

**Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) zur
markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von
Armin Schütz

Tag der mündlichen Prüfung:	03.April 2000
Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Hoffmann

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die interessante Aufgabenstellung, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen, für seine stete Unterstützung und für das große Vertrauen, das er in mich setzte.

Herrn Prof. Dr. Volker Hoffmann danke ich für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse an dieser Arbeit.

Andreas Brecht danke ich für seine Hilfe und seine ständige Bereitschaft, sich allen Fragen anzunehmen. Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe - insbesondere der den Leuten aus dem 8. Stock - für die nette Aufnahme in den Kreis der Chemiker als einfacher Biologe und Saarländer und für die hilfsbereite und fröhliche Zusammenarbeit. Namentlich möchte ich Matthias Rothmund danken, mit dem es richtig Spaß machte, über alles zu diskutieren, und Jacob Piehler, der es auf sich nahm, den „Almut“-Nachfolger in die Geheimnisse der PC einzuweisen.

Allen LIBRARIAN-Projektpartnern danke ich für ihre konstruktive Zusammenarbeit. Bei Frau Dr. Karin Adelhelm aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Susanne Grabley am HKI Jena möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und die Überlassung des EBP besonders bedanken.

All denen, die mir privat zur Seite standen und auf die ich mich stets verlassen konnte, kann ich gar nicht genug danken.

Inhaltsangabe

1 Einleitung	1
1.1 <i>Motivation der Arbeit</i>	2
1.2 <i>Zielsetzung und Gliederung der Arbeit</i>	3
2 Grundlagen	5
2.1 <i>Analytische Methoden im HTS</i>	5
2.1.1 Wirkstoffsuche in der pharmazeutischen Forschung	5
2.1.2 Probenräger und Probenhandhabung	7
2.1.3 Testformate im HTS	8
2.2 <i>Grundlagen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie und deren Parallelisierung</i>	12
2.2.1 Reflexion und Transmission des Lichtes	12
2.2.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)	14
2.2.3 Parallelisierung von RIfS	17
2.3 <i>Biochemische Grundlagen der untersuchten Biomoleküle</i>	18
2.3.1 Thrombin	21
2.3.2 Östrogen bindende Protein (EBP) aus <i>Candida albicans</i>	23
2.3.3 DNA und DNA-Interkalatoren	24
2.4 <i>Oberflächenmodifikationen zur elektrostatischen und kovalenten Bindung von Liganden</i>	25
2.4.1 Immobilisierung von DNA auf Glastransducern über elektrostatische Wechselwirkungen	26
2.4.2 Kovalente Kupplung niedermolekularer Liganden über funktionelle Gruppen	26
3 Material und Methoden	31
3.1 <i>Materialien</i>	31
3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien	31
3.1.2 Lösungen	32
3.1.3 Geräte	33
3.2 <i>Methoden</i>	37

3.2.1 Modifikation der Transduceroberflächen im Einkanalssystem	37
3.2.2 Modifikation der Transduceroberflächen im parallelen System	39
3.2.3 Bindungshemmtest	40
4 Ergebnisse und Diskussion	41
<i>4.1 Bindungshemmtest in ruhenden Proben</i>	<i>41</i>
4.1.1 Theoretische Charakterisierung des Bindungshemmtests in ruhenden Systemen	42
4.1.2 Charakterisierung der Affinität von Thrombin zu kompetitiven Inhibitoren mittels Bindungshemmtests in ruhenden Proben	59
4.1.3 Bindungshemmtests von Thrombininhibitoren mit kleinem Probenvolumen	67
<i>4.2 Untersuchung des Östrogen bindenden Proteins (EBP) von Candida albicans mittels RfS</i>	<i>70</i>
4.2.1 Charakterisierung von EHS-Transducern	70
4.2.2 Untersuchung von EBP-Kompetitoren	72
<i>4.3 Assayentwicklung für ein paralleles RfS-Detektionssystem</i>	<i>79</i>
4.3.1 Untersuchungen des ersten parallelen RfS-Aufbaus Demonstrator 0a	79
4.3.2 Untersuchungen des parallelen RfS-Aufbaus Demonstrator 0b	84
4.3.3 Untersuchungen des parallelen RfS-Aufbaus Demonstrator 1 für 96er Standard-Mikrotiterplatten (MTP)	91
<i>4.4 Oberflächenmodifikation von RfS-Transducern</i>	<i>96</i>
5 Zusammenfassung und Ausblick	99
6 Literatur	103
7 Anhang	113
<i>7.1 Abkürzungen</i>	<i>113</i>
<i>7.2 Veröffentlichungen</i>	<i>115</i>
<i>7.3 Akademische Lehrer</i>	<i>116</i>
<i>7.4 Lebenslauf</i>	<i>117</i>

1 Einleitung

Seit einigen Jahren geht die chemische und pharmazeutische Forschung auf der Suche nach neuen Wirkstoffen für kommende Medikamente und Agrarchemikalien neue Wege. Diese eröffneten sich aus der Möglichkeit heraus, eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Substanzen durch kombinatorische Synthese für die Wirkstoffsuche bereitzustellen. Einen umfassenden Überblick über „kombinatorische Chemie“ gibt G. Jung 1996 in seinem Buch. Aus dieser Syntheseart aber auch aus den zunehmenden Erfolgen der Naturstoffforschung und -isolierung (Caporale 1995) erwachsen Substanzbibliotheken mit einigen Hunderttausend unterschiedlicher Strukturen, die alle auf eine mögliche Wirkung überprüft werden sollen.

Diese große Zahl an Analysen, die hier zu machen wären, ziehen große Anforderungen im Bereich der Logistik, Analytik und natürlich der Datenaus- und bewertung nach sich, dem sich der Forschungsbereich des Hochdurchsatzscreenings (HTS) verschrieben hat. Unter Hochdurchsatz versteht man dabei ein Testaufkommen von etwa 100.000 Assays pro Monat und im sogenannten ultra-HTS oder uHTS, das sich seit dem letzten Jahr immer mehr etabliert, rechnet man auch schon mit 100.000 Assays pro Tag (Koltermann *et al.* 1998). Die benötigte Analysemethode sollte dabei natürlich bestimmte Forderungen erfüllen, von denen die wichtigsten die

- Stabilität
- einfache Handhabung
- Automatisierbarkeit
- und Parallelisierbarkeit

darstellen. Große Verbreitung haben in der HTS-Analyse optische Methoden, die meist unter Zuhilfenahme einer Markierung wie z.B. Fluorophore oder Enzyme funktionieren. Der Assay wird in der Regel in einer Standardmikrotiterplatte (MTP) durchge-

führt. Diese bietet den Vorteil, in ihr nicht nur den Assay durchführen, sondern auch in diesen Platten ohne Transfer der Probe den Assay auslesen zu können. Die Anzahl der Kavitäten dieser Platten geht von 96 über 384 bis hin zu 1536 und höher und zeigt, daß nur mit Hilfe dieser Probenträger der geforderte Durchsatz zu erreichen ist.

1.1 Motivation der Arbeit

Vor dem Hintergrund des HTS lag die Motivation dieser Arbeit in der Entwicklung und Durchführung von Testformaten und Assays auf einem optischen Meßsystem zur Erkennung biomolekularer Wechselwirkungen, die auch Bestand im HTS haben können. Bei der optischen Methode handelte es sich um die reflektometrische Interferenzspektroskopie (*RIfS*), wobei der benötigte Durchsatz für ein HTS durch Parallelisierung erreicht werden sollte. Um die besonderen Anforderungen, die in dieser Arbeit bearbeitet wurden, zu verstehen, ist ein Überblick über die Wirkweise der eingesetzten Detektionsmethode oder ähnlicher Systeme sinnvoll. *RIfS*, aber auch andere Methoden wie die Plasmonenresonanzspektroskopie (SPR), die Ellipsometrie, der Gitterkoppler und der Prismenkoppler (resonant mirror), um nur die wichtigsten optischen Methoden zu nennen, haben gemein, daß sie Veränderungen an der Phasengrenze zwischen Probe und Transducer detektieren. Die physikalische Grundlage ist dabei recht verschieden. Während bei der SPR die durch Brechungsindexänderung hervorgerufene Verschiebung der Resonanzenergie eines Oberflächenplasmons gemessen wird (Liedberg *et al.* 1983) sind es beim Prismenkoppler die Änderung der Kopplungsbedingungen eines isolierten Schichtwellenleiters (Cush *et al.* 1993), beim Gitterkoppler die Verschiebung des Kopplungswinkels des optischen Gitters (Nellen *et al.* 1988) und bei *RIfS* die Änderung des Interferenzmusters einer dünnen Schicht (Gauglitz *et al.* 1993). Alle können dazu benutzt werden, biomolekulare Wechselwirkungen zu detektieren, unter der Voraussetzung, daß einer der Bindungspartner auf der Transduceroberfläche immobilisiert vorliegt. Die Attraktivität dieser Methode liegt in der Möglichkeit, markierungsfrei arbeiten und die Interaktion zeitaufgelöst verfolgen zu können. Damit lassen sich unterschiedliche Größen dieser Wechselwirkung bestimmen, wie etwa kinetische oder thermodynamische Konstanten (Haake *et al.* 2000). Aus diesen Gründen sind markie-

rungsfreie Methoden auch auf ein großes Spektrum unterschiedlicher biologischer Systeme anwendbar und sind somit auch für ein Screening nach neuen Wirkstoffen interessant (Markgren *et al.* 1999).

Der Einsatz im HTS ist bislang keiner Methode gelungen, da es den kommerziell erhältlichen Systemen an nötigem Durchsatz fehlt. Somit sind zwar in den kommerziellen Systemen zwei bis vier Meßzellen zur parallelen Detektion vorhanden, doch stellt dies keinen Durchsatz im Sinne des HTS dar, sondern dient lediglich der Referenzierung bei hohen Matrixeffekten der Probe (Karlsson *et al.* 1995). Dem gegenüber wurde ein paralleles *RfS*-Detektionssystem auf Basis der 96er Standard-Mikrotiterplatte entwickelt (Brecht *et al.* 1996, Rothmund *et al.* 1997, Rothmund 1999), das es erlaubt, biomolekulare Wechselwirkungen simultan in 96 Proben zeitaufgelöst zu verfolgen.

1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es nun, anhand verschiedener Enzyme bzw. Rezeptoren, die als Modelltargets für ein HTS dienen, Testformate und Assays für das parallelisierte *RfS*-Detektionsmodul zu schaffen und ihre Anwendbarkeit in einem geplanten HTS zu prüfen. Als Targets fungierte unter anderem die Protease Thrombin mit verschiedenen kompetitiven Inhibitoren und das Östrogen bindende Protein (EBP) mit einer Reihe von Kompetitoren. Das Thrombin-System eignete sich in besonderer Weise zur Charakterisierung des Testformats „Bindungshemmtest“, das zunächst in einem Einkanal-system entwickelt wurde und später auf ein paralleles System übertragen werden sollte. In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage erörtert werden, in wieweit die Dissoziationsratenkonstante des Rezeptor-Ligand-Komplexes Auswirkung auf das Testresultat hat. Aus diesem Grund wurde u.a. auch eine theoretische Abschätzung dieses Einflusses vorgenommen.

Den theoretischen Berechnungen und der Überprüfung im Einkanalgerät mit dem Thrombin-Inhibitor-System folgte die Untersuchung eines ähnlichen Targets, die des EBP. Anschließend wurden drei Generationen von parallelen *RfS*-Detektionsmodulen getestet, Protokolle zur Modifikation der Transducer entwickelt und Tests mit den Targets durchgeführt. Im Kapitel Grundlagen wird ein kurzer Abriß bestehender HTS-

Methoden und der im HTS zur Zeit wichtigsten untersuchten Targets gegeben, die optische Methode *RfS* erklärt und die Idee einer möglichen und später auch durchgeführten Parallelisierung aufgezeigt. Die Biochemische Grundlagen biomolekularer Wechselwirkungen und eine Charakterisierung der untersuchten Targets werden ebenfalls kurz vorgestellt.

2 Grundlagen

2.1 Analytische Methoden im HTS

2.1.1 Wirkstoffsuche in der pharmazeutischen Forschung

Die Fortschritte in der Erforschung der molekularen Vorgänge des Lebens haben auch in der pharmazeutischen Wirkstoffsuche Veränderungen hervorgerufen. So ist es heute vielfach möglich, einem bestimmten Krankheitsbild bzw. Leiden seine molekulare Ursache zuzuordnen. Es liegt somit nahe, spezielle Wirkstoffe gegen bzw. für diese Zielmoleküle, auch Targets genannt, zu suchen. Solche Targets finden sich bei allen Klassen von Biomolekülen wie den Proteinen, Nukleinsäuren oder den die Zellmembran bildenden Lipiden. Doch während der Wirkmechanismus der Substanzen bei Nukleinsäuren und Lipiden meist allgemeiner Natur ist, wie etwa der Interkalierung eines Wirkstoffes in die DNA viral befallener oder tumoröser Zellen, ist bei der großen Klasse der Proteine meist eine ganz spezielle Struktur als Wirkstoff von Nöten. Dies führt zu dem Problem, daß jedes Protein in seiner molekularen Struktur aufgeklärt und ein passender Wirkstoff entworfen werden muß. Die Primärstruktur des Proteins, d.h. die Abfolge der Aminosäuren, ist in vielen Fällen durch die Gensequenzierung schon erreicht, dennoch fehlt es oft an Daten über die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins. Diesem Gebiet hat sich das Forschungsfeld der „Proteomics“ verschrieben, das neben der Suche nach Targets, d.h. der molekularen Ursache einer Krankheit, auch die Struktur des Targets aufzuklären versucht (Loo *et al.* 1999).

Das pharmazeutische Screening beschreitet dagegen einen empirischen Weg. Hier gilt es, Substanzen auf eine vorhandene Wirkung auf das untersuchte Target zu testen, ohne besondere Kenntnis der molekularen Struktur des Targets bzw. der Wirkweise der Substanz. Dies macht natürlich nur Sinn, wenn die Anzahl der getesteten Substanzen

hoch genug ist, um mit einiger Wahrscheinlichkeit einen geeigneten Wirkstoff bzw. eine Leitstruktur für einen Wirkstoff, auch „Lead“ genannt, zu finden. Für die ausreichend hohe Anzahl an Substanzen sorgen zwei unterschiedliche Forschungsfelder, die Isolierung von Naturstoffen (Quinn 1999) und die Synthese von Substanzen mit kombinatorischen Mitteln (Desai *et al.* 1994, Terrett *et al.* 1995). Diese Substanzen werden in sogenannten Bibliotheken gesammelt und verwaltet und erreichen einen Bestand zwischen 10 bis 300 Tausend Substanzen, die in den meisten Fällen über eine hohe Diversität verfügen und meist niedermolekulare Strukturen aufweisen (Parks *et al.* 1998). Eine solch hohe Anzahl an Tests müssen natürlich mit einem hohem Durchsatz durchgeführt werden, dessen Realisierung sich das Forschungsfeld des High Throughput Screenings widmet.

Der Durchsatz an Tests wird noch dadurch erhöht, daß alle Substanzen auf eine immer größer werdende Anzahl verschiedenster Targets getestet werden müssen. Die großen Fortschritte im „Human Genom Projekt“ führen nämlich ständig zu immer neueren Entdeckungen von möglichen Targets, für die im Moment zwar noch die genaue Funktion und damit der Zusammenhang zwischen Target und Krankheit fehlt, die aber für die pharmazeutische Industrie sehr interessant sind. Zu den zur Zeit im HTS getesteten Targets zählen unter anderem Kinasen, Enzyme, die eine Phosphorylierung an ihrem Substrat durchführen und wichtig für die Signalübertragung in der Zelle sind (Hardcastle *et al.* 1999), Enzyme des Stoffwechsels wie beispielsweise Proteasen, die eine wichtige Rolle im Infektionszyklus von Viren spielen (Zhang *et al.* 1999), oder Rezeptoren, die membrangebunden bzw. zyto- oder nukleoplasmatisch vorliegen und der Signalübertragung bzw. Genregulation dienen (Mellentin-Michelotti *et al.* 1999). Für alle diese unterschiedlichsten Targets werden im HTS Assays entwickelt, um neue Leitstrukturen für Wirkstoffe zu finden. Dies zieht aber auch die Entwicklung unterschiedlichster Analyseverfahren nach sich, um dieses Ziel zu erreichen. Ein kurzer Überblick der zur Zeit angewendeten Analyseverfahren ist in Kapitel 2.1.3 gegeben.

