.J.: Antibody / antigen affinity behavior in liquid environment with electrical impedance analysis of quartz crystal microbalances, *Biophys. Chem.* 99 (2002), 31-41.
- 43 Köblinger, C., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H.: Quartz crystal microbalance for immunosensing, *Fresenius J. Anal. Chem.* 349 (1994), 349-354.
- 44 Aberl, F., Wolf, H., Köblinger, C., Dost, S., Woias, P., Koch, S.: HIV serology using piezoelectric immunosensors, *Sens. Actuators B* 18 (1994), 271-275.
- 45 Wang, C., Wang, H., Wu, Z., Shen, G., Yu, R.: A piezoelectric immunoassay based on self-assembled monolayers of cystamine and polystyrene sulfonate for determination of *Schistosoma japonicum* antibodies, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2003), 803-809.
- 46 Uttenthaler, E., Köblinger, C., Drost, S.: Quartz crystal biosensor for detection of the African Swine Fever disease, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998), 91-100.
- 47 König, B., Grätzel, M.: A Novel Immunosensor for Herpes Viruses, *Anal. Chem.* 66 (1994), 341-344.
- 48 Attili, B.S., Suleiman, A.A.: A piezoelectric immunosensor for the detection of cortisol, *Anal. Lett.* 28 (1995), 2149-2159.
- 49 Chou, S.F., Hsu, W.L., Hwang, J.M., Chen, C.Y.: Determination of α -Fetoprotein in Human Serum by a Quartz Crystal Microbalance-based Immunosensor, *Clin. Chem.* 48 (2002), 913-918.
- 50 Eun, A.J.C., Huang, L., Chew, F.T., Li, S.F.Y., Wong, S.M.: Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors, *J. Virol. Methods* 99 (2002), 71-79.
- 51 Park, I.S., Kim, D.K., Adanyi, N., Varadi, M., Kim, N.: Development of a direct-binding chloramphenicol sensor based on thiol or sulfide mediated self-assembled antibody monolayers, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004), 667-674.
- 52 Pribyl, J., Hepel, M., Halamek, J., Skladal, P.: Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine, *Sens. Act.* 91 (2003), 333-341.
- 53 Zhou, X.C., Cao, L.: High sensitivity microgravimetric biosensor for qualitative and quantitative diagnostic detection of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, *Analyst* 126 (2001), 71-78.
- 54 Ebersole, R.C., Ward, M.D.: Amplified Mass Immunosorbent Assay with a Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), 8623-8628.
- 55 Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E.: An Aptamer-Based Quartz Crystal Protein Biosensor, *Anal. Chem.* 74 (2002), 4488-4495.
- 56 Jayasena, S.D.: Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, *Clin. Chem.* 45 (1999), 1628-1650.
- 57 Rickert, J., Brecht, A., Göpel, W.: QCM Operation in Liquids: Constant Sensitivity during Formation of Extended Protein Multilayers by Affinity, *Anal. Chem.* 69 (1997), 1441-1448.
- 58 Hengerer, A., Decker, J., Prohaska, E., Hauck, S., Köblinger, C., Wolf, H.: Quartz crystal microbalance (QCM) as a device for the screening of phage libraries, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999), 139-144.
- 59 Hengerer, A., Kösslinger, C., Decker, J., Hauck, S., Queitsch, I., Wolf, H., Dübel, S.: Determination of Phage Antibody Affinities to Antigen by a Microbalance Sensor System, *BioTechniques* 26 (1999), 956-964.

- 60 Janshoff, A., Steinem, C., Sieber, M., Galla, H.J.: Specific binding of peanut agglutinin to G_{MI} -doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements, *Eur. Biophys. J.* 25 (1996), 105-113.
- 61 Muramatsu, H., Dicks, J.M., Tamiya, E., Karube, I.: Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins, *Anal. Chem.* 59 (1987), 2760-2763.
- 62 Eing, A., Janshoff, A., Galla, H.J., Block, C., Steinem, C.: Quantification of the Raf-C1 Interaction With Solid-Supported Bilayers, *ChemBioChem* 3 (2002), 190-197.