2.1.2 Probenträger und Probenhandhabung

Der Hochdurchsatz im HTS ist nur durch Automation und Parallelisierung zu erreichen. Aus diesem Grund sind die Probenträger und die Probenhandhabung auf diese Ansprüche abgestimmt. Als Probenträger hat sich vor allem die Mikrotiterplatte (MTP) durchgesetzt, die mit einer unterschiedlichen Anzahl an Kavitäten von 96 über 384 bis 1536 in standardisierten Abmessungen erhältlich ist. Die Probenvolumen reichen dabei von 200-100 μL über 50-10 μL bis hin zu 5-1 μL (Comley *et al.* 1999). Darüber hinaus gibt es MTP mit Zwischenmaßen, wie etwa der 864er-Platte (Martens *et al.* 1999) oder Probenträger mit sehr hoher Kavitätdichte wie z.B. die 3456-Platte der Firma Aurora Biosciences Corp. oder die 8640 Kavitäten Platte der Firma Abbott Laboratories. Damit bieten diese Assayplattformen zwar einen hohen Durchsatz, im Verbrauch von Lösungen sind sie aber immer noch über einem Volumen 0,5-1 μL . Abhilfe werden hier in nächster Zukunft neue formatunabhängige Plattformen schaffen, wie etwa das Acumen-System der Firma „The Technology Partnership“, das einen Probenträger in Form einer schmalen strukturierten Kunststoffolie mit Probenvolumen unter 1 μL verwendet, oder Probenträger, die Kavitäten mit einem Fassungsvermögen von wenigen Nanolitern benutzen (Brecht *et al.* 1998).

Die Probenhandhabung ist natürlich in ihren Dimensionen den eingesetzten Probenträgern angepaßt und automatisiert. Man kann hier zwischen Systemen unterscheiden, die entweder eine ganze Platte simultan oder sequentiell eine Reihe der Kavitäten nach der anderen befüllen. Die mit diesen Geräten, die einen Kolbenhub ausnutzen, handhabbare Volumen reichen bis zu 0,5 μL (Stevens *et al.* 1998). Für Systeme zur Handhabung kleinerer Volumen haben sich sogenannte Mikrodosiersysteme, die mit Tintenstrahl-drucktechnik arbeiten, durchgesetzt. Dabei sind drei verschiedene Aktoren in Anwendung: Thermische (Lee *et al.* 1998), magnetische (Lemmo *et al.* 1997) und piezoelektrische (Nilsson *et al.* 1993, Schober *et al.* 1993, Fischer-Frühholz 1997).

Der Einsatz dieser Probenträger und der Probenhandhabung ist so in das HTS integriert, daß schon in einem sehr frühen Stadium des HTS, dem Anfertigen von Stammlösungen der einzelnen Substanzen aus der Bibliothek heraus, diese Platten verwendet werden (die sog. Mutterplatten). Es wurden bereits auch Techniken vorgestellt, die die

Synthese der Bibliotheken in Platten erlauben (Hall 1998). Dies zeigt die Wichtigkeit dieser Probenplatten und die Notwendigkeit, ein analytisches System im HTS auf diesen Standard abzustimmen.

2.1.3 Testformate im HTS

Aus der vorangegangenen Charakterisierung des HTS folgen für einen im HTS brauchbaren Assay ebenfalls bestimmte Voraussetzungen. Diese beziehen sich zum einen auf das untersuchte Target und zum anderen auf die Detektionstechnik.

Aufgrund des untersuchten Targets läßt sich prinzipiell zwischen zwei Assays unterscheiden, die sich auch hinsichtlich ihres Informationsgehalts unterscheiden. Der erste Assaytyp ist der Funktionsassay, bei dem eine Funktion in Abhängigkeit der zu testenden Substanz untersucht wird. Dabei kann die Funktion sehr einfach ausfallen, wie etwa die Aktivität eines Enzyms bei der Umsetzung seines Substrates, oder sehr komplex sein, wie etwa die durch die Substanz modulierte Genexpression in einer Zelle. Besitzt das Target eine katalytische Eigenschaft, ist es sinnvoll, diese für einen Assay im HTS auch zu nutzen, vor allem dann, wenn es gerade diejenige Eigenschaft ist, die durch den Wirkstoff später reguliert werden soll. Als Beispiele können hier die schon oben erwähnten Kinasen oder Proteasen genannt werden. Bei den auf der Untersuchung von Zellen bzw. Zellkulturen basierenden Assays handelt es sich meist um eine durch die zu testende Substanz beeinflussbare physiologische Eigenschaft, wie etwa der Lebensfähigkeit bei Toxizität (Sandman *et al.* 1999) oder der Wachstumsfähigkeit von Tumorzellen (Appel *et al.* 1999). In der Regel werden tierische Zelle für diese Untersuchungen entsprechend genetisch verändert, um einen meßbaren Effekt auf den Einfluß der Substanz zu zeigen (Fussenegger *et al.* 1999). Besonders häufig werden dabei sogenannte Reportergene in die Zelle eingeführt, die an die Stelle des eigentlichen Targetgens treten, aber unter der natürlichen genetische Kontrolle stehen (Sharif *et al.* 1999). Handelt es sich bei dem nun exprimierten Gen um ein Enzym wie etwa die Luciferase, die eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert, kann der Effekt der Substanz sehr leicht optisch detektiert werden (Lawler *et al.* 1999).

Im Gegensatz zum funktionalen Assay richtet sich der Bindungs- bzw. Affinitätsassay lediglich nach der Frage nach einer meßbaren Wechselwirkung zwischen Substanz und Target. Es läßt sich mit diesem Test zwar keine Funktion beobachten, dafür ist der Assay weniger komplex. Z.B ist eine genaue Optimierung des pH und der Temperatur nicht immer von Nöten. Es besteht sogar die Möglichkeit, mehr Informationen aus dem Bindungstest zu erhalten als aus einem Funktionsassay, wenn der Assay kompetitiv durchgeführt wird. Dies bedeutet, daß die Bindung der getesteten Substanz durch die Verdrängung eines Referenzliganden, in der Regel der natürliche Bindungspartner, detektiert wird. Damit lassen sich Aussagen über den Ort der Bindung der Substanz machen, die bei der Einflußnahme einer Substanz auf eine enzymatische Reaktion nicht gemacht werden kann. Eine Voraussetzung für einen Bindungsassay ist ein freier Zugang zu den Targets, die meist in aufbereiteter Form, wie etwa chromatographisch gereinigt oder aus einer Membran durch Detergenzien heraus solubilisiert, vorliegen sollten. Dies hat in vielen Fällen aber einen Verlust an Aktivität zur Folge, so daß zur Zeit versucht wird, höhere Ausgangskonzentrationen durch eine Überexpression des Targets in Bakterien, z.B. *Echerichia coli* (Apeler *et al.* 1997), oder in tierischen Zellen mit Hilfe des Baculovirussystems (Flotow *et al.* 1996) zu erreichen.

Der geforderte Hochdurchsatz und die Parallelisierung der Tests mittels Mikrotiterplatten spielt für die verwendete Meßtechnik ebenfalls eine entscheidende Rolle. Neben der Nachfrage nach einer einfachen und stabilen Methode sollte die Detektion schnell und auf Mikrotiterplatten anwendbar sein. Eine einfache und dazu empfindliche Methode ist z.B. die Detektion einer radioaktiven Markierung. Es gibt hierzu eine Vielzahl radioaktiver Tests, mit deren Hilfe zwischen gebunden und nicht gebunden unterschieden werden kann. In einigen Fällen kann dies durch Filtern geschehen (Warrior *et al.* 1999) oder, wie beim Radioimmunoassay üblich, durch spezifische Bindung an der Kavitätenwand der Mikrotiterplatte über spezifische Antikörper und dem darauf folgenden Wegspülen der ungebundenen Substanzen (Nakayama *et al.* 1999). Beide Möglichkeiten haben gemein, daß Waschschrte eingefügt werden müssen, um die nicht gebundenen Moleküle zu entfernen. Dies bedeutet aber einen im HTS nicht zu vernachlässigenden Zeitverlust. Assays, die in der Lage sind, in homogener Lösung

zwischen den beiden Zuständen gebunden und nicht gebunden zu unterscheiden, sind in diesem Punkt im Vorteil. Ein radioaktiver Assay dieses Typs ist der Scintillation Proximity Assay (SPA), der optisch detektiert werden kann (McDonald *et al.* 1999).

Optische Methoden sind im HTS besonders verbreitet, zumal sie gut auf die Dimensionen der Probenträger durch abbildende oder scannende Systeme abzustimmen sind. Im Bereich der in homogener Lösung stattfindenden Assays findet man vor allem fluoreszenzbasierte Tests, die sich die Fluoreszenzpolarisationspektroskopie (Seethala *et al.* 1999, Lynch *et al.* 1997), die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (Brock *et al.* 1999) oder den Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (Grahn *et al.* 1999) zu Nutzen machen.

Untersuchungen biomolekularer Wechselwirkungen mit markierungsfreien Methoden finden, wie in Kapitel 1.1 schon besprochen, an der heterogenen Phasengrenze Probe/Transducer statt. Aus diesem Grund lassen sich Testformate, die schon von heterogenen Assays in Mikrotiterplatten bekannt sind, hier anwenden. Die Möglichkeit, eine Bindungsreaktion zeitaufgelöst zu verfolgen, erlaubt aber, daß im Gegensatz zu typischen Tests in der MTP nicht die Einstellung des Bindungsgleichgewichtes erfolgen muß, sondern schon durch die zeitliche Signaländerung auf eine Konzentration geschlossen werden kann (Edwards 1999). Für ein Screening mit Hilfe markierungsfreier Methoden ist es wichtig, zwischen den Zuständen gebunden und ungebunden unterscheiden zu können. Zwei Möglichkeiten bieten sich dabei an, zum einen die direkte Detektion der Bindung an die Oberfläche und zum anderen die Detektion der Hemmung dieser Bindung durch Einsatz der zu testenden Substanz. Ein solcher indirekter Assay, auch Bindungshemmtest genannt, beruht dann auf der Detektion einer Signalabnahme durch die Testsubstanz. Das hat den Vorteil, daß der Assay so weit optimiert werden kann, daß in der Kontrolle ein ausreichend hohes Ausgangssignal vorhanden ist. Ein Schema eines Bindungshemmtests ist in Abb. 2.1 gezeigt. Das Target und die zu testende Substanz werden bis zum Erreichen des Bindungsgleichgewichtes inkubiert und die Probe auf den Transducer gegeben. Freies Target bindet an die Referenzsubstanz, die auf dem Transducer immobilisiert wurde. Die Linearität zwischen dem an

der Oberfläche gebundenen Target und der Konzentration an freiem Target in der Probe ist dabei durch die Abhängigkeit vom Massentransport gegeben (Piehler 1997b).

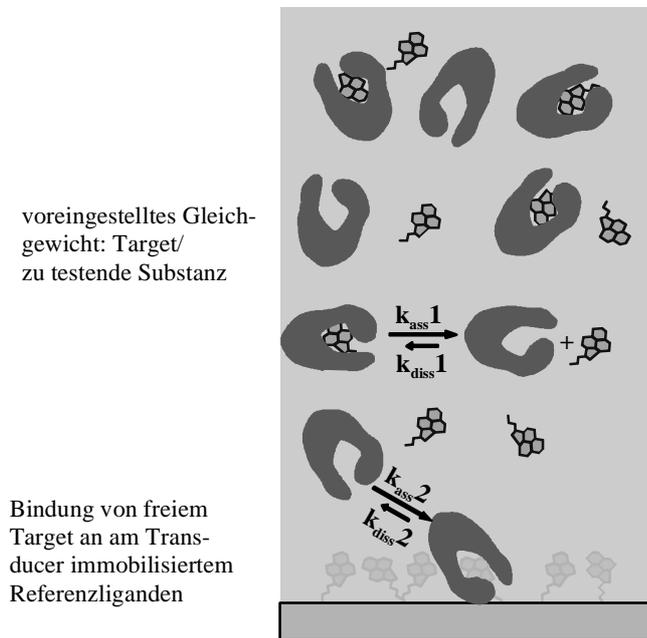


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Bindungshemmtest bei Einsatz einer markierungsfreien Methode.

Die Konzentration an freiem Target bzw. Rezeptor lässt sich nach dem Massenwirkungsgesetz berechnen:

$$K = \frac{C_{R-S}}{C_R C_S} = \frac{C_{R-S}}{(C_{R0} - C_{R-S})(C_{S0} - C_{R-S})} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

wobei K der Affinitätskonstanten, C_R, C_S und C_{S-R} der Konzentration an Rezeptor, Substanz und Rezeptor-Substanz-Komplex im Gleichgewicht und C_{R0} bzw. C_{S0} den jeweiligen Ausgangskonzentrationen der Bindungspartner entspricht. Aus Gl. 2.1 ergibt sich dann für die Konzentration an freiem Target im Gleichgewicht:

$$C_R = C_{R0} - \frac{C_{R0} + C_{S0} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{\left(C_{R0} + C_{S0} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - C_{R0} C_{S0}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Mit Hilfe dieser Gleichung lässt sich nun die Affinitätskonstante bestimmen, wenn mittels Bindungshemmtest C_R für unterschiedliche C_{S0} bestimmt wird, also eine sog.

Affinitätstitrations durchgeführt wird. Eine solche Affinitätstiteration ist in Abb. 2.2 für berechnete Daten gezeigt.

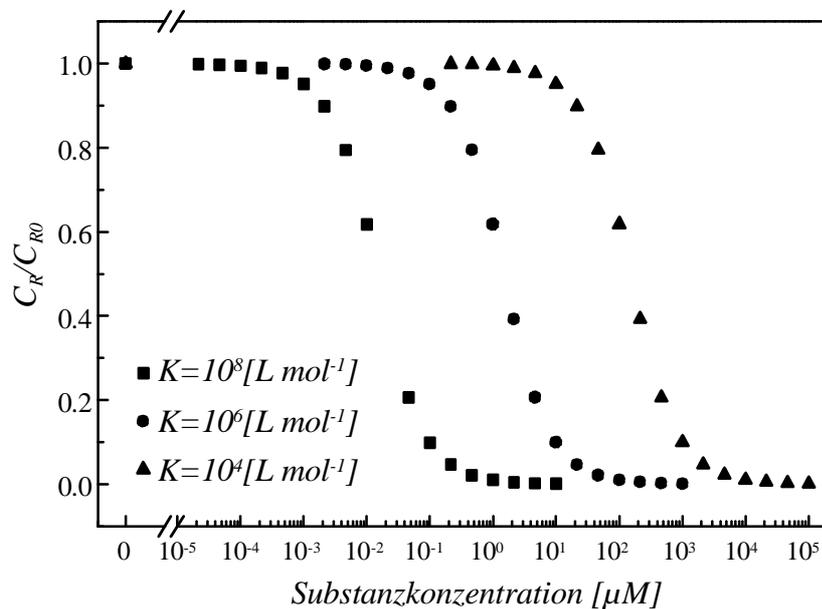


Abb. 2.2: Verhältnis von freiem Rezeptor C_R im Gleichgewicht zu eingesetztem Rezeptor C_{R0} bei einer Affinitätstiteration mittels Bindungshemmtest. Die Titrationskurven wurden für unterschiedliche Affinitätskonstanten nach Gl. 2.2 berechnet. Die Rezeptorkonzentration C_{R0} betrug jeweils $1/K$.

In halblogarithmischer Darstellung nehmen die Kurven einen für Titrationsen typischen sigmoide Verlauf an. Sie verlaufen symmetrisch um den Testmittelpunkt, wenn für die Rezeptorkonzentration gilt, daß sie dem Kehrwert der Affinitätskonstanten entspricht. Damit erreicht man den höchsten Informationsgehalt aus diesen Titrationskurven (Piehler 1997b). Für hochaffine Systeme stellt dies aber auch hohe Ansprüche an die Nachweisempfindlichkeit des detektierenden Systems.

2.2 Grundlagen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie und deren Parallelisierung

2.2.1 Reflexion und Transmission des Lichtes

Licht breitet sich in homogenen Medien geradlinig aus und wird aus seiner Bahn abgelenkt, wenn es auf Inhomogenitäten trifft. Dies ist an Grenzflächen wie z.B. an der

zwischen Luft und Festkörpern bzw. Flüssigkeiten der Fall, wenn sich die Brechungsindizes der Materialien unterscheiden. Die dabei möglicherweise auftretende Transmission und Reflexion findet unter folgenden Bedingungen statt:

- der Einfallswinkel ist gleich dem Ausfallswinkel
- der einfallende, der transmittierte und der reflektierte Strahl liegen in einer Ebene
- das Brechungsgesetz nach Snellius gilt: $n_0 \sin \Phi_0 = n_1 \sin \Phi_1$

Eine schematische Darstellung der Mehrfachreflexion von Licht an einer dünnen Schicht ist in Abb. 2.3 gezeigt: Der einfallende Strahl (0) wird zum einen unter dem gleichen Winkel reflektiert (1), und zum anderen beim Eindringen in das Medium gebrochen (2). In dem hier gezeigten Fall ist der Brechungsindex des ersten Mediums kleiner als der des zweiten, $n_0 < n_1$, und damit ist der Austrittswinkel ebenfalls kleiner als der Einfallswinkel, $\Phi_1 < \Phi_0$. Der gebrochene Strahl (2) wird an der nächsten Phasengrenze wiederum reflektiert (3) bzw. gebrochen (4). Dies hat zur Folge, daß Strahl (3) an der Grenze des zweiten und ersten Mediums n_1/n_0 reflektiert (5) bzw. gebrochen (6) wird.