- 63 Kastl, K., Ross, M., Gerke, V., Steinem, C.: Kinetics and Thermodynamics of Annexin A1 Binding to Solid-supported Membranes: A QCM Study, *Biochemistry* 41 (2002), 10087-10094.
- 64 Ross, M., Gerke, V., Steinem, C.: Membrane Composition Affects the Reversibility of Annexin A2t Binding to Solid Supported Membranes: A QCM Study, *Biochemistry* 42 (2003), 3131-3141.
- 65 Liu, Y., Yu, X., Zhao, R., Shangguan, D.H., Bo, Z., Liu, G.: Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003), 9-19.
- 66 Liu, Y., Yu, X., Zhao, R., Shangguan, D.H., Bo, Z., Liu, G.: Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003), 1419-1427.
- 67 Alfonta, L., Katz, E., Willner, I.: Sensing of Acetylcholine by a Tricomponent-Enzyme Layered Electrode Using Faradaic Impedance Spectroscopy, Cyclic Voltammetry, and Microgravimetric Quartz Crystal Microbalance Transduction Methods, *Anal. Chem.* 72 (2002), 927-935.
- 68 Uzawa, H., Kamiya, S., Minoura, N., Dohi, H., Nishida, Y., Taguchi, K., Yokoyama, S.I., Mori, H., Shimizu, T., Kobayashi, K.: A Quartz Crystal Microbalance Method for Rapid Detection and Differentiation of Shiga Toxins by Applying a Monoalkyl Globobioside as the Toxin Ligand, *Biomacromolecules* 3 (2002), 411-414.
- 69 Okahata, Y., Matsunobu, Y., Ijiro, K., Mukae, M., Muramaki, A., Makino, K.: Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 8299-8300.
- 70 Yamaguchi, S., Shimomura, T.: Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz Crystal Oscillators, *Anal. Chem.* 65 (1993), 1925-1927.
- 71 Nicolini, C., Erokhin, V., Facci, P., Guerzoni, s., Ross, A., Paschkevitch, P.: Quartz balance DNA sensors, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997), 613-618.
- 72 Caruso, F., Rodda, E., Furlong, D.N.: Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development, *Anal. Chem.* 69 (1997), 2043-2049.
- 73 Wang, J., Nielsen, P.E., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M.: Mismatch-Sensitive Hybridization Detection by Peptide Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 69 (1997), 5200-5202.
- 74 Höök, F., Ray, A., Norden, B., Kasemo, B.: Characterization of PNA and DNA Immobilization and Subsequent Hybridization with DNA Using Acoustic-Shear-Wave Attenuation Measurements, *Langmuir* 17 (2001), 8305-8312.
- 75 Liu, T., Tang, J., Han, M., Jiang, L.: A novel microgravimetric DNA biosensor with high sensitivity, *BBRC* 304 (2003), 98-100.
- 76 Su, X., Robelek, R., Wu, Y., Wang, G., Knoll, W.: Detection of Point Mutation and Insertion Mutations in DNA Using a Quartz Crystal Microbalance and MutS, a Mismatch Binding Protein, *Anal. Chem.* 76 (2004), 489-494.

- 77 Zhou, X.C., Huang, L.Q., Li, S.F.Y.: Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001), 85-95.
- 78 Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M.: Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GOMs) detection, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003), 129-140.
- 79 Okahata, Y., Niikura, K., Sugiura, Y., Sawada, M., Morii, T.: Kinetic Studies of Sequence-Specific Binding of GCN4-bZIP Peptides to DNA Strands Immobilized on a 27-MHz Quartz-Crystal Microbalance, *Biochemistry* 37 (1997), 5666-5672.
- 80 Matsuno, H., Niikura, K., Okahata, Y.: Design and Characterization of Asparagine- and Lysine-Containing Alanine-Based Helical Peptides That Bind Selectively to A•T Base Pairs of Oligonucleotides Immobilized on a 27 MHz Quartz Crystal Microbalance, *Biochemistry* 40 (2001), 3615-3622.
- 81 Niikura, K., Matsuno, H., Okahata, Y.: Direct Monitoring of DNA Polymerase Reactions on a Quartz-Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998), 8537-8538.
- 82 Matsuno, H., Niikura, K., Okahata, Y.: Direct Monitoring Kinetic Studies of DNA Polymerase Reactions on a DNA-Immobilized Quartz Crystal Microbalance, *Chem. Eur. J.* 15 (2001), 3305-3312.
- 83 Matsuno, H., Furusawa, H., Okahata, Y.: Direct monitoring of DNA cleavages catalyzed by an ATP-dependent deoxyribonuclease on a 27 MHz quartz-crystal microbalance, *Chem. Commun.* (2002), 470-471.
- 84 Yang, M., Yau, H.C.M., Chan, H.L.: Adsorption Kinetics and Ligand-Binding Properties of Thiol-Modified Double-Stranded DNA on a Gold Surface, *Langmuir* 14 (1999), 6121-6129.
- 85 Yan, F., Sadik, O.A.: Enzyme-Modulated Cleavage of dsDNA for Studying Interfacial Biomolecular Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), 11335-11340.
- 86 Pope, L.H., Allen, S., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B., Williams, P.M.: Probing DNA Duplex Formation and DNA-Drug Interactions by the Quartz Crystal Microbalance Technique, *Langmuir* 17 (2001), 8300-8304.
- 87 Mao, Y., Wie, W., Zhang, S., Zeng, G.: Monitoring, and estimation of kinetic data, by piezoelectric impedance analysis, of the binding of the anticancer drug mitoxantrone to surface-immobilized DNA, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002), 215-221.
- 88 Gryte, D.M., Ward, M.D., Hu, W.S.: Real-Time Measurement of Anchorage-Dependent Cell Adhesion Using a Quartz Crystal Microbalance, *Biotechnol. Prog.* 9 (1993), 105-108.
- 89 Matsuda, T., Kishida, A., Ebato, H., Okahata, Y.: Novel instrumentation monitoring in situ platelet adhesivity with a quartz crystal microbalance, *ASAIO J.* 138 (1992), M171-173.
- 90 Redepenning, J., Schlesinger, T.K., Mechalke, E.J., Puleo, D.A., Bitios, R.: Osteoblast Attachment Monitored with a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 65 (1993), 3376-3381.
- 91 Dintenfass, L.: Internal viscosity of the red cell: problems associated with definition of plasma viscosity and effective volume of red cells in the blood viscosity equation, *Biorheology* 12 (1975), 253-256
- 92 Nivens, D.E., Chambers, J.Q., Anderson, T.R., White, D.C.: Log-Term, On-Line Monitoring of Microbial Biofilms Using a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 65 (1993), 65-69.
- 93 Bao, L., Deng, L., Nie, L., Yao, S., Wie, W.: Determination of microorganisms with a quartz crystal microbalance sensor, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996), 97-101.

- 94 Bao, L., Deng, L., Nie, D., Yao, S., Wie, W.: A rapid method for determination of *Proteus vulgaris* with a piezoelectric quartz crystal sensor coated with a thin liquid film, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996), 1193-1198.
- 95 Muramatsu, H., Kajiwara, K., Tamiya, E., Karube, I.: Piezoelectric immunosensor for the detection of *Candida albicans* microbes, *Anal. Chim. Acta*, 188 (1986), 257-261.
- 96 Ben-Dov, I., Willner, I., Zisman, E.: Piezoelectric Immunosensors for Urine Specimens of *Chlamydia trachomatis* Employing Quartz Crystal Microbalance Microgravimetric Analyses, *Anal. Chem.* 69 (1997), 3506-3512.
- 97 Carter, R.M., Mekalanos, J.J., Jacobs, M.B., Lubrano, G.J., Guilbault, G.G.: Quartz crystal microbalance detection of *Vibrio cholerae* O139 serotype, *J. Immunol. Meth.* 187 (1995), 121-125.
- 98 Prusak-Sochaczewski, E., Luong, J.H.T., Guilbault, G.G.: Development of a piezoelectrical immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*, *Enzym. Microb. Techn.* 12 (1990), 173-177.