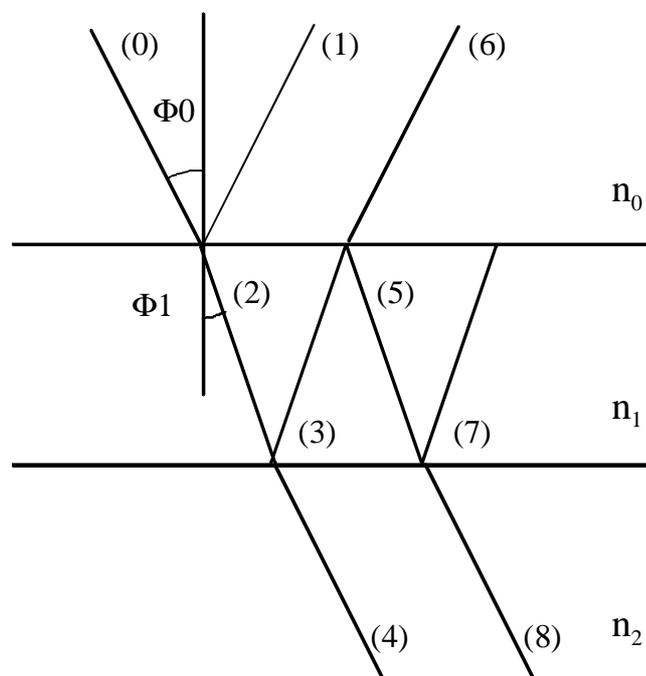


Abb. 2.3: Mehrfachreflexion an einer planparallelen Schicht

Ein besonderes Verhalten zeigt sich dabei, wenn Licht auf planparallele Schichten fällt, deren Dicke im Bereich der Kohärenzlänge liegt. Denn während sich bei inkohä-

rentem Licht die Gesamtintensität der reflektierten Teilstrahlen aus der Summe der Intensitäten der Teilstrahlen ergibt, treten bei kohärenten Lichtstrahlen Interferenzeffekte auf, die dazu führen, daß sich je nach Schichtdicke die Amplituden der Einzelstrahlen verstärken oder abschwächen. Da für die meßbare Intensität der Strahlung gilt:

$$I = \frac{c\epsilon_0}{2} E_0^2 \quad (\text{Gl. 2.3})$$

wobei E_0 der Amplitude des elektrischen Feldes, ϵ_0 der Dielektrizitätskonstanten und c der Lichtgeschwindigkeit entsprechen, ergibt sich die Gesamtintensität nach Gl. 2.3 aus dem Amplitudenquadrat des resultierenden Strahls.

Für das in Abb. 2.3 gezeigte Schema müssen bei geringen Reflektivitäten nur der direkt reflektierte Teilstrahl (1) und der an der zweiten Phasengrenze reflektierte Strahl (3), der die erste Phasengrenze als (6) durchdringt, berücksichtigt werden. Mit den Fresnelkoeffizienten r_1 für Reflexion an der Grenzfläche n_0/n_1 und r_2 für die Reflexion an der Grenzfläche n_1/n_2 ergibt sich unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung δ der Gesamtreflexionskoeffizient R :

$$R = \frac{r_1 + r_2 e^{-2i\delta}}{1 + r_1 r_2 e^{-2i\delta}} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

wobei für kleine Reflexionskoeffizienten der zweite Summand im Nenner vernachlässigt werden kann.

2.2.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (*RfS*)

Die reflektometrische Interferenzspektroskopie *RfS* (Gauglitz *et al.* 1993) eignet sich für die Bestimmung der Dicke dünner transparenter Schichten, d.h. Schichten mit einer Dicke im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. In der Regel wird dafür mit senkrecht einfallendem Licht, das nur gering reflektiert wird, gemessen. Für eine Schicht der Dicke d_1 und des Brechungsindex n_1 ergibt sich, falls an der Grenzfläche keine Phasensprünge auftreten, für die Phasenverschiebung δ aus Gl. 2.4:

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d_1}{\lambda} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

da der Lichtweg der zweifachen optischen Schichtdicke $n_1 d_1$ entspricht. Dem entsprechend erhält man für die reflektierte Intensität I_R bei Interferenz der reflektierten Teilstrahlen (3) und (6) mit den Intensitäten I_1 und I_2

$$I_{R(\lambda)} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_1 d_1}{\lambda}\right) \quad (\text{Gl. 2.6})$$

woraus folgt, daß die Intensität des reflektierten Lichtes von der Wellenlänge abhängt. Dies ist in Abb. 2.4 schematisch gezeigt.

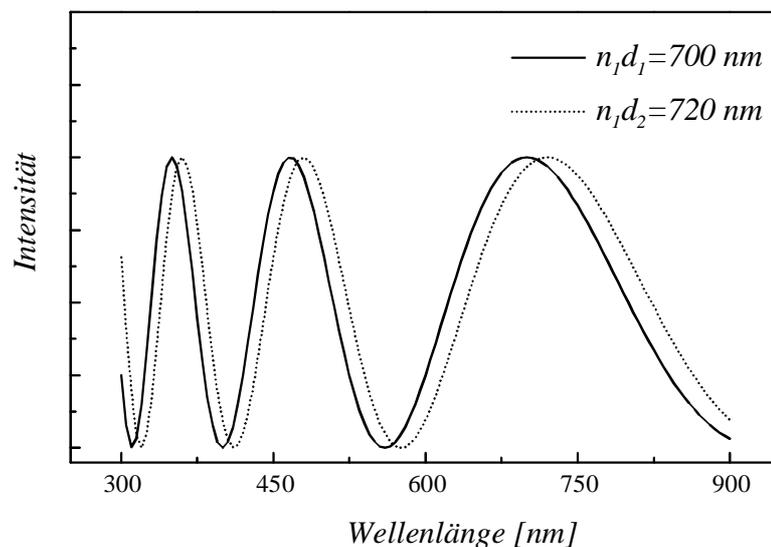


Abb. 2.4: Reflexionsinterferenzspektrum für zwei verschiedene Schichtdicken, berechnet nach Gl. 2.6. Die Intensitäten I_1 und I_2 wurden willkürlich gewählt.

Weiter läßt sich aus Gl. 2.6 das Vorhandensein eines Maximums bzw. Minimums berechnen, da für die Ordnung eines Maximums gilt:

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Max} \quad m_{Max} = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{Gl. 2.7})$$

während für die Ordnung des Minimums folgendes gilt:

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Min} \quad m_{Min} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Somit tritt ein Maximum dann auf, wenn die Wellenlänge ein ganzzahliges Vielfaches der doppelten optischen Schichtdicke ist, was bei senkrechtem Einfall der optischen Weglänge entspricht, und ein Minimum für die Wellenlänge, die der Hälfte eines Vielfaches der doppelten optischen Schichtdicke entspricht. Zur Bestimmung der optischen

Schichtdicke mit Hilfe der reflektometrischen Interferenzspektroskopie muß aus dem gemessenen Reflexionspektrum die Ordnung eines Extremums m_{Max} bzw. m_{Min} bekannt sein. Diese kann aus der Lage zweier Extrema bestimmt werden und man erhält aus Gl. 2.7 und Gl. 2.8 die Ordnung m_1 eines Extremums nach:

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

wobei λ_1 und λ_2 die Wellenlängen, an denen die Extrema auftreten, und Δm die Differenz der Ordnungszahlen m_1 und m_2 sind. Die Schichtdicke kann also nur dann bestimmt werden, wenn mindestens 2 Extrema aufgenommen werden.

Zur Bestimmung der Änderung der optischen Schichtdicke genügt dagegen die Bestimmung eines Extrempunktes und der lateralen Verschiebung dieses Punktes. Eine solche Änderung der optischen Schichtdicke kann dabei durch die Quellung einer Polymerschicht, deren Dicke sich im Bereich einiger 100 nm befindet, geschehen (Kraus 1993) oder durch Bindungsvorgänge von Proteinen an entsprechend modifizierten Oberflächen. Hierzu ist es aber notwendig, eine optisch durchlässige Schicht in der Dicke der Wellenlänge von Weißlicht vorzugeben, da die Dimensionen einer Schicht aus Proteinen nur 10-50 nm aufweisen und somit mit Weißlicht nicht direkt detektiert werden könnten (Brecht *et al.* 1994). Eine SiO_2 -Schicht von 300-600 nm mit einer zusätzlich reflexionsverstärkenden Schicht aus 10-20 nm TaO_5 haben hier gute Resultate erbracht, zumal die Brechungsindizes des SiO_2 und der Proteinlösung sich nur wenig unterscheiden und eine Vielfachinterferenz damit ausgeschlossen wird.

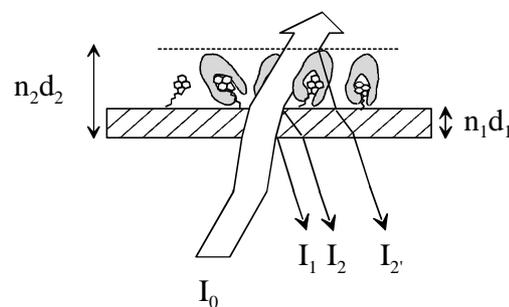


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Bindung eines Rezeptors an eine modifizierte SiO_2 -Schicht der optischen Schichtdicke $n_1 d_1$. Durch die Bindung verändert sich die optische Schichtdicke nach $n_2 d_2$.

Abb. 2.5 gibt schematisch diesen Bindungsvorgang und die damit verbundene Erhöhung der Schichtdicke wieder. Diese Erhöhung läßt sich anhand des Interferenzspektrums durch Bestimmung der Lage des im Spektrum befindlichen Extrempunktes feststellen und bestimmen (Abb. 2.4).

2.2.3 Parallelisierung von *RfS*

Ein für das HTS ausreichender Durchsatz kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch Parallelisierung der Detektion erreicht werden. Damit muß auch eine optische Methode zur direkten Bestimmung von Bindungsvorgängen wie *RfS* parallelisiert werden, um attraktiv für das HTS zu sein. Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Lösungen, die eine parallele Detektion ermöglichen. Die Möglichkeit, das mit Hilfe eines Diodenzeilenspektrometers und eines gegabelten Lichtleiters aufgebauten Einzelkanalsystem (Schmitt *et al.* 1997) auf 96 Kanäle zu vervielfältigen, ist aber nur wenig sinnvoll und endet spätestens bei einer Erhöhung der Probendichte auf 384 oder gar 1536 Kanäle.

Vielmehr verspricht der Einsatz bild erfassender Systeme wie z.B. der eines CCD-Chips ein formatunabhängiges Detektionssystem, bei dem der Wechselwirkungsort auf der Transduceroberfläche einem spezifischen Ort auf dem CCD-Chip zugeordnet werden kann. Damit wären Erhöhungen auf 384, 1536 und mehr Kanäle bzw. Kavitäten auf der Probenplatte möglich und nur beschränkt durch die Zahl der Bildpunkte (Pixel) des Chip und dem Auflösungsvermögen des optisch abbildenden Systems. *RfS* benötigt zur Bestimmung einer Schichtdickenänderung ein wenn auch nur aus wenigen Wellenlängen bestehendes Spektrum. Hier besteht die Möglichkeit, dieses Spektrum sequentiell und nicht, wie im Einzelkanalsystem üblich, simultan aufzuzeichnen, wobei das dazu notwendige monochromatische Licht einer bestimmten Wellenlänge durch ein einstellbares Filter zu erreichen wäre. Abb. 2.6 zeigt eine schematische Darstellung eines möglichen parallelen *RfS*-Detektionssystems unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera und eines einstellbaren Filters zur sequentiellen Abtastung des Transducers. Monochromatisches Licht leuchtet dabei den Transducer von der Unterseite aus, und das Intensitätsmuster des reflektierten Lichts wird von der Kamera erfaßt. Nachdem

bei allen gewählten Wellenlängen dies geschehen ist, kann für jede Probenposition auf dem Transducer durch Zuordnung der entsprechenden Stelle auf dem CCD-Chip ein Interferenzspektrum erzeugt, und die Schichtdicke bzw. deren Änderung ermittelt werden.

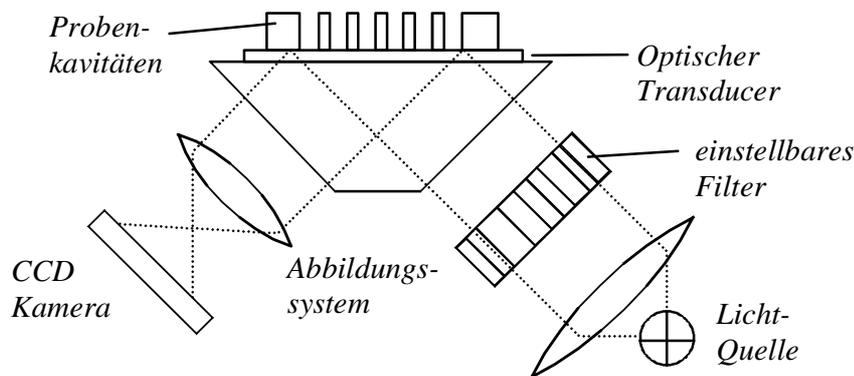


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines parallelisierten *RIfS*-Detektionssystems unter Zuhilfenahme eines bild erfassenden Systems.

In Abb. 2.6 fällt auf, daß der Einfall des Lichts nicht wie üblich senkrecht sondern in einem Winkel von 30° - 50° geschieht. Da die Lage des im Interferenzspektrum liegenden Extrempunktes winkelabhängig ist, führt dies zu einer Verbreiterung des Spektrums im Vergleich zum senkrechten Einfall und damit zu einer Abnahme des Signalhubs, d.h. die gemessene Änderung der Schichtdicke durch Bindung eines Rezeptors unter gleichen Bedingungen fällt bei schrägem Lichteinfall kleiner aus als bei senkrechtem (Rothmund 1999). Dieser Verlust an Signalhub geht mit einer Verschlechterung der Signal/Rausch-Verhältnisses einher. Ein Vorteil dieses optischen Aufbaus liegt aber darin, daß Störungen durch Reflexion von Licht am Meniskus der Probe in der Kavität durch den schrägen Lichteinfall keinen so großen Einfluß haben als es bei senkrechter Ausleuchtung der Fall ist.

2.3 Biochemische Grundlagen der untersuchten Biomoleküle

Die molekulare Grundlage des Lebens ist ein dynamisches System, in dem Biomoleküle ständig in Kontakt treten. Dies gilt sowohl für Signalübertragungsprozesse als auch für enzymatische Reaktionen und viele andere Prozesse. Aus diesem Grund sind

Enzyme und Rezeptoren in der Lage, ihr Substrat bzw. ihren Liganden an speziellen Regionen ihres Moleküls, der Bindungsstelle oder Bindungstasche, zu binden. Diese Bindung ist in den meisten Fällen sehr selektiv und reversible, verbunden mit einer meist hohen Gleichgewichtskonstanten. Verantwortlich für diese Reversibilität sind eine Reihe verschiedener nicht-kovalenter Bindungstypen, die einzeln nur sehr schwach sind, in ihrer Vielzahl aber durch ihren kumulativen Beitrag zu sehr festen Bindungen führen können. Eine Übersicht über diese Bindungstypen ist in Tab. 2.1 gegeben.

Tab. 2.1: Nicht-kovalente Bindungstypen, die biomolekulare Wechselwirkungen ermöglichen, und ihre ungefähre Bindungsenergie in wässrigen Medien (nach Alberts et al. 1990)

Bindungstyp	Abstandsabhängigkeit	Energie [kJ mol ⁻¹]
Elektrostatische Wechselwirkung geladener Gruppen	r^{-2}	12,5
Van-der-Waals Kräfte	r^{-10}	0,4
Wasserstoffbrückenbindung	r^{-6}	4
Hydrophobe Wechselwirkung	keine diskrete Abhängigkeit	-

Die höchste Energie ist bei der elektrostatischen Bindung zu finden und beruht auf der Anziehung zweier entgegengesetzt geladener Moleküle. Die Entfernung bei optimaler elektrostatischer Anziehung beträgt ca. 0,28 nm (Stryer 1990). Wasserstoffbrückenbindungen können dagegen sowohl bei geladenen als auch bei ungeladenen Molekülen entstehen. Die Bindung beruht darauf, daß sich zwei Atome ein Wasserstoffatom „teilen“, wobei das Atom, das dieses Wasserstoffatom trägt, Wasserstoffdonor und das andere Wasserstoffakzeptor genannt wird. Der Akzeptor verfügt dabei über eine partielle negative Ladung, die das Wasserstoffatom anzieht. Als Donoren, aber auch als Akzeptoren, können Sauerstoff- oder Stickstoffatome auftreten. Die Länge einer Wasserstoffbrücke kann zwischen 0,27 und 0,31 nm betragen. Sie tritt aber nur auf, wenn Donor und Akzeptor in einer passenden räumlichen Orientierung zueinander stehen.

Van-der-Waals-Bindungen stellen dagegen eine unspezifische Anziehungskraft dar, die auftritt, wenn sich Atome auf eine bestimmte Kontaktdistanz nähern, die zwischen 0,3 und 0,4 nm liegt. Unterhalb dieser Distanz kommt es zu einer Abstoßung. Die einzelne „Bindung“ ist sehr schwach, eine effektive Bindung findet daher nur statt, wenn viele solcher „Bindungen“ gleichzeitig entstehen. Dies ist der Fall, wenn zwischen Rezeptor und Ligand eine sterische Komplementarität besteht. Somit kann diese sonst so unspezifische Bindung in der Vielzahl sehr spezifisch sein und stellt damit neben den Wasserstoffbrückenbindungen die wichtigste Grundlage der Spezifität einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung dar. Hydrophobe Wechselwirkungen haben ihre Ursache in einem Entropiegewinn durch Verlust der Orientierung der Wassermoleküle, die aus der Bindungstasche verdrängt werden.

Ein weiterer Aspekt der biomolekularen Wechselwirkung ist eine aktive Konformationsänderung, die durch die Bindung des Liganden induziert wird und damit die Affinität erhöht. Eine solche Konformationsänderung wird als *induced fit* bezeichnet und ist bei einer Reihe von Enzymen, wie etwa der Hexokinase (Arteca 1996), aber auch bei Antikörpern bekannt (Betts *et al.* 1999). Die Aufgabe dieser Konformationsänderung bei Enzymen ist es, einen noch engeren Kontakt der an der Katalyse beteiligten Reste und eine Verdrängung des Wassers zu ermöglichen. Bei Rezeptoren ist die Konformationsänderung, die erst durch die Bindung des Liganden ausgelöst wird, eine Möglichkeit, das durch die Ligandenbindung empfangene Signal an eine andere Stelle des Moleküls weiterzuleiten.

Die Reversibilität der biomolekularen Wechselwirkung drückt sich ebenfalls in ihrer Eigenschaft zur Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes aus. Da die Bindungen auf polaren und unpolaren Interaktionen beruhen, kann man sich dieses Verhalten zu Nutze machen, um die Dissoziation des Komplexes zu beschleunigen. Dazu eignen sich alle Reagenzien, die in der Lage sind, die Dielektrizitätskonstante D des umgebenden Mediums zu ändern (in Wasser ist $D=80$). Hier können sowohl organische Lösungsmittel als auch Lösungen mit hoher oder niedriger Ionenstärke verwendet werden. Chaotrope Reagenzien können ebenfalls zur Dissoziation von Komplexen herangezogen werden. Ihre Wirkung erzielen sie durch die Einflußnahme auf die Hydratisie-

rung der Proteine und zerstören damit die Struktur. Gerade beim Einsatz von Sensoren, die mehrmals eingesetzt werden sollen, ist ein Lösen des Komplexes für eine vollständige Regeneration sehr wichtig. Im Bereich markierungsfreier Methoden zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen werden eine Vielzahl verschiedener Reagenzien zur Regeneration aber auch Gemische dieser Reagenzien verwendet (Anderson *et al.* 1999).

2.3.1 *Thrombin*

Das erste, der in dieser Arbeit untersuchten „Targets“, war die Serinprotease Thrombin, ein 34 kDa (beim Rind 40 kDa) großes Protein, bestehend aus zwei Untereinheiten (Abb. 2.7a), das die Spaltung von Fibrinogen in das aktive Fibrin katalysiert und damit den letzten Schritt in der Blutgerinnungskaskade darstellt. Das auch als Faktor II der Blutgerinnung bekannte Enzym spaltet dabei spezifisch Arginin-Glycin-Bindungen. Es liegt im Blut an Membranen assoziiert als Zymogen, also in einer inaktiven Form vor. Diese auch als Prothrombin bekannte Vorstufe ist 66 kDa schwer und wird durch zwei proteolytische Spaltungen aktiviert. Dabei wird zum einen ein 32 kDa Fragment frei, und zum anderen entstehen zwei Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben.

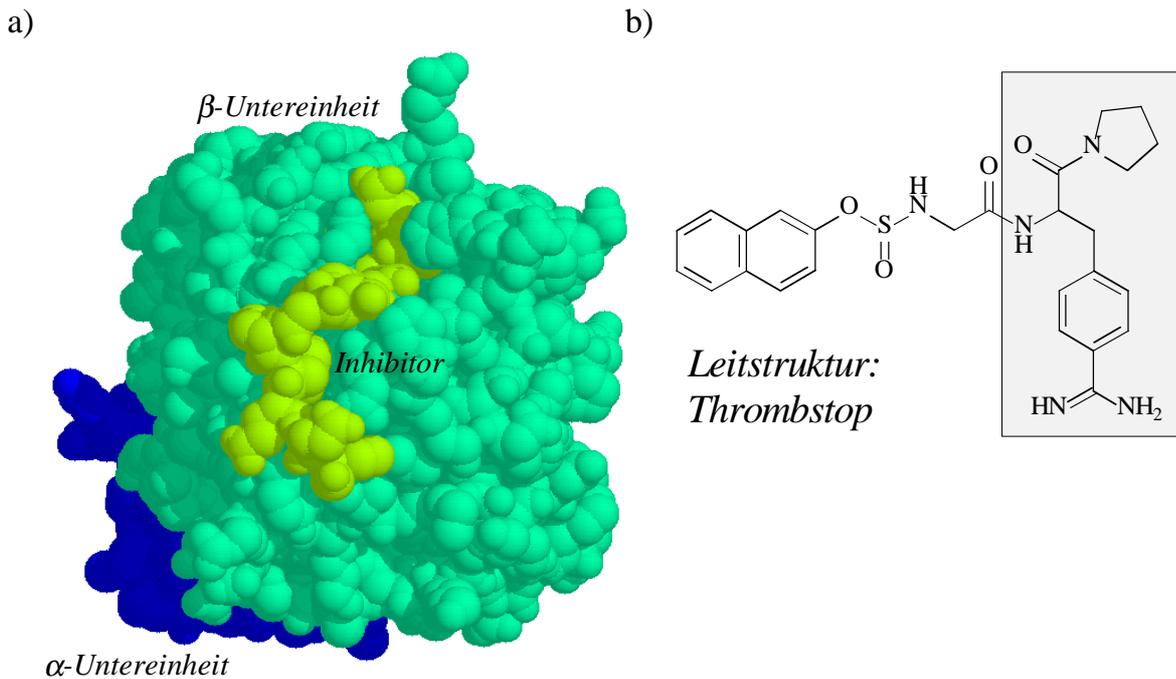


Abb. 2.7: a) Kalottenmodell von Thrombin und einem Inhibitor (Quelle Tulinsky A. und KrishnanR. 1996 PDB-Datenbank), b) Struktur eines Thrombininhibitors, der als Leitstruktur für die untersuchten Inhibitoren diente

Der natürliche Inhibitor Antithrombin III, ein Plasmaprotein, bindet das Enzym irreversibel und dient durch die damit verbundene Inaktivierung der genauen Regulation des Gerinnungsprozesses. Es wird in die Klasse der Serpine (Serinprotease-Inhibitoren) gestellt und zeigt eine höhere Affinität zu Thrombin im Beisein des Polysaccharids Heparin, das damit die Wirkung eines Antikoagulans aufweist (Stryer 1990).

Eine genaue Regulation der Blutgerinnung ist besonders wichtig und entscheidet oft zwischen Blutung und Thrombose. Die entscheidende Rolle des Thrombin in der Blutgerinnung ist damit auch der Grund, weshalb es als Target für die Wirkstoffsuche von großer Bedeutung ist. Hinzu kommt, daß in letzter Zeit entdeckt wurde, daß es auch andere Aufgaben wie eine Einflußnahme auf die Zellregulation zeigt (Coughlin 1999).

Abb. 2.7b zeigt die Struktur eines im Gegensatz zum Antithrombin III niedermolekularen Inhibitors, das Thrombostop, das als Leitstruktur für die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren fungierte (Klingler *et al.* 1996). Der graumarkierte Teil des Moleküls übernimmt dabei die Bindung in der Bindungstasche. Der aromatische Rest übernimmt

dabei den Part, den der Guanidinrest des sonst im Substrat enthaltenen Arginins einnimmt.

2.3.2 Östrogen bindende Protein (EBP) aus *Candida albicans*

Das zelluläre ca. 46 kDa große Östrogen bindende Protein (EBP) aus *Candida albicans* ist dafür bekannt, daß es eine hohe Affinität zu 17 β -Estradiol zeigt. Wie auch das homologe Protein zu EBP, dem „Old yellow Enzyme“ aus *Saccharomyces cerevisiae* (Brown *et al.* 1998), ist es in der Lage, andere Substanzen mit phenolischer Struktur, die α - und β -ungesättigte Keto und Aldehydgruppen enthalten, zu binden (Buckman *et al.* 1998). Zusätzlich enthält das EBP eine NADPH-Oxidoreduktase-Aktivität, die Elektronen von NADPH auf α - und β -ungesättigte Keto und Aldehydgruppen überträgt (Buckman *et al.* 1997). Diese Redoxreaktion wird durch die Bindung von 17 β -Estradiol mit einem K_i von 10 ± 2 nM inhibiert. Es zeigte sich auch, daß EBP nur im oxidierten Zustand 17 β -Estradiol zu binden vermag.

C. albicans ist einer der wichtigsten Vertreter virulenter Pilze bzw. Hefen und ist hauptsächlich an Candidosen und bei der Sor-Bildung beteiligt (Dagnelie *et al.* 1993). Es ist schon länger bekannt, daß die Umwandlung von *C. albicans* von der Hefe-Form zur myzelartigen Form mit dem Eintreten seiner Virulenz zusammenhängt. Dabei wurde beobachtet, daß Hormone, wie etwa dem Estradiol, diese Umwandlung einleiten (Brasch 1997, White *et al.* 1997). Durch die Entdeckung des EBP in *C. albicans* glaubt man nun, die molekulare Ursache für die Umwandlung der Hefe von einer nicht virulenten zu einer virulenten Form und dem notwendigen Vorhandensein tierischer Hormone gefunden zu haben. Aus diesem Grund ist das EBP in den Blickfeld einer möglichen Therapie von Candidosen gerückt, wenn es gelingt, die hormonell gesteuerte Umwandlung, in die wohl auch die Redox-Aktivität des EBP eingreift, durch entsprechende Kompetitoren am EBP zu unterbinden.

Das in dieser Arbeit untersuchte EBP lag als ein gentechnisch erzeugtes ca. 72 kDa großes Fusionsprotein vor, das am N-terminalen Ende aus einer Glutathion-S-Transferase (GST) bestand. Die Technik der Fusionsproteine wird häufig angewendet, wenn eine spezifische Aufreinigung durch Affinitätschromatographie des expremierten

Proteins von Nöten ist. Dabei wird die Affinität der Glutathion-S-Transferase (GST) zu Glutathion, einem Tripeptid aus γ -Glu-Cys-Glu, für die Affinitätschromatographie genutzt (Panayotova-Heiermann *et al.* 1999).

2.3.3 DNA und DNA-Interkalatoren

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Grundbestandteil der genetischen Information in der Zelle. Sie besteht aus zwei langen, unverzweigten komplementären Strängen, die als Doppelstränge eine helikale Struktur annehmen, die sog. Doppelhelix. Die Grundbausteine der Einzelstränge sind Nukleotide, die aus einem 2-Desoxy-Ribose-Molekül bestehen und eine Pyrimidinbase (Adenin und Guanin) oder Purinbase (Thymin und Cytosin) tragen. Diese Monomere sind über Diphosphorester verknüpft. Jeweils eine Pyrimidinbase bindet über Wasserstoffbrückenbindungen eine Purinbase, wobei Adenin nur mit Thymin über 2 und Guanin nur mit Cytosin über 3 Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung tritt.

Proteine treten mit der DNA ständig in Wechselwirkung. So liegt die DNA im Zellkern eukariotischer Zellen sehr komprimiert an sehr basischen Proteinen, den Histonen, gebunden vor. Aber sowohl bei der Replikation als auch bei der Transskription spielen DNA-Protein-Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. DNA-bindende Proteine bilden in der Regel ganz spezielle Motive in ihrer Peptidkette aus. Die bekanntesten sind u.a. das Zinkfingermotiv (Takatsuji 1999) oder das Helix-Turn-Helix-Motiv (Martinez *et al.* 1997). Diese Strukturen lassen sich meist schon in der das Protein kodierenden Gensequenz erkennen, was die Suche nach DNA-bindenden Proteinen erheblich erleichtert.

Neben den DNA-bindenden Proteinen, die einen wichtigen Anteil der Targets in der Wirkstoffsuche aufgrund ihrer meist kontrollierenden Funktion darstellen, gibt es auch niedermolekulare Substanzen, die an der DNA, in der Regel nicht an spezifischen Sequenzen, binden. Diese Substanzen werden häufig in der DNA-Analytik bzw. für Sensoren eingesetzt, wie z.B. das Acridin Orange (Horvath 1998) oder das Ethidiumbromid (Pandey *et al.* 1995). Das Interesse an DNA-bindenden Substanzen ist aber auch darin begründet, daß solche Substanzen, dadurch daß sie DNA binden bzw. interkalie-

ren, wichtige Prozesse wie die Replikation oder Transskription stören können. Dies wirkt sich zwar auf alle Zellen aus, Zellen mit hoher Proliferation, Zellteilungsaktivität, sind aber sehr weit höher davon betroffen. Somit zeigen solche Substanzen meist antibiotische Wirkung auf Mikroorganismen oder toxische Wirkung auf Tumorzellen (Pospiech *et al.* 1996, Walker *et al.* 1994), wofür sie dann auch eingesetzt werden.

2.4 Oberflächenmodifikationen zur elektrostatischen und kovalenten Bindung von Liganden

Die Immobilisierung eines der Bindungspartner auf dem Transducer ist bei optischen markierungsfreien Methoden zur Untersuchung der biomolekularen Wechselwirkung ein sehr wichtiger Punkt. Zum einen ist die Anzahl der aktiven Bindungsstellen auf dem Transducer ausschlaggebend für die Höhe des zu erwartenden Signals. Zum anderen muß die Immobilisierung so fest sein, daß nach einer Regeneration die Aktivität erhalten bleibt.

Es bestehen eine Reihe von Möglichkeiten, einen Liganden auf einer Oberfläche zu immobilisieren: Durch Adsorption wird der Ligand unspezifisch durch elektrostatische bzw. polare und/oder hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche festgehalten. Diese Art der Immobilisierung eignet sich gut für Makromoleküle, die über eine ausreichend hohe Anzahl an spezifischen Bindungsstellen verfügen, da eine vorbestimmte Orientierung der Moleküle damit nicht erreicht wird (Bromberg *et al.* 1999, Cosnier 1999).

Eine Möglichkeit der orientierten Immobilisierung besteht unter Ausnutzung von Bioaffinitäten. Hier kann entweder ein spezifischer Antikörper herangezogen (Piervincenzi *et al.* 1998) oder durch ein Biotin die feste Bindung von Biotin und Streptavidin (Kukanskis *et al.* 1999, Koo *et al.* 1998) ausgenutzt werden. Als dritte Möglichkeit besteht die kovalente Immobilisierung, die sich für Makromoleküle eignet, in besonderer Weise aber auch für niedermolekulare Liganden sehr wertvoll ist. Hier eignen sich die in der Peptidchemie entwickelten Protokolle zur Immobilisierung über Carbodiimi-

de (Piehler *et al.* 1996). Im weiteren soll ein kurzer Überblick über Immobilisierungsstrategien gegeben werden, die in dieser Arbeit angewendet wurden.

2.4.1 Immobilisierung von DNA auf Glastransducern über elektrostatische Wechselwirkungen

DNA stellt wegen der Phosphatgruppen im Rückgrat bei physiologischen pH ein Polyanion dar. Damit liegt der Schritt nahe, DNA über elektrostatische Wechselwirkungen zu immobilisieren, indem man die zu modifizierende Oberfläche mit positiven Ladungen ausstattet. Da Glasoberflächen nach gründlicher Reinigung hydrophile Eigenschaften und damit negative Ladungen aufweisen, ist eine direkte Adsorption von DNA nicht möglich. Vielmehr kann hier zunächst ein Polykation wie etwa Polyethylenimin immobilisiert und danach DNA gebunden werden. Dieses Vorgehen resultiert in einem Schichtsystem, in dem die DNA ohne spezielle Orientierung auf dem Transducer vorliegt.

2.4.2 Kovalente Kupplung niedermolekularer Liganden über funktionelle Gruppen

Zur kovalenten Kupplung niedermolekularer Liganden muß der Glastransducer zunächst „funktionalisiert“, d.h. es müssen funktionelle Gruppen eingefügt werden. Auf Glas kann dies mit Hilfe eines Silans, das eine funktionelle Gruppe wie etwa Amino- oder Epoxy-Gruppen trägt, geschehen. In der Regel bindet man nicht direkt den Liganden an das Silan, sondern entscheidet sich zunächst für den Einsatz eines Polymers, wie z.B. einem modifizierten Dextran mit funktionellen Gruppen (NH_2 oder COOH) oder einem modifizierten Polyethylenglykol mit endständiger NH_2 - oder COOH -Gruppe. Dies hat den Vorteil, daß die Glasoberfläche durch das Polymer soweit abgeschirmt wird, daß keine Wechselwirkungen mehr zwischen Bestandteilen der Probe und der Glasoberfläche stattfinden können.