- 99 Pathirana, S.T., Barbaree, J., Chin, B.A., Hartell, M.G., Neely, W.C., Vodyanoy, V.: Rapid and sensitive biosensor for *Salmonella*, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000), 135-141.
- 100 Fung, F.S., Wong, Y.Y.: Self-Assembled Monolayers as the Coating in a Quartz Piezoelectric Crystal Immunosensor To Detect *Salmonella* in Aqueous Solution, *Anal. Chem.* 73 (2001), 5302-5309.
- 101 Bovenizer, J.S., Jacobs, M.B., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G.: The detection of *Pseudomonas aeruginosa* using the quartz crystal microbalance, *Anal. Lett.* 31 (1998), 1287-1295.
- 102 Wong, Y.Y., Ng, S.P., Ng, M.H., Si, S.H., Yao, S.Z., Fung, Y.S.: Immunosensor for the differentiation and detection of *Salmonella* species based on a quartz crystal microbalance, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002), 676-684.
- 103 Plomer, M., Guilbault, G.G., Hock, B.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria, *Enzym. Microb. Techn.* 14 (1992), 230-235.
- 104 Minnuni, M., Mascini, M., Carter, R.M., Jacobs, M.B., Lubrano, G.J., Guilbault, G.G.: A quartz crystal microbalance displacement assay for *Listeria monocytogenes*, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996), 169-174.
- 105 Pavey, K.D., Ali, Z., Olliff, C.J., Paul, F.: Application of the quartz crystal microbalance for the monitoring of *Staphylococcus epidermidis* antigen-antibody agglutination, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999), 241-245.
- 106 Hayden, O., Bindeus, R., Dickert, F.L.: Combining atomic force microscope and quartz crystal microbalance studies for cell detection, *Meas. Sci. Technol.* 14 (2003), 1876-1881.
- 107 Marxer, C.G., Coen, M.C., Greber, T., Greber, U.F., Schlapbach, L.: Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative for viscosity changes, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003), 578-586.
- 108 Kanazawa, K.K.: Mechanical behaviour of films on the quartz microbalance, *Farraday Discuss.* 107 (1997), 77-90.
- 109 Muratsugu, M., Romaschin, A.D., Thompson, M.: Adhesion of human platelets to collagen detected by ^{51}Cr labelling and acoustic wave sensor, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997), 23-29.
- 110 Nimeri, G., Fredriksson, C., Elwing, H., Liu, L., Rodahl, M., Kasemo, B.: Neutrophil interaction with protein-coated surfaces by an extended quartz crystal microbalance technique, *Coll. Surf. B* 11 (1998), 255-264.
- 111 Ebersole, R.C., Foss, R.P., Ward, M.D.: Piezoelectric cell growth sensor, *Bio/Technology* 9 (1991), 450-454.

- 112 Fredriksson, C., Kihlman, S., Rodahl, M., Kasemo, B.: The Piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: A Means of Studying Cell Adhesion, *Langmuir* 14 (1998), 248-251.
- 113 Fredriksson, C., Kihlman, S., Kasemo, B., Steel, D.M.: In vitro real-time characterization of cell attachment and spreading, *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 9 (1998), 785-788.
- 114 Janshoff, A., Wegener, J., Sieber, M., Galla, H.J.: Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators, *Eur. Biophys. J.* 25 (1996), 93-103.
- 115 Wegener, J., Janshoff, A., Galla, H.J.: Cell Adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines, *Eur. Biophys. J.* 28 (1998), 26-37.
- 116 Wegener, J., Seebach, J., Janshoff, A., Galla, H.J.: Analysis of the Composite Response of Shear Wave Resonators to the Attachment of Mammalian Cells, *Biophys. J.* 78 (2000), 2821-2833.
- 117 Zhou, T., Marx, K.A., Warren, M., Schulze, H., Braunhut, S.J.: The Quartz Crystal Microbalance as a Continuous Monitoring Tool for the Study of Endothelial Cell Surface Attachment and Growth, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000), 268-277.
- 118 Cans, A.S., Höök, F., Shupliakov, O., Ewing, A.G., Eriksson, P.S., Brodin, L., Orwar, O.: Measurement of the Dynamics of Exocytosis and Vesicle Retrieval at Cell Populations Using a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 73 (2001), 5805-5811.
- 119 Marx, K.A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H., Braunhut, S.J.: A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001), 773-782.
- 120 Otto, K., Elwing, H., Hermansson, M.: Effect of Ionic Strength on Initial Interactions of *Escherichia coli* with Surfaces, Studied On-Line by a Novel Quartz Crystal Microbalance Technique, *J. Bacteriol.* 181 (1999), 5210-5218.
- 121 Otto, K., Silhavy, T.J.: Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002), 2287-2292.
- 122 Yun, K., Kobatake, E., Haruyama, T., Laukkanen, M.L., Keinänen, K., Aizawa, M.: Use of Quartz Crystal Microbalance to Monitor Immunoliposome – Antigen Interaction, *Anal. Chem.* 70 (1998), 260-264.
- 123 Patolsky, F., Lichtenstein, A., Willner, I.: Electronic Transduction of DNA Sensing Processes on Surfaces: Amplification of DNA Detection and Analysis of Single-Base Mismatches by Tagged Liposomes, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), 5194-5205.
- 124 Alfonta, L., Willner, I., Throckmorton, D.J., Singh, A.K.: Electrochemical and Quartz Crystal Microbalance Detection of the Cholera Toxin Employing Horseradish Peroxidase and GM1-Functionalized Liposomes, *Anal. Chem.* 73 (2001), 5287-5295
- 125 Ohlsson, P.A., Tjärnhage, T., Herbai, E., Löfas, S., Puu, G.: Liposome and proteoliposome fusion onto solid substrates, studied using atomic force microscopy, quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance. Biological activities of incorporated components, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38 (1995), 137-148.
- 126 Keller, C.A., Kasemo, B.: Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, *Biophys. J.* 75 (1995), 1397-1402
- 127 Zhdanov, V.P., Keller, C.A., Glasmästar, K., Kasemo, B.: Simulation of adsorption kinetics of lipid vesicles, *J. Chem. Phys.* 112 (2000), 900-909
- 128 Reviakine, I., Brisson, A.: Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles investigated by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 16 (2000), 1806-1815
- 129 Seifert, U.: Configurations of fluid membranes and vesicles, *Adv. Phys.* 46 (1997), 13-137.

- 130 Lipowsky, R., Seifert, U.: Adhesion of vesicles and membranes, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 202 (1991), 17-25
- 131 Richter, R., Mukhopadhyay, A., Brisson, A.: Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study, *Biophys. J.* 85 (2003), 3035-3047
- 132 Reimhult, E., Höök, F., Kasemo, B.: Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size, *J. Chem. Phys.* 117 (2002), 7401-7404
- 133 Voinova, M.V., Rodahl, M., Jonson, M., Kasemo, B.: Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach, *Phys. Scr.* 59 (1999), 391-399
- 134 Stalgren, J.J.R., Claesson, P.M., Wårnheim, T.: Adsorption of liposomes and emulsions studied with a quartz crystal microbalance, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 89-90 (2001), 383-394.
- 135 Granéli, A., Rydström, J., Kasemo, B., Höök, F.: Formation of Supported Lipid Bilayer Membranes on SiO₂ from Proteoliposomes Containing Transmembrane Proteins, *Langmuir* 19 (2003), 842-850.
- 136 Liebau, M., Hildebrandt, A., Bendas, G., Rothe, U., Neubert, R.H.H.: Entwicklung eines Bioadhäsionsmodells auf der Basis der Quarzmikrobalance für die Charakterisierung pharmazeutischer Vehikelsysteme, 1. Teil: Einführung und Methoden, *Pharm. Ind.* 61 (1999), 459-462; 2. Teil: Ergebnisse und Diskussion, *Pharm. Ind.* 61 (1999), 558-563.
- 137 Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H.J., Fuchs, H., Janshoff, A.: Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance, *Biophys. J.* 78 (2000), 487-498.