Da die Polymere selbst über funktionelle Gruppen verfügen, ist die Kupplung von Liganden, die ebenfalls über eine freie Carboxygruppe oder Aminogruppe verfügen, durch Carbodiimidchemie möglich. Schwierigkeiten bestehen nur, wenn Liganden sowohl Carboxy- als auch Aminogruppen tragen, da hier eine Quervernetzung des Li-

ganden ermöglicht wird. In einem solchen Fall ist es dann notwendig, die Polymeroberfläche oder die funktionellen Gruppen des Polymers in einem ersten Schritt zu aktivieren. Eine Möglichkeit ist die Bildung eines Aktivesters mittels NHS (N-Hydroxysuccinimid) auf einem Polymer mit freien Carboxygruppen. Danach kann ein Ligand mit freier Aminogruppe über diesen Aktivester gekuppelt werden.

Besitzt das Polymer dagegen Aminogruppen, ist eine direkte Aktivierung mit NHS nicht möglich. Hier bietet sich aber die Möglichkeit an, heterobifunktionelle Kuppelungsreagenzien wie z.B. den 6-Maleinimido-capronsäure-N-succinimidylester (EMCS) einzusetzen. Abb. 2.8 zeigt die Struktur dieses Capronsäurederivats, das einen N-succinimidylester trägt, mit dem es an die Aminogruppe auf der Oberfläche gebunden werden kann.

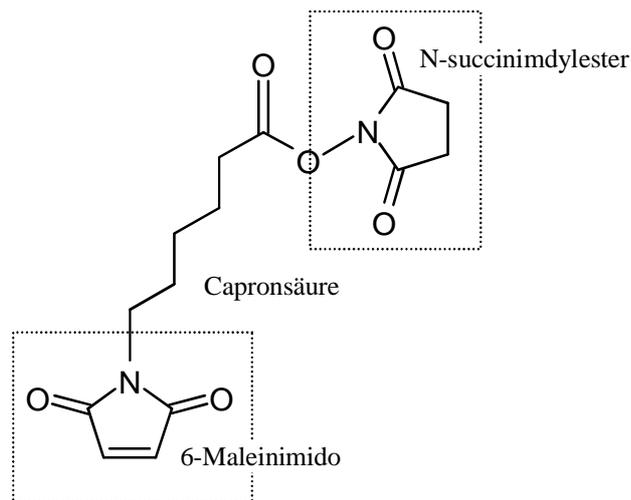


Abb. 2.8: Struktur des 6-Maleinimido-capronsäure-N-succinimidylester (EMCS)

Der 6-Maleinimido-Rest kann dann zur spezifischen Bindung des Liganden, bevorzugt für Liganden mit einer freien Sulfhydrylgruppe, genutzt werden. Dabei kann dies sowohl in wässriger als auch in organischer Lösung stattfinden.

Abb. 2.9 zeigt die Reaktion der Maleinimidogruppe mit einer Sulfhydryl-Gruppe eines Liganden, die über eine Alkylierungsreaktion zu einem Thioether führt. Die Reaktion muß in einem pH-Bereich zwischen 6,5 und 7,5 stattfinden, da bei pH 7 die Reaktion mit Sulfhydryl-Gruppen ca. 1000 mal schneller abläuft als mit Aminen. Erst ab einem

höheren pH ist eine Kreuzreaktion mit Aminen und damit die Kupplung von Liganden mit freien Aminogruppe möglich (Hermanson *et al.* 1992).

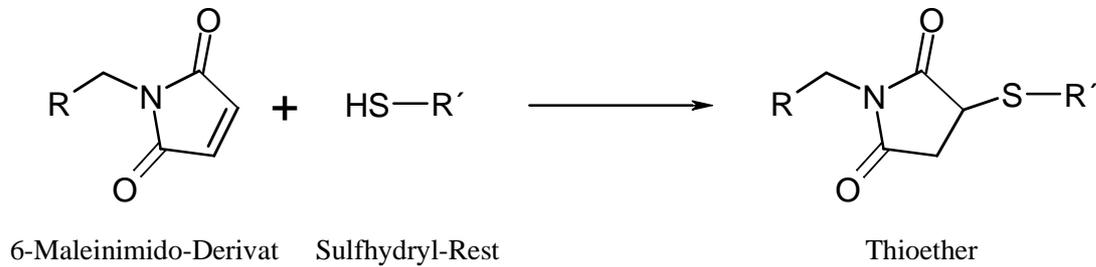


Abb. 2.9: Schema der Reaktion der Maleinimidogruppe mit Thiolgruppen

Eine andere Möglichkeit, eine Oberfläche zu aktivieren, ist die Verwendung von 1,4-Butandiol-diglycidylether (Abb. 2.10) als bifunktionelles Kupplungsreagenz.

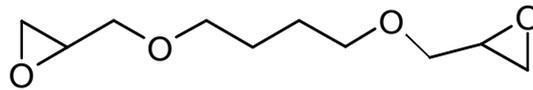


Abb. 2.10: Struktur des 1,4-Butandiol-diglycidylether

Epoxide reagieren mit nukleophilen Gruppen durch Ringöffnung. Dabei entstehen aus primären Aminen, Sulfhydrylgruppen oder Hydroxygruppen sekundäre Amine, Thioether oder Ether-Verbindungen. Die Reaktion ist für unterschiedliche funktionelle Gruppen stark pH-abhängig.

- OH-Gruppen pH 11-12
- Aminogruppen pH 9
- SH-Gruppen pH 7.5-8.5

3 Material und Methoden

3.1 *Materialien*

3.1.1 *Chemikalien und Biochemikalien*

- Standardchemikalien und -biochemikalien stammten von FLUKA, Neu-Ulm und SIGMA, Deisenhofen, in anderen Fällen sind die Quellen angegeben.
- Polystreptavidin wurde von Boehringer Mannheim bezogen.
- Thrombin und Glutathion-S-Transferase (GST) wurden von SIGMA, Deisenhofen, geordert.
- Thrombin-Inhibitoren wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Friedrich, BASF Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt.
- EBP wurde freundlicherweise von Frau Dr. Karin Adelhelm vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena, zur Verfügung gestellt.
- Östrogene und Phyto-Östrogene stammen ebenfalls von Frau Dr. Karin Adelhelm, als 5 mM Stammlösung in DMSO bzw. Methanol.
- Polyklonaler Anti-Estron-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Ram Abuknesha, HRC London, zur Verfügung gestellt.
- DNA aus Lachsspermien stammte von FLUKA, Neu-Ulm
- DNA-bindende Substanzen stammen von FLUKA, Neu-Ulm, und SIGMA, Deisenhofen.
- Funktionalisierte Polyethylenglykole stammten von der Fa. Rapp, Tübingen.

3.1.2 Lösungen

Piranha-Lösung

57,5 % (v/v) H_2SO_4

12 % (v/v) H_2O_2

(sofort nach dem Mischen verwendet)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

150 mM NaCl

10 mM KH_2PO_4

Mit 2 M KOH wird auf pH 7,4 titriert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit KCl (KPBS) für die Versuche mit EBP

150 mM NaCl

10 mM KH_2PO_4

150 mM KCl

Mit 2 M KOH wird auf pH 7,4 titriert.

Regenerationslösung

0,01 M HCl

3.1.3 Geräte

Zur Bestimmung der Schichtdickenänderung mittels *RIFS* wurden unterschiedliche Aufbauten verwendet. Ein Einkanalssystem wurde sowohl in Kombination mit einer Fließinjektionsanlage (FIA) als auch mit einer Küvettenmeßzelle mit einem Volumen von max. 80 μL für ruhende Proben betrieben. Die Probe wurde dazu manuell pipetiert (Abb. 3.1). Der optische Aufbau bestand aus einem Simultanspektralphotometer SPEKOL 1100, Zeiss, Jena, modifiziert nach Schmitt *et al.* 1997.

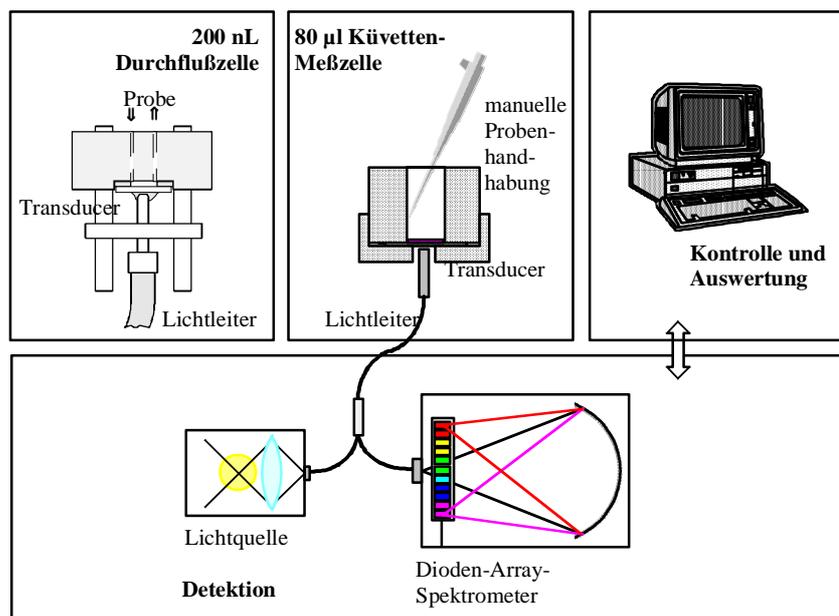


Abb. 3.1: Schema des Einkanal-RIFS-Aufbaus mit Durchflußzelle und Küvettenmeßzelle

Die FIA-Anlage war eine ASIA-FIA, Ismatec, Wertheim, mit einer Fixpumpe mit 20 Umdrehungen pro Minute (upm) und einer Förderrate von $0,82 \text{ mL min}^{-1}$, und einer Variopumpe mit maximal 50 upm, mit variabler Drehzahl von 0-99 Schritten einstellbar; je nach eingestellter Drehzahl n entspricht dies einer Förderate $F = n \cdot 3,5 \mu\text{L min}^{-1}$. Ein Schema der Fluidik ist in Abb. 3.2 gegeben. Zur Vermeidung von Luftblasen stand der zur Meßzelle gehende Pufferstrom unter Argondruck. Die Probe wurde in einer Probenschleife mit einem Fassungsvermögen von 500 μL retrograd aufgenommen, wobei das Probenvolumen 1 mL betrug, und anschließend über den Transducer gegeben. Bei unvollständiger Befüllung der Probenschleife wurde ein Luftpolster von ca. 5 mm Länge vorausgeschickt, um die Dispersion zu minimieren.

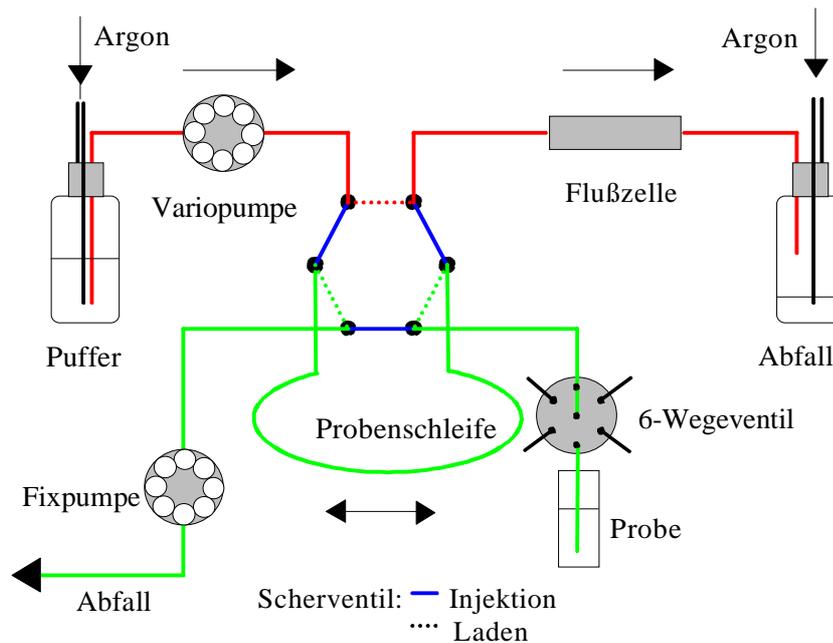


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau der Probenhandhabung mit FIA und Autosampler.

Die Probe wurde in einer Probenschleife aufgenommen und retrograd über den Transducer gegeben.

Weitere *RfS*-Aufbauten wurden im Zusammenhang mit der Parallelisierung von *RfS* verwendet. Ein erster Aufbau, hier Demonstrator 0a genannt, besaß eine Probenplatte mit 96 Kavitäten in einem 4,5 mm Raster, was den Dimensionen eines Viertel einer 384er MTP entspricht, und einem Transducer mit einer Abmessung von 45x60 mm². Als Lichtquelle diente eine 100 W Halogenlampe in einem Lampengehäuse HAL 100, Carl Zeiss Jena. Die Spannungsversorgung übernahm ein Netzteil von L.O.T., Darmstadt, Model 68831, 300 W max. Die Datenerfassung übernahm eine CCD-Kamera der Marke DALSA CA-D1 256, 12 bit, von DALSA INC. Waterloo, Kanada und einer AM-DIG Framegrabber-Karte von IMAGING Technology, USA. Als Monochromator wurde ein Varispec Tunable Filter von CAMBRIDGE RESEARCH AND INSTRUMENTATION, USA, das auf dem Lyot-Prinzip beruhte, eingesetzt. Der optische, zentrale Aufbau mit Linsen, Spiegel und Blenden bestand aus einem gefrästen Aluminiumblock, der von Carl Zeiss Jena hergestellt wurde.

Durch Austausch verschiedener Bauteile entstand eine zweite Version des Demonstrator 0a, der Demonstrator 0b (Abb. 3.3). Während der optische Aufbau, die Probenplatte und die Lichtquelle unverändert blieben, wurde das Lyot-Filter durch ein Filter-

rad mit 6 fest gewählten Interferenzfiltern ersetzt und anstelle der DALSA-Kamera wurde eine PCO SensiCam 12 bit Kamera von PCO GmbH, Kelheim, verwendet.

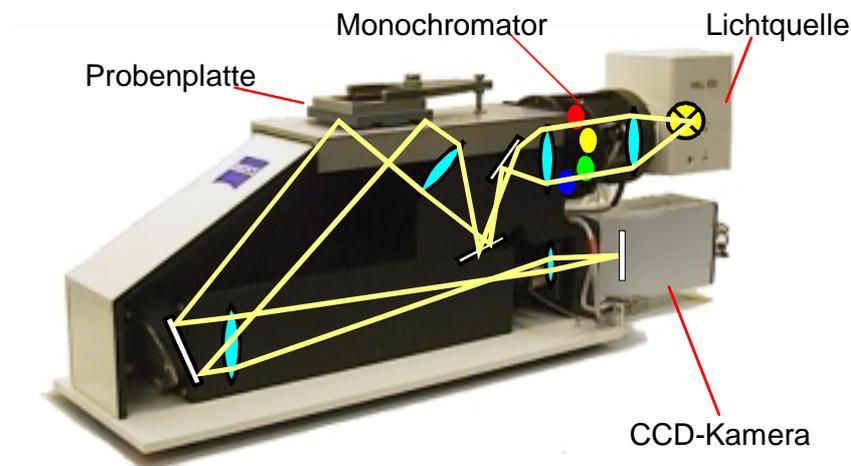


Abb. 3.3: Abbildung des Demonstrators 0b mit den wichtigsten Bauteilen Lichtquelle, Monochromator (hier Filterrad), Probenplatte (96 Kavitäten, 4,5 mm Raster) und CCD-Kamera (PCO SensiCam). Der optische Weg ist schematisch wiedergegeben.

Im Verlauf der Entwicklung eines parallelen *RfS*-Detektionssystems zum Einsatz im HTS wurde das in Demonstrator 0a und b verwirklichte Konzept auf 96er MTP mit einem 9 mm Raster ausgedehnt, dem Demonstrator 1 (Abb. 3.4). Die Probenplatten bestanden aus einem MTP-Grid (Greiner, Frickenhausen) aus Polystyrol, die ohne Boden produziert wurden. Auf diesen Boden wurde ein *RfS*-Transducer mit einer Dimension von $80 \times 108 \text{ mm}^2$ aufgeklebt, der im Gegensatz zu anderen *RfS*-Transducer auf der Unterseite eine Antireflexschicht trug. Die Beschichtung mit einem Polymer auf der Oberseite wurde vor dem Verkleben durchgeführt.

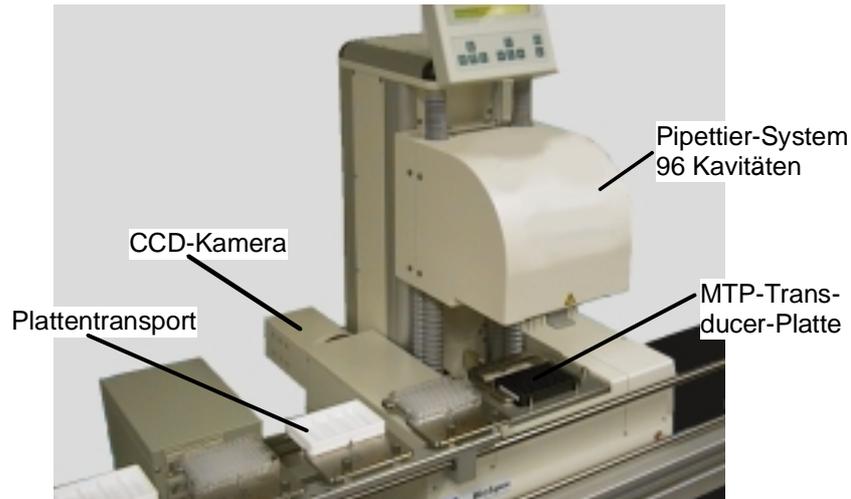


Abb. 3.4: Abbildung des Demonstrator 1 mit CCD-Kamera (EEV CCD 05-20) und dem Probenhandlingsystem LIBRARIAN LH.

Die verwendete Kamera stammte von EEV, Typ CCD05-20, mit einer Chipfläche von $17.3 \times 26 \text{ mm}^2$, einer Pixelfläche von $22.5 \mu\text{m}^2$, einer Pixelzahl von 770×1152 und einer full-well-Kapazität von $5 \cdot 10^5$ Elektronen. Lichtquelle und Stromversorgung sowie der optische Aufbau stammten von Carl Zeiss Jena unter der Bezeichnung BIOSPEC.

Das Liquid-Handling-System stammte von CyBio, Jena. Es beruhte auf der Basis des IGEL 250/96 mit dem Unterschied, daß der Dosierkopf vertikal beweglich war. Der Dosierkopf war für einen Volumenbereich von 5 bis $250 \mu\text{l}$ ausgerichtet und zeigte folgende Spezifikationen auf:

Anzahl der Kolben:	96
zu verwendete Tips:	MATRIX $250 \mu\text{l}$ tip for PlateMate MATRIX $250 \mu\text{l}$ extended tip (77 mm) for PlateMate
Volumina:	1 bis $250 \mu\text{l}$ in Schritten von $0,1 \mu\text{l}$ frei wählbar
Unpräzision:	10 bis $25 \mu\text{l} \Rightarrow \text{VK} \leq 2\%$ im Pipettiermode 25 bis $250 \mu\text{l} \Rightarrow \text{VK} \leq 1\%$ im Pipettiermode
MTP-Wagen	vier Plätze für Wannens oder Mikrotiterplatten

Die *RfS*-Transducer stammten von Schott als Sonderanfertigung und zeigten folgende Spezifikation: Als Substrat diente Glas vom Typ D263 mit einer Dicke von 1 mm. Im Einzelkanalsystem hatten die Transducer eine Beschichtung mit 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂, im Demonstrator 0a eine mit 10 bzw. 20 nm Ta₂O₅ und 375 nm SiO₂, im Demonstrator 0b eine mit 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂ und im Demonstrator 1 eine 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂ mit einer zusätzlichen Antireflexschicht.

3.2 Methoden

3.2.1 Modifikation der Transduceroberflächen im Einkanalsystem

- Silanisierung der Glastransducer

Die *RfS*-Transducer wurden in Piranha-Lösung gereinigt, mit bidest. Wasser gründlich abgespült und an der Luft getrocknet. Bei hoher Verschmutzung wurden sie zu Beginn der Reinigung erst 1 min in 6 M KOH inkubiert.

Zur Silanisierung wurden die sauberen Transducer entweder in einer frischen Lösung von 50 µL bidest. Wasser und 100 µL 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan in 10 mL Toluol 24 h geschüttelt, oder es wurden 1-5 µL 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) auf die gereinigten Transducer gegeben und für eine Stunde inkubiert.

Die mit Aminosilan behandelten Plättchen konnten mit bidest. Wasser abgespült und getrocknet werden, dagegen wurden die mit GOPTS behandelten Plättchen zum Schutz der Epoxygruppe mit trockenem Aceton gespült und im Stickstoffstrom sofort getrocknet.

- Belegung mit Aminodextran

Mit Aminosilan behandelte Transducer mußten zur weiteren Kupplung des Aminodextrans zuerst „umfunktionalisiert“ werden. Dazu wurden die Transducer mit einer Lösung von 2,5 g (25mmol) Bersteinsäureanhydrid in 10 mL PBS versetzt und unter Schütteln mit 3 M NaOH auf pH 6 titriert. Nachdem sich das Bernsteinsäureanhydrid aufgelöst hatte, wurde noch eine halbe Stunde weiter inkubiert. Die

Transducer wurden anschließend gründlich mit bidest. Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Zur Modifizierung der umgepolten Glasoberfläche mit Aminodextran wurden 7 μL einer 0,1 $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ Lösung von Aminodextran in bidest. Wasser auf den Transducer pipettiert, ca. 0,5 mg 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) zugegeben und mit dem Spatel verrührt. Die Reaktion wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach einer Stunde wurden nochmals 0,5 mg EDC zugegeben und über Nacht reagieren gelassen. Die Transducer wurden gründlich mit bidest. Wasser abspült und an der Luft getrocknet.

Die Belegung mit Aminodextran auf mit GOPTS behandelte Transducer war dagegen erheblich einfacher. Es wurde erwartet, daß die Epoxygruppe mit den Aminogruppen des Dextrans reagieren kann. Es wurden direkt 7 μL der 0,1 $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ Aminodextran-Lösung in bidest. Wasser auf den Transducer pipettiert und ein zweiter Transducer im Sandwich oben aufgelegt. Die Inkubation geschah über Nacht in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Transducer gründlich mit bidest. Wasser abspült und an der Luft getrocknet.

- Modifikation silanisierter Transducer mit funktionalisiertem Diaminopolyethylenglykol ($\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$)

Zur Modifikation von Transducern mit PEG wurden ausschließlich mit GOPTS behandelte Transducer verwendet. Dazu wurde eine Spatelspitze des trockenen PEG-Derivats auf einen silanierten Transducer gegeben, ein zweiter Transducer im Sandwich aufgelegt und über Nacht bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden die Transducer gründlich mit bidest. Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

- Modifikation der mit einem Polymer belegten Oberfläche mit einem Liganden

Die Wahl der Methode zur kovalenten Bindung eines Liganden hing von seiner funktionellen Gruppe, die zur Modifikation frei war, ab. Im Falle einer freien Aminogruppe wurden die funktionellen Aminogruppen des Polymers zuerst mit 5 μL einer Lösung von 10 mg Glutarsäureanhydrid in 1 μL Dimethylformamid (DMF) umfunktionalisiert. Die eigentliche Kupplung fand wie folgt statt: Inkubation einer Lösung aus 1 mg Ligand und 1 μL N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in 10 μL DMF über Nacht in einer DMF-gesättigten Kammer.

Liganden mit einer Sulfhydryl-Gruppe wurden auf zwei Arten gekuppelt. Die erste Methode geschah mit Hilfe des Butandiol-diglycidylethers. Dazu wurde Butandiol-diglycidylether unverdünnt auf einen mit einem Polymer modifizierten Transducer gegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde gründlich mit trockenem Aceton gespült und unter N₂-Strom getrocknet. Die andere Variante bestand in der Kupplung von EMCS in einer Lösung aus 1 mg EMCS in 10 µL DMF über Nacht in einer DMF-gesättigten Kammer. Anschließend wurde gründlich mit bidest. Wasser gespült. Die Kupplung des Liganden geschah in einer Lösung von 1 mg Liganden in 10 µL DMF bzw. bidest. Wasser, über Nacht in einer feuchten Kammer.

- Kupplung von DNA

Über gereinigte Transducern wurde in der Meßzelle zunächst 50 µg mL⁻¹ Polyethylenimin in PBS und anschließend 50 µg mL⁻¹ DNA in PBS, die zuvor im Ultraschallbad geschert wurde, gegeben.

3.2.2 Modifikation der Transduceroberflächen im parallelen System

Die Modifikation der Transducerplatten für die parallelen Systeme in den Dimensionen 45x60 und 80x108 mm² wurde in enger Anlehnung an die oben beschriebenen Protokolle durchgeführt. Transducer mit Antireflexschicht wurden aufgrund der Unverträglichkeit dieser Schicht mit Piranha-Lösung nur in einem Extran-Bad im Ultraschall gereinigt. Die Silanisierung der Transducer wurde ausschließlich mit GOPTS durchgeführt, indem im Sandwich zwei Transducer gleichzeitig modifiziert wurden. Auch die Kopplung des Aminodextran wurde im Sandwichverfahren durchgeführt, wozu die Aminodextranlösung 0,01 mg µL⁻¹ Aminodextran enthielt.

Die Kupplung von Liganden für die Systeme Demonstrator 0a und b wurden ebenfalls noch obigem Schema im Sandwich vollzogen, wozu auch eine notwendige Umfunktionalisierung der Aminogruppen des Polymers gehörte.

Die Transducerplatten des Demonstrator 1 wurden zunächst mit einem MTP-Grid durch Carl Zeiss Jena versehen, und standen einer Kupplung in organischen Lösungsmitteln nicht mehr zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Aminogruppen des Aminodextrans, wenn nötig, mit 2 mg Glutaranhydrid pro Kavität in 80 µL PBS bei

pH 6 umfunktionalisiert. Die daraus resultierenden Carboxygruppen wurden mit 1 M NHS- und 1,1 M EDC-Lösung aktiviert, und der Ligand in wässriger Lösung, 10 mg mL^{-1} , auf die aktivierte Oberfläche gegeben.

3.2.3 Bindungshemmtest

Zur Durchführung eines Bindungshemmtests wurden der Rezeptor und der Ligand 30 min in einem getrennten Gefäß inkubiert und danach über den Transducer gegeben. Dies geschah zum einen mittels FIA und zum anderen durch Pipettieren in die Kavität. Bei diesen Pipettierschritten wurden unterschiedliche Vorgehensweisen für die verwendeten Geräte erprobt. Während im Einkanalssystem mit Küvettenmeßzelle und im Demonstrator 1 der Puffer zuerst entfernt und danach die Probe auf den Transducer gegeben wurden, erwies sich beim Demonstrator 0a und b die Vorgabe von $15 \mu\text{L}$ Puffer und nach Aufzeichnung einer kurzen Basislinie die Zugabe der Probe mit kurzem Vermischen als die bessere Vorgehensweise. Zur Regeneration und nachfolgender Messung der Basislinie mit Puffer wurden die Lösungen vor Zugabe der neuen Lösung vollständig entfernt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Implementierung verschiedener Targets und die Entwicklung geeigneter Testformate für einen parallelen, markierungsfreien Detektionsaufbau zum Screening mit hohem Durchsatz auf Basis der reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Mit Rücksicht auf das physikalische Prinzip der *RIfS* ließen sich folgende Schwerpunkte für diese Arbeit ableiten: Untersuchung geeigneter Transducermodifikationen zur Kupplung eines der Bindungspartner, Entwicklung eines Testschemas für Messungen im ruhenden Probevolumen, Automatisierung des Testschemas und Auswahl einer geeigneten Datenauswertung.

4.1 Bindungshemmtest in ruhenden Proben

Wie in Kapitel 2.1 erwähnt, stellen Substanzen mit kleinem Molekulargewicht einen großen Anteil der einem Screening unterzogenen Verbindungen einer Bibliothek dar. Obwohl *RIfS* durchaus die Möglichkeit bietet, die Interaktion kleiner Substanzen mit einem immobilisierten Target direkt zu detektieren (Piehler et al. 1997, 1997a), bietet sich im Screening ein indirektes Testformat an, wenn ein Referenzligand vorhanden ist. Es ist verständlich, daß ein solches Testformat bei Liganden mit kleinem Molekulargewicht ein höheres Signal aus der Bindung des Targets an einen immobilisierten Referenzliganden ergibt, als die direkte Bindung der zu testenden Substanz mit dem immobilisierten Target. Des weiteren kann die Transduceroberfläche unter Beibehaltung der Aktivität des Referenzliganden leichter regeneriert werden, als eine an Aktivität verlustfreie Regeneration einer Oberfläche mit immobilisiertem Target. Aus diesen Gründen sollte hinsichtlich des Einsatzes eines parallelisierten *RIfS*-Aufbaus zum HTS in erster Linie der Bindungshemmtest als indirektes Testformat Verwendung finden.

4.1.1 Theoretische Charakterisierung des Bindungshemmtests in ruhenden Systemen

Ein Detektionssystem für biomolekulare Wechselwirkungen im HTS stellt auf Grund des geforderten hohen Durchsatzes auch besondere Ansprüche an die Probenhandhabung. Neben einer hohen Dosiergenauigkeit sollte das Probenhandhabungssystem sowohl störungsunanfällig sein als auch ein Verschleppen von Lösungen verhindern. Diese Anforderungen können mit Hilfe von Pipettierautomaten realisiert werden, die die geforderte Dosiergenauigkeit erreichen und durch das Wechseln der Pipettenspitzen einen kontinuierlichen und kontaminationsfreien Ablauf versprechen. Der hohe Durchsatz kann mittels Parallelisierung durch die Verwendung des Mikrotiterplattenformates realisiert werden.

Da ein Fließinjektionssystem zu aufwendig wäre und zu geringe Parallelisierung verspräche, sollte auch bei der Entwicklung eines parallelisierten *RIfS*-Aufbaus für den Einsatz im HTS eine einfache Art der Probenhandhabung in Form eines Pipettierautomaten genutzt werden. Dies bietet sich bei *RIfS* an, da das Auslesen des Transducers von unten geschieht, und somit die Probenhandhabung von oben ohne Störung der zeitaufgelösten Detektion erfolgen kann. Ebenfalls sollte auf ein Rühren der Proben in den einzelnen Probenpositionen der Mikrotiterplatte verzichtet werden. Aus diesen Beschränkungen resultierte schließlich ein Assay, der in ruhendem Probenvolumen durchgeführt wurde. Im Bereich markierungsfreier optischer Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an fest/flüssig-Phasengrenzen werden Messungen in der Regel in gerührten bzw. mittels Fließinjektion bewegten Proben durchgeführt. Erfahrungen mit Messungen in ruhenden Systemen sind sehr selten, obwohl Trurnit schon 1954 mittels Null-Ellipsometrie die prinzipielle Machbarkeit und die zu erwartenden Unterschiede zwischen Messungen mit gerührtem und ungerührtem Probenvolumen aufzeigen konnte. Der entscheidende Unterschied liegt in der Diffusion des in Lösung befindlichen Bindungspartners und des daraus resultierenden Massentransportes an die Oberfläche (Abb. 4.1). Durch Bindung des gelösten Partners (i.d.R. das Target bzw. der Rezeptor) an die Oberfläche kommt es zu einer Konzentrationsverarmung der Lösung, woraus sich eine Diffusionsgrenzschicht ausbildet. Diese bleibt in einem gerührten System

über einen größeren Zeitraum konstant, während sie in einem ruhenden System vom Beginn der Messung an ständig größer wird. Aus diesem Grund bleibt der Massentransport auch im gerührten System konstant, im Gegensatz zum ungerührten. Für beide Systeme ist gleich, daß der Verlauf der Bindungskurve solange Massentransport limitiert bleibt, solange die Zahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche weit größer ist als die Zahl der Moleküle, die durch die Diffusionsgrenzschicht zur Oberfläche gelangen. Dies ist i.d.R. solange der Fall, solange nicht mehr als 20% der maximalen Oberflächenbelegung erreicht ist (Piehler 1997b). Eine ausführliche Beschreibung des Einflusses des Massentransportes ist bei Glaser (1993) für der Fall des gerührten Systems nachzulesen.

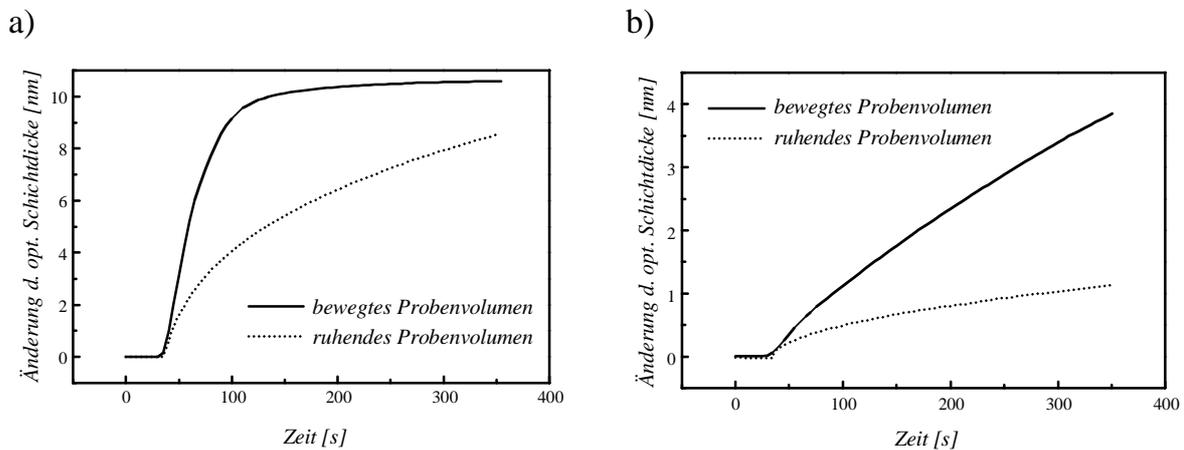


Abb. 4.1: Vergleich der Bindung von Thrombin zu einen am Transducer immobilisierten Inhibitor für gerührte und ruhende Proben bei a) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ und b) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin.