- 138 Reiss, B., Janshoff, A., Steinem, C., Seebach, J., Wegener, J.: Adhesion Kinetics of Functionalized Vesicles and Mammalian Cell: A Comparative Study, *Langmuir* 19 (2003), 1816-1823.
- 139 Ebersole, R.C., Miller, J.A., Moran, J.R., Ward, M.D.: 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.
- 140 Davis, K.A., Leary, T.R.: Continuous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for Kinetic Immunoassays, *Anal. Chem.* 61 (1989), 1227-1230.
- 141 Ebersole, R.C., Ward, M.D.: Amplified Mass Immunosorbent Assay with a Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), 8623-8628.
- 142 Uttenthaler, E., Köblinger, C., Drost, S.: Quartz crystal biosensor for detection of the African Swine Fever disease, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998), 91-100.
- 143 Su, H., Kallury, K.M.R., Thompson, M., Roach, A.: Interfacial Nucleic Acid Hybridization Studied by Random Primer 32P Labeling and Liquid-Phase Acoustic Network Analysis, *Anal. Chem.* 66 (1994), 769-777
- 144 Chance, J.J., Purdy, W.C.: Evaluation of amine-functionalized coatings for liquid-phase QCM applications, *Thin Solid Films* 335 (1998), 237-244.
- 145 Towery, R.B., Fawcett, N.C., Zhang, P., Evans, J.A.: Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001), 1-8.
- 146 Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R., Dubois, L.H.: Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Au (1 1 1). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987), 733-740.
- 147 Fenter, P., Eberhardt, A., Eisenberger, P.: Self-assembly of n-alkyl thiols as disulfides on Au (111), *Science* 266 (1994), 1216-1218.

- 148 Kluth, G.J., Cararro, C., Maboudian, R.: Direct Observation of sulfur dimers in alkanethiol self assembled monolayers on Au(111), *Phys. Rev. B* 59 (1999), R10449-R10452.
- 149 Nuzzo, R.G., Fusco, F.A., Allara, D.L.: Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 3. Preparation and Properties of Solution Adsorbed Monolayers of Organic Disulfides on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987), 2358-2368.
- 150 Ulman, A.: Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem. Rev.* 96 (1996), 1533-1554.
- 151 Dubois, I.H., Nuzzo, R.G.: Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43 (1992), 437-463.
- 152 Dannenberger, O., Weiss, K., Himmel, H., Jäger, B., Buck, M., Wöll, U.: An orientation analysis of differently endgroup-functionalised alkanethiols adsorbed on Au substrates, *Thin Solid Films*, 307 (1997), 183-191.
- 153 Bain, C.D., Troughton, E.B., Tao, Y.T., Evall, J., Whitesides, G.M., Nuzzo, R.G.: Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989), 321-335.
- 154 Okahata, Y., Matsunobu, Y., Ijiro, K., Mukae, M., Murakami, A., Makino, K.: Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 8299-8300.
- 155 Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H.J., Fuchs, H., Janshoff, A.: Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance, *Biophys. J.* 78 (2000), 487-498.
- 156 Zhou, X.C., Huang, L.Q., Li, S.F.Y.: Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001), 85-95.
- 157 Caruso, F., Rodda, E., Furlong, D.N.: Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development, *Anal. Chem.* 69 (1997), 2043-2049.
- 158 Yamaguchi, S., Shimomura, T., Tatsuma, T., Oyama, N.: Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz Crystal Oscillators, *Anal. Chem.* 65 (1993), 1925-1927.
- 159 Riepl, M., Mirsky, V.M., Novotny, I., Tvarozek, V., Rehacek, V., Wolfbeis, O.S.: Optimization of capacitive affinity sensors: drift suppression and signal amplification, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999), 77-84.
- 160 Lee, M.T., Hsueh, C.C., Freund, M.S., Ferguson, G.S.: Electrochemical Self-Assembly of Monolayers from Alkylthiosulfates on Gold, *Langmuir* 19 (2003), 5246-5253.
- 161 Blodgett, K.B., Langmuir, I.: Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties, *Phys. Review* 51 (1937), 964-982.