Abb. 4.1 zeigt den prinzipiellen Unterschied zwischen gerührten und ungerührten Proben anhand der Bindung von Thrombin an einen immobilisierten Inhibitor. In erster Linie ist eine schnellere Schichtdickenzunahme bei *RIfS* im gerührten System durch den höheren Massentransport zu beobachten. Hinzu kommt, daß bei kleineren Konzentrationen der Massentransport zu Beginn der Messung über einen längeren Zeitraum konstant bleibt, was zu einem linearen Anstieg der Schichtdicke führt. Im Gegensatz dazu ist der Verlauf der Bindungskurven in ruhenden Proben durch die Zunahme der Diffusionsgrenzschicht und der damit verbundenen Abnahme des Massentransportes gekrümmt, und die beobachtbare Schichtdickenzunahme in *RIfS* ist langsamer.

Dieser Verlauf kann mit Hilfe des 2. Fickschen Gesetzes beschrieben werden, das die Diffusion eines Stoffes und die damit verbundene zeitliche Änderung der Konzentration an jeder Ortskoordinate erklärt.

Im folgenden wurden theoretische Berechnungen durchgeführt, die Anwendbarkeit eines Bindungshemmtests mit ruhenden Proben für das HTS zu überprüfen. Zunächst sollte geklärt werden, welchen Einfluß der Diffusionskoeffizient auf die Dauer eines Assays und auf das aus der Bindung des freien Rezeptors an die Transduceroberfläche resultierende Signal ausübt. Wie oben besprochen, wurde ein indirektes Testformat eingeführt, um durch die Bindung des normalerweise wesentlich größeren Targets ein höheres Signal zu erreichen. Da es bei den Targets in der Regel um Proteine mit einer großen Molekülstruktur bzw. -gewicht handelt, muß man mit kleinen Diffusionskoeffizienten bzw. geringen Diffusionsgeschwindigkeiten rechnen. Typische Diffusionskoeffizienten für Makromoleküle wie Proteine liegen zwischen 10^{-6} und $7 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ für Molekulargewichte von 13 bis 400 kDa bei 20°C in Wasser (Atkins 1990). Ein weiterer Punkt, den es zu klären galt, war die zu erwartende Höhe der Diffusionsgrenzschicht in der Probenkavität. Es sollte gezeigt werden, ob die Füllhöhe in den Kavitäten der Mikrotiterplatte ausreichend hoch ist, um zu verhindern, daß die Diffusionsgrenzschicht die gesamte Füllhöhe durchläuft und damit die Bindungskurve nicht mehr nur dem 2. Fickschen Gesetz folgt, sondern durch die Verarmung der Probenlösung kontrolliert wird.

Zur Berechnung des Einflusses der Diffusion des Rezeptors auf den Testablauf mußte eine Lösung für die Gleichung des 2. Fickschen Gesetzes gefunden werden (Gl. 4.1). C_R entspricht in der Gleichung der Rezeptorkonzentration zu einer beliebigen Zeit t an einem beliebigen Ort x , während D den Diffusionskoeffizienten repräsentiert.

$$\text{Diffusionsgleichung} \quad \frac{\partial C_R}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Zur Lösung der Gl. 4.1 wurden zunächst folgende Annahmen getroffen: Das Problem wurde als eindimensionales System angesehen. Dazu wurde die Probe mit gelöstem Rezeptor als Flüssigkeitssäule der Länge l über der Transduceroberfläche betrachtet, wobei die Diffusion des Rezeptors entlang der Ortskoordinate x nur in eine Richtung

zur Oberfläche ablaufen sollte. Die das Problem beschreibende Gl. 4.1 konnte somit gelöst werden, wenn folgende Anfangs- und Randbedingungen gewählt wurden.

$$\text{Anfangsbedingung} \quad C_{R(x,t=0)} = C_{R0} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

$$1. \text{ Randbedingung} \quad C_{R(x=l,t)} = C_{R0} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

$$2. \text{ Randbedingung} \quad C_{R(x=0,t)} = 0 \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Als Anfangsbedingung wurde festgelegt, daß die Rezeptorkonzentration C_R zum Zeitpunkt $t=0$ für alle Ortskoordinaten x gleich der Ausgangskonzentration C_{R0} ist (Gl. 4.2). Diese Bedingung ist durch den Versuchsablauf gegeben, bei dem die Reaktion durch Zugabe der Probe auf den Transducer gestartet wird. Weiter mußten zwei Randbedingungen eingefügt werden. Die erste geht davon aus, daß die Rezeptorkonzentration am Ende der Flüssigkeitssäule an der Ortskoordinate $x=l$ über die gesamte Dauer konstant gleich der Ausgangskonzentration bleibt (Gl. 4.3). Dies ist solange der Fall, bis die Diffusionsgrenzschicht die Länge l erreicht hat. Die zweite wichtige Randbedingung setzt voraus, daß die Konzentration an Rezeptor, der auf der Transduceroberfläche an der Ortskoordinate $x=0$ ungebunden vorliegt, während der ganzen Zeit Null ist (Gl. 4.4). Dies ist der Fall, wenn freier Rezeptor wegen der hohen Anzahl an Bindungsstellen auf der Transduceroberfläche direkt gebunden wird und zunächst gebundener Rezeptor nach Dissoziation statt in die Lösung zurück zu diffundieren eine andere Bindungsstelle findet. Er verbleibt danach an der Oberfläche. Dies ist ebenfalls bei ausreichend hoher Anzahl an Bindungsstellen auf der Oberfläche zumindest zu Beginn der Messung gegeben.

Unter diesen Bedingungen erhielt man schließlich folgende Lösung der Diffusionsgleichung, die die Rezeptorkonzentration zu jeder beliebigen Zeit t an jeder beliebigen Ortskoordinate x angibt.

$$C_{R(x,t)} = \sum_n \frac{4C_{R0}}{(2n-1)\pi} e^{-\frac{(2n-1)^2\pi^2Dt}{l^2}} \sin \frac{(2n-1)\pi x}{l}, \quad (n \in \mathbb{N}) \quad (\text{Gl. 4.5})$$

Mit Hilfe dieser Lösung konnte die zeitliche Änderung des Konzentrationsprofils eines Rezeptors in einer ruhenden Probe, der an die Transduceroberfläche diffundiert, nach-

vollzogen werden. Abb. 4.2 zeigt solche Konzentrationsprofile für unterschiedliche Zeiten und unterschiedliche Diffusionskoeffizienten. Die Berechnungen zeigen, daß selbst bei einem sehr großen Diffusionskoeffizienten von $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ die Diffusionsgrenzschicht nach 10 min nicht über 2 mm hinaus geht. Die Füllhöhe in einer Kavität einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten beträgt für ein typisches Probevolumen von $150 \mu\text{L}$ bzw. für eine Platte mit 384 Kavitäten bei $50 \mu\text{L}$ Probe etwa 5 mm. Das bedeutet, daß man unter den o.g. Bedingungen nicht Gefahr läuft, bei Messungen eine zu große Diffusionsgrenzschicht zu erzeugen und damit eine durch Verarmung geprägte Bindung des Rezeptors an die Oberfläche erhält.

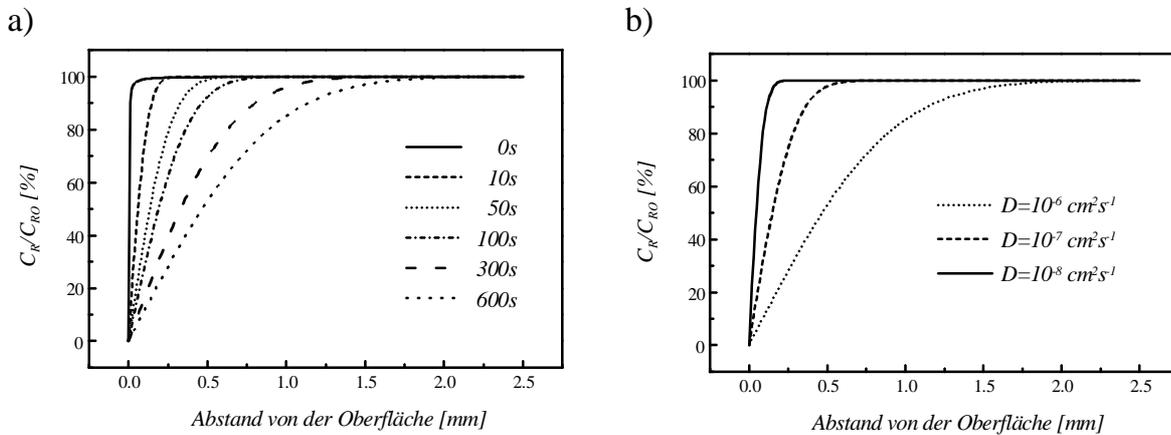


Abb. 4.2: Konzentrationsprofile für die Diffusion eines Rezeptor auf die Oberfläche berechnet nach Gl. 4.5. a) Konzentrationsprofile bei unterschiedlichen Zeiten für den Diffusionskoeffizienten $D=10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. b) Konzentrationsprofile für unterschiedliche Diffusionskoeffizienten nach 10 min.

Die nächste Überlegung, die mit Hilfe dieser Modellrechnungen betrachtet wurde, war, welches Signal unter diesen diffusionslimitierten Bedingungen zu erwarten ist, auch in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten. Ebenfalls war die Frage nach einer geeigneten Auswertung der Bindungskurven wichtig. Dazu mußte Gleichung 4.5 über x in den Grenzen $x=0$ bis l integriert werden.

$$C_{R(t)} = \sum_n \frac{-8lC_{R0}}{(2n-1)^2 \pi^2} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 D t}{l^2}} \left(\cos\left(\frac{(2n-1)\pi}{2}\right) - 1 \right), \quad (n \in \mathbb{N}) \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Gleichung 4.6 zeigt die aus der Integration resultierende Funktion, die die Rezeptorkonzentration C_R in der Probe zu einem beliebigen Zeitpunkt t angibt. Daraus läßt sich

die Zunahme an auf die Oberfläche diffundierenden Rezeptor berechnen. Abb. 4.3 zeigt den zu erwartenden Verlauf einer Bindungskurve. Zu erkennen ist der in realen Messungen (Abb. 4.1) schon gezeigte gekrümmte Verlauf, der sich mit der Zunahme der Diffusionsgrenzschicht erklären läßt.

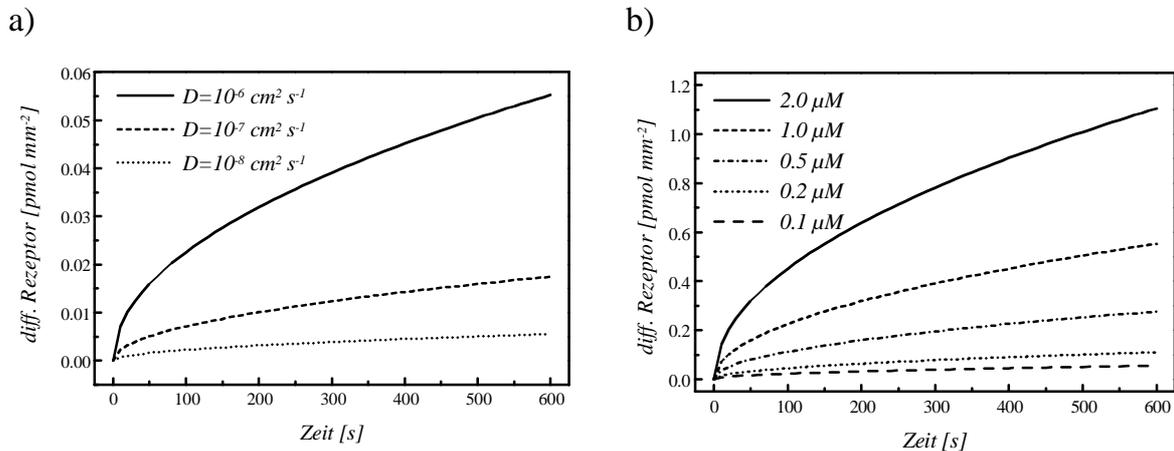


Abb. 4.3: Zeitlicher Verlauf der Diffusion eines Rezeptors an die Transduceroberfläche berechnet nach Gl. 4.6. a) Vergleich unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten für eine Rezeptorkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$. b) Vergleich unterschiedlicher Rezeptorkonzentrationen für einen Diffusionskoeffizienten $D=10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Aus der Anzahl der Rezeptormoleküle pro Fläche läßt sich das resultierende *RfS*-Signal berechnen, wozu das dem Diffusionskoeffizienten entsprechende Molekulargewicht benötigt wird. Eine genaue Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten und dem Molekulargewicht besteht nicht unmittelbar, dennoch gilt nach der Stokes-Einstein-Beziehung für den Diffusionskoeffizienten D , daß er direkt proportional zur Temperatur T , jedoch indirekt proportional zur Viskosität η und zum effektive hydrodynamische Radius r_0 des Moleküls ist. Dabei entspricht k der Boltzmann-Konstante (Gl. 4.7).

$$\text{Stokes-Einstein-Beziehung} \quad D = \frac{kT}{6\pi\eta r_0} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Unter der Annahme, daß es sich bei dem Rezeptor um ein globuläres und damit annähernd kugelförmiges Protein handelt, läßt sich über den Radius r_0 eine Beziehung zwischen Diffusionskoeffizient und dem Molekülvolumen machen. Geht man davon aus, daß die spezifische Dichte von Proteinen für alle Arten annähernd gleich ist, sind Vo-

lumen und Molekulargewicht (MG) direkt proportional. Somit läßt sich der Diffusionskoeffizient über das Volumen einer Kugel indirekt proportional zur 3. Wurzel des Molekulargewichtes des Proteins setzen (Gl. 4.8).

Beziehung Diffusionskoeffizient/Molekulargewicht

$$D \approx \frac{1}{r_0} \approx \frac{1}{\sqrt[3]{V_{\text{Rezeptor}}}} \approx \frac{1}{\sqrt[3]{MG_{\text{Rezeptor}}}} \quad (\text{Gl. 4.8})$$

Daraus ergeben sich bei gleicher Ausgangskonzentration für unterschiedliche Diffusionskoeffizienten unterschiedliche Massenbelegungen bzw. daraus resultierende *RIfS*-Signal-Änderungen. Das Ausmaß unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten ist in Tab. 4.1 dargestellt. Zur Berechnung der *RIfS*-Signal-Änderung aus der Massenbelegung wurde der Faktor $1,6 \text{ nm ng}^{-1}$ nach Piehler (1997c) herangezogen.

Tab. 4.1: Einfluß des Diffusionskoeffizienten auf die auf den Transducer diffundierte Masse und dem damit verbundenen Signal. Die Ausgangskonzentration C_{RO} wurde mit $0,1 \mu\text{M}$ angenommen.

Diffusionskoeffizient [cm^2s^{-1}]	nach Stokes-Einstein angenommenes Molekulargewicht [kDa]	massenabhäng. Rezeptorkonzentration C_{RO} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Oberflächenbelegung n.10 min [ng mm^{-2}]	<i>RIfS</i> -Signal-Änderungen n.10 min [nm mm^{-2}]
10^{-6}	20	2	1	1,7
10^{-7}	700	70	12	19,5
10^{-8}	1.500	150	8	13,3

Aus der Tabelle geht hervor, daß die zu erzielenden Signaländerungen mit Rücksicht auf einen Einsatz des Bindungshemmtests auf einem parallelen *RIfS*-Detektionssystem für das HTS ausreichend sein sollten. In diesem Zusammenhang ist es aber wichtig, sich zu vergegenwärtigen, daß die in Tab. 4.1 angenommene Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ für Proteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa sehr hoch liegt, da gerade in der Vorbereitung des Targetproteins zum HTS, wie z.B. seine Expression und chromatographische Trennung, gewöhnlich die Proteinmasse die limitierende Rolle spielt.

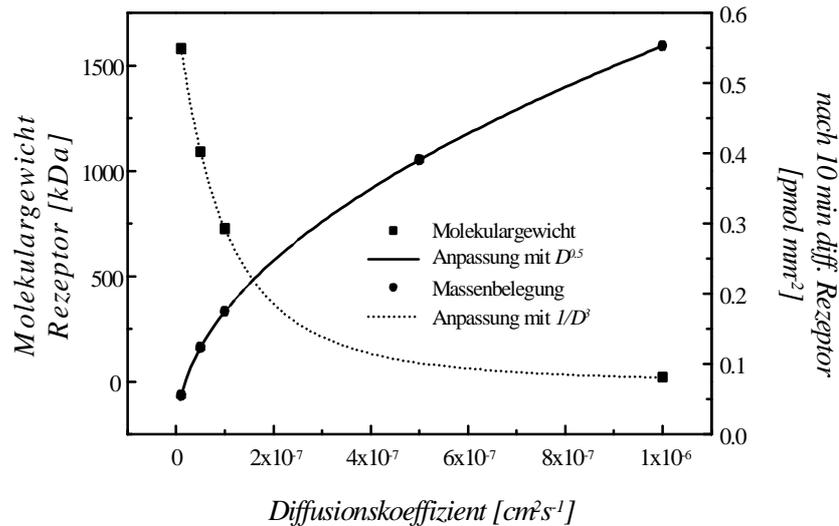


Abb. 4.4: Abhängigkeit des Molekulargewichtes nach Stokes-Einstein (Gl. 4.8) und der Oberflächenbelegung vom Diffusionskoeffizienten (berechnet nach Gl. 4.6). Die Anpassungen wurde mit den Funktionen $f(x) = 1/(aD + b)^3$ bzw. $f(x) = a\sqrt{D}$ durchgeführt.