- 162 Ijiro, K., Ringsdorf, H., Birch-Hirschfeld, E., Hoffmann, S., Schilken, U., Strube, M.: Protein-DNA Double and Triple Layers: Interaction of Biotinylated DNA Fragments with Solid Supported Streptavidin Layers, *Langmuir* 14 (1998), 2796-2800.
- 163 Vikholm, I., Albers, W.M.: Oriented Immobilization of Antibodies for Immunosensing, *Langmuir* 14 (1998), 3865-3872.
- 164 Keller, C.A., Glasmästar, K., Zhdanov, V.P., Kasemo, B.: Formation of Supported Membranes from Vesicles, *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000), 5443-5446.
- 165 Höök, F., Ray, A., Norden, B., Kasemo, B.: Characterization of PNA and DNA Immobilization and Subsequent Hybridization with DNA Using Acoustic-Shear-Wave Attenuation Measurements, *Langmuir* 17 (2001), 3805-3812.

- 166 Decker, J., Weinberger, K., Prohaska, E., Hauck, S., Kößlinger, C., Wolf, H., Hengerer, A.: Characterization of a human pancreatic secretory trypsin inhibitor mutant binding to *Legionella pneumophila* as determined by a quartz crystal microbalance, *J. Immunol. Meth.* 233 (2000), 159-165.
- 167 Sweryda-Krawiec, B., Devaraj, H., Jacob, G., Hickman, J.J.: A New Interpretation of serum Albumin Surface Passivation, *Langmuir* 20 (2004), 2054-2056.
- 168 Tombelli, S., Mascini, M., Turner, A.P.F.: Improved procedures for immobilization of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002), 929-936.
- 169 Pale-Grosdemange, C., Simon, E.S., Prime, K.L., Whitesides, G.M.: Formation of Self-Assembled Monolayers by Chemisorption of Derivatives of Oligo(ethylene glycol) of Structure $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$ on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), 12-20.
- 170 Prime, K.L., Whitesides, G.M.: Adsorption of Proteins onto Surfaces Containing End-Attached Oligo(ethylene oxide): A Model System Using Self-Assembled Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993), 10714-10721.
- 171 Bamdad, C.: A DNA Self-Assembled Monolayer for the Specific Attachment of Unmodified Double- or Single-Stranded DNA, *Biophys. J.* 75 (1998), 1997-2003.
- 172 Herne, T.M., Tarlov, M.J.: Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), 8916-8920.
- 173 Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G.: Sulfur based self-assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999), 54-57.
- 174 Liebau, M.: Resonante Quarzsensoren zum Nachweis von Wechselwirkungen supramolekularer Systeme, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1998.
- 175 King, D.E.: Oxidation of gold by ultraviolet light and ozone at 25 °C, *J. Vac. Sci. Technol.* 13 (1995), 1247-1253.
- 176 Green, N.M.: Avidin, *Adv. Protein Chem.* 29 (1975), 85-133.
- 177 Vogel, J.: Aufklärung der molekularen Mechanismen des Selektin-vermittelten Leukozytenrollens als Grundlage für eine antiinflammatorische Therapie, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2000.
- 178 Chen, J., Anderson, J.B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N.D., Geer, L.Y., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Marchler, G.H., Mazumder, R., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Panchenko, A.R., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P.A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Bryant, S.H.: MMDB: Entrez's 3D-structure database, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003), 474-477.
- 179 Wakamatsu, K., Hosoda, K., Mitomo, H., Ohya, M., Okahata, Y., Yasunaga, K.: Direct in Situ Measurement of Phospholipid Hydration in an Aqueous Environment Using a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 67 (1995), 3336-3341.
- 180 König, B., Grätzel, M.: A piezoelectric immunosensor for hepatitis viruses, *Anal. Chim. Acta* 309 (1994), 19-25.
- 181 Pei, R.J., Hu, J.M., Hu Y., Zeng, Y.: A Piezoelectric Immunosensor for Complement C4 Using Protein A Oriented Immobilization of Antibody, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73 (1998), 59-63.
- 182 Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., Rand, A.G.: Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000), 615-621.
- 183 Schneidert, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U., Greaves, M.F.: A One-step Purification of Membrane Proteins Using a High Efficiency Immunomatrix, *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 10766-10769.

-
- 184 Rosen, S.D.: Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004), 129-156.
- 185 Zhao, S., Reichert, W.M.: Influence of Biotin Lipid Surface Density and Accessibility on Avidin Binding to the Tip of an Optical Fiber Sensor, *Langmuir* 8 (1992), 2785-2791.
- 186 Perez-Luna, V.H., M.J. O'Brien, Oppermann, K.A., Hampton, P.D., Lopez, G.P., Klumb, L.A., Stayton, P.S.: Molecular Recognition between Genetically Engineered Streptavidin and Surface-Bound Biotin, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), 6469-6478.
- 187 Jung, L.S., Nelson, K.E., Stayton, P.S., Campbell, C.T.: Binding and Dissociation Kinetics of Wild-Type and Mutant Streptavidins on Mixed Biotin-Containing Alkylthiolate Monolayers, *Langmuir* 16 (2000), 9421-9432.
- 188 Mrksich, M., Grunwell, J.R., Whitesides, G.M.: Biospecific Adsorption of Carbonic Anhydrase to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates That Present Benzenesulfonamide Groups on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995), 12009-12010.
- 189 Su, H., Thompson, M.: Kinetics of interfacial nucleic acid hybridization studied by acoustic network analysis, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995), 329-340.
- 190 Meinkoth, J., Wahl, G.: Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports, *Anal. Biochem* 138 (1984), 267-284.
- 191 Höpfner, M.: Untersuchung von potentiellen Selektin-Inhibitoren mit Heparin-ähnlicher Struktur in einem dynamischen Testsystem, Diplom, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- 192 Schumacher, G.: Dynamisches Testsystem zur Untersuchung der Bindungseigenschaften im Selektin-vermittelten Zellrollprozess und zum Screening potentieller Wirkstoffe, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003
- 193 Harms, G., Kraft, R., Grelle, G., Völz, B., Dervede, J., Tauber, R.: Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand, *Biochem. J.* 360 (2001), 531-538.
- 194 Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C.A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M., Kasemo, B.: Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion, *Farraday Discuss*, 107 (1997), 229-246.
- 195 Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, S.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B.K. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl LewisX oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117 (1992), 895-902.
- 196 Pinnaduwege, P., Huang, L.: Stable Target-Sensitive Immunoliposomes, *Bochemistry* 31 (1992), 2850-2855.
- 197 Kößlinger, C., Uttenthaler, E., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H., Brink, G., Stanglmaier, A., Sackmann, E.: Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications, *Sens. Actua. B* 24 (1995), 107-112.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, 18. November 2004

Lebenslauf

Name	Matthias Höpfner
Vater	Frank Heinz Höpfner geboren am 16.11.1949 in Reinsdorf
Mutter	Ute Else Höpfner geborene Müller, am 07.04.1951 in Zwickau
14.07.1975	Geburt in Zwickau
01.09.1982	Einschulung in die POS "Friedrich Engels" in Zwickau
01.09.1990	Wechsel zum "Käthe-Kollwitz-Gymnasium" in Zwickau
24.06.1994	Abschluß des Gymnasiums und Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
01.07.1994 - 30.06.1995	Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr
01.10.1995	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität in Halle/Saale
29.08.1997	Erste Pharmazeutische Staatsprüfung, Note 1,25
02.09.1999	Zweite Pharmazeutische Staatsprüfung, Note 1,25
01.10.1999- 31.03.2000	Erste Hälfte des Praktischen Jahres im Rahmen der Ausbildung zum Apotheker in der Minerva Apotheke, Leipzig
01.04.2000- 30.09.2000	Anfertigung einer Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Pharmazie
17.10.2000	Dritte Pharmazeutische Staatsprüfung, Note 2,0
Seit 01.10.2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bendas, Prof. Dr. Neubert (FB Pharmazie) und Dr. Rothe (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät) an der Martin-Luther-Universität Halle

Halle / Saale, 18. November 2004