Ebenfalls fällt auf, daß die Oberflächenbelegung mit kleiner werdenden Diffusionskoeffizienten und zunehmendem Molekulargewicht nur bis zu einem Optimum ansteigt und dann wieder abnimmt. Eine Erklärung dafür wird deutlich, wenn man bedenkt, daß das Molekulargewicht mit zunehmendem Diffusionskoeffizienten mit dritter Potenz abnimmt, die Oberflächenbelegung zu einem bestimmten Zeitpunkt hingegen mit der Quadratwurzel des Diffusionskoeffizienten zunimmt (Abb. 4.4).

Mit Hilfe dieser Simulationsrechnungen sollte ebenfalls eine praktikable Auswertemethode der Bindungskurven gefunden werden. Vergleicht man den Verlauf der Bindungskurve in gerührten und ruhenden Proben (Abb. 4.1), so läßt sich gleich erkennen, daß im Fall von ruhenden Proben eine lineare Auswertung der von der Rezeptorkonzentration abhängigen zeitlichen Massenbelegung nicht möglich ist. Nach der Cottrell-Gleichung (Gl. 4.9), die in der Elektrochemie Anwendung findet, wird deutlich, daß der Fluß diffundierender Teilchen j_D von einem Ort zum anderen sich indirekt proportional zur Wurzel der Zeit t verhält (Eddowes 1990). Die Massenbelegung berechnet sich daraus durch Integration über die Ortskoordinaten, so daß sie sich direkt proportional zur Wurzel der Zeit t verhält.

Cottrell-Gleichung
$$j_D = \sqrt{\frac{D}{\pi t}} C_{R0} \quad (\text{Gl. 4.9})$$

Somit sollte es möglich sein, die gekrümmten Bindungskurven in ruhenden Proben mittels Anpassung an eine Funktion wie Gl. 4.10 auswerten zu können. Dabei soll S das Signal hervorgerufen durch die Massenbelegung des Transducers zum Zeitpunkt t darstellen.

Wurzelanpassung
$$S_t = A\sqrt{t} + S_0 \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Dieses Auswertungsschema wurde beispielhaft auf simulierte Bindungskurven angewendet (Abb. 4.5). Der Proportionalitätsfaktor A ist dabei wie erwartet linear zur eingesetzten Rezeptorkonzentration (nicht gezeigt). Damit ergibt sich ebenfalls eine Linearität zwischen der Rezeptorkonzentration und dem Signal nach einer bestimmten Zeit t (Abb. 4.6).

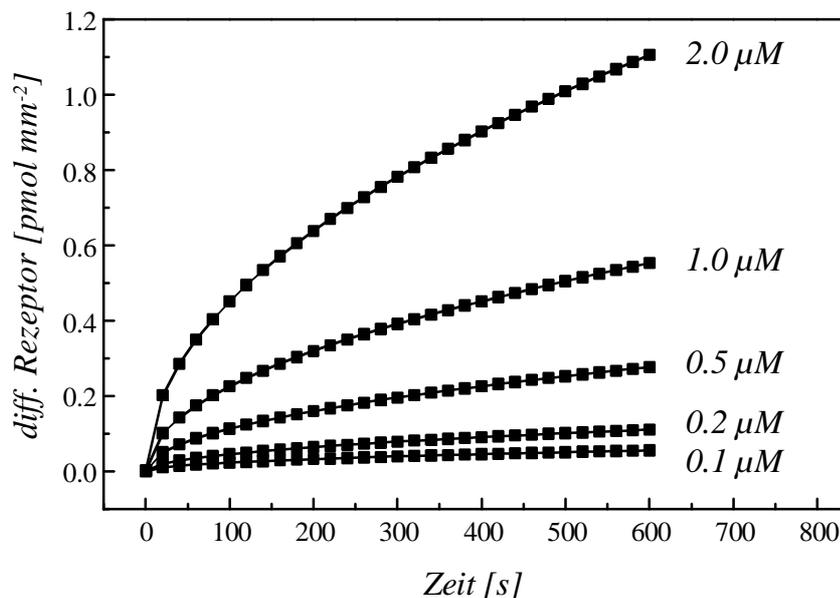


Abb. 4.5: Anpassung simulierter Bindungskurven für unterschiedliche Rezeptorkonzentrationen in ruhenden Proben mittels der Funktion $S(t) = A\sqrt{t}$. Der verwendete Diffusionskoeffizient D betrug $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Der Signaländerung nach einer bestimmten Zeit sollte gegenüber dem Proportionalitätsfaktor A der Vorzug gegeben werden, da sich eine Auswertung durch Feststellen der Signaländerung zu einem bestimmten Zeitpunkt als praktikabler erweisen sollte.

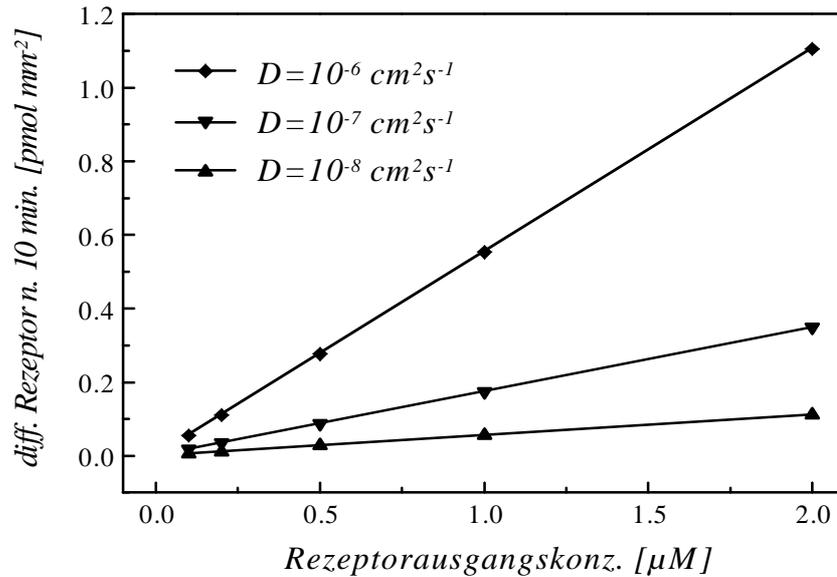


Abb. 4.6: Linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Rezeptorkonzentration und der Menge an auf den Transducer diffundiertem Rezeptor nach 10 min. für unterschiedliche Diffusionskoeffizienten.

Das Testformat des Bindungshemmtests wurde in 2.1.3 ausführlich diskutiert. In gerührten Proben ist dabei die Voraussetzung gegeben, daß das voreingestellte Bindungsgleichgewicht in Lösung zwischen Rezeptor und der zu testenden Substanz durch die Bindung von freiem Rezeptor an den modifizierten Transducer nicht wesentlich beeinflußt wird. Dies geschieht vor allem durch die geringe Dimension der Diffusionsgrenzschicht in gerührten Systemen. Im Gegensatz dazu ist eine gleichbleibend kleine Diffusionsgrenzschicht in ruhenden Proben nicht gewährleistet (Abb. 4.2). Aus diesem Grund sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit sich das Bindungsgleichgewicht in einer anwachsenden Diffusionsgrenzschicht in ruhenden Proben ändert und damit das Resultat des Bindungshemmtests verfälscht wird. Dazu sollten Simulationsrechnungen durchgeführt werden, die sowohl die Diffusion von freiem Rezeptor an die Transduceroberfläche mit gleichzeitiger Bindung an die Oberfläche als auch die Änderung des voreingestellten Bindungsgleichgewichtes zwischen Rezeptor und der zu testenden Substanz in Lösung berücksichtigen. Ein Schema der in diesen Berechnungen zu berücksichtigenden Reaktionen ist in Abb. 4.7 gezeigt. Dazu gehören zu einem die Diffusion des freien Rezeptors an die Transduceroberfläche und die Dissoziation des gebildeten Rezeptor-Substanz-Komplexes mit der Dissoziationsratenkonstanten k_{diss} .

bzw. der Reassoziaton mit der Assoziationsratenkonstanten k_{ass1} innerhalb der Diffusionsgrenzschicht. Zwei weitere Reaktionen betreffen die Bindung des freien Rezeptors an den auf der Transduceroberfläche immobilisierten Referenzliganden mit ebenfalls zwei Ratenkonstanten k_{ass2} und k_{diss2} für Hin- und Rückreaktion.

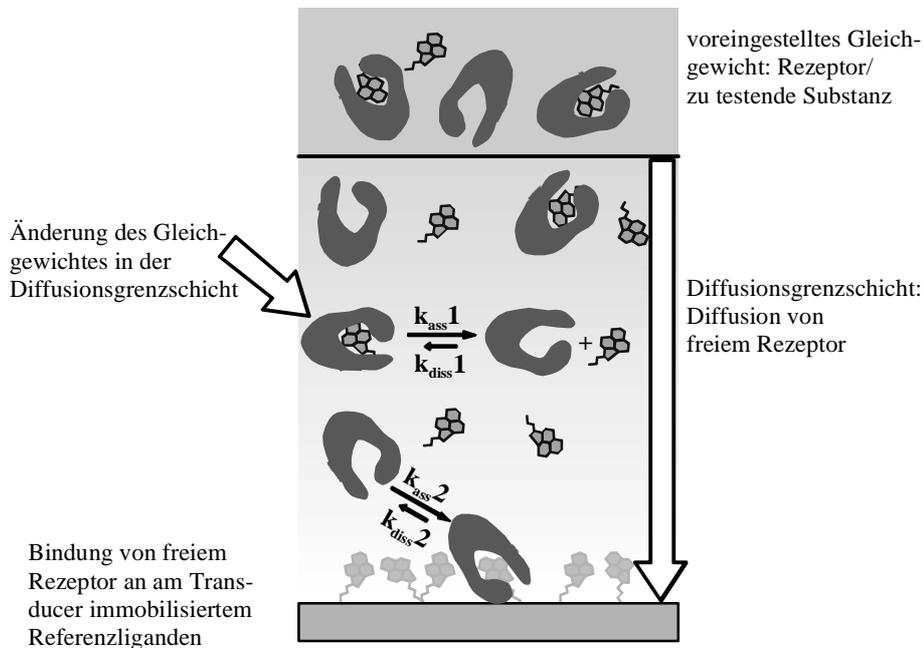


Abb. 4.7: Schema der Reaktionen eines Bindungshemmtests in ruhenden Proben. Das voreingestellte Bindungsgleichgewicht ändert sich innerhalb der Diffusionsgrenzschicht mit den Zeitkonstanten k_{ass1} und k_{diss1} . Freier bzw. frei gewordener Rezeptor diffundiert zur Transduceroberfläche und bindet an immobilisierten Referenzliganden mit den Zeitkonstanten k_{ass2} und k_{diss2} .

Da in dieser Simulation zwei Prozesse berücksichtigt werden mußten, nämlich sowohl Diffusionsprozesse als auch kinetische Prozesse, wurde ein numerisches Modell zur Berechnung erstellt, das im Wesentlichen in Abb. 4.8 vorgestellt wird.

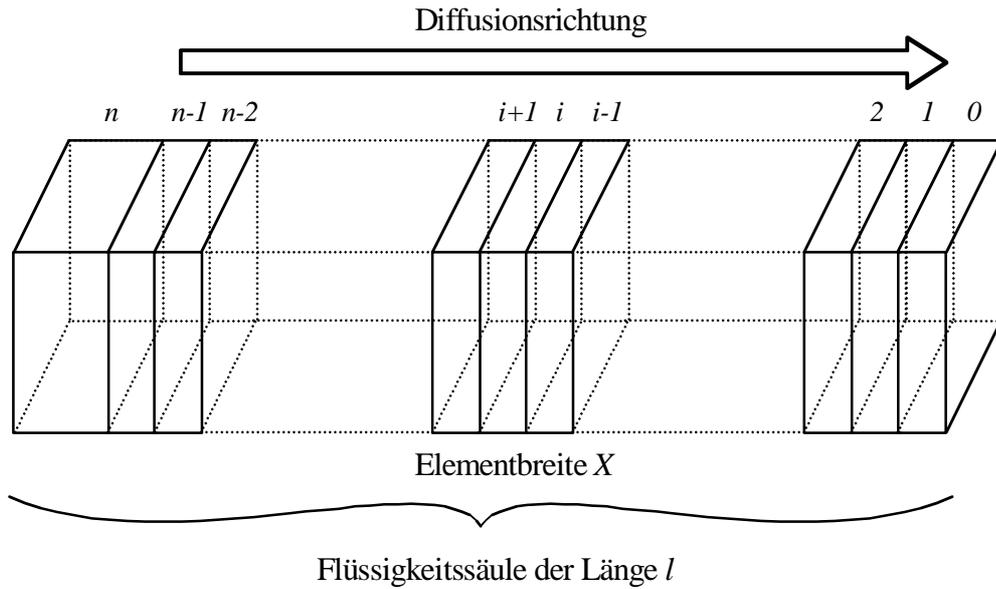


Abb. 4.8: Schema des numerischen Modells zur Berechnung des Bindungshemmtests in ruhender Probe. Die über dem Transducer gedachte Flüssigkeitssäule der Probe mit der Länge l wurde in n Elemente der Breite x aufgeteilt. Die Transduceroberfläche ist Element 0, das Ende der Flüssigkeitssäule Element n .

Die Diffusion des freien Rezeptors berechnet sich als Austausch von Element zu Element nach dem 1. Fickschen Gesetz. Die Änderung der Konzentration an freiem Rezeptor $C_{R(i)}$ in einem Element i durch Diffusion ergibt sich somit aus den Konzentrationsdifferenzen zwischen Element i und dem vorherigen Element $i-1$ bzw. dem nachfolgenden Element $i+1$. Der Fluß j_- zwischen Element i und $i-1$ berechnet sich damit nach

$$j_- = -AD \left(\frac{\Delta C_R}{X} \right) = -AD \cdot \left(\frac{C_{R(i)} - C_{R(i-1)}}{X} \right) \quad (\text{Gl. 4.11})$$

während dementsprechend für den Fluß von Element $i+1$ nach i gilt:

$$j_+ = -AD \left(\frac{C_{R(i+1)} - C_{R(i)}}{X} \right) \quad (\text{Gl. 4.12})$$

Dabei entspricht A der Fläche der Flüssigkeitssäule und X der Elementbreite. Um von der Änderung der Teilchenzahl zur Konzentrationsänderung an freiem Rezeptor zu kommen, müssen Gl. 4.11 und 4.12 zusammengefaßt und durch das Volumen des Ele-

menten $V = AX$ dividiert werden. Für die Änderung der Konzentration im Element i innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls Δt gilt dann:

$$\Delta C_{R(i)} = D \left(\frac{C_{R(i-1)} - 2C_{R(i)} + C_{R(i+1)}}{X^2} \right) \Delta t \quad (\text{Gl. 4.13})$$

Durch diese Konzentrationsänderung an freiem Rezeptor kommt es verständlicherweise auch zu einer Verschiebung des voreingestellten Gleichgewichtes $C_R + C_S \xrightleftharpoons[k_{diss}]{k_{ass}} C_{R-S}$ in der Probe. Die dadurch verursachte Diffusion von frei gewordenem Rezeptor C_R , freier Substanz C_S aber auch von Rezeptor-Substanz-Komplex C_{R-S} kann analog zu Gl. 4.13 berechnet werden. Die Kinetik der Reaktionen wurde ebenfalls für jedes Element i zu jedem Zeitintervall Δt wie folgt berechnet:

$$\Delta C_{R-S(i)} = (-k_{diss} C_{R-S(i)} + k_{ass} C_{R(i)} C_{S(i)}) \Delta t \quad (\text{Gl. 4.14})$$

Analog kann somit auch die Änderung an freiem Rezeptor oder freier Substanz berechnet werden. Als Ausgangskonzentrationen bzw. -bedingungen zum Zeitpunkt $t=0$ wurden, entsprechend dem Massenwirkungsgesetz, folgende Werte für alle n Elemente angenommen. Somit ergab sich für die Anfangskonzentration des Rezeptor-Substanz-Komplexes C_{R-S} mit der Rezeptorausgangskonzentration C_{R0} , der Substranzausgangskonzentration C_{S0} und der Affinitätskonstanten K

$$C_{R-S(t=0)} = \frac{C_{R0} + C_{S0} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{\left(C_{R0} + C_{S0} + \frac{1}{K} \right)^2}{4} - C_{R0} C_{S0}} \quad (\text{Gl. 4.15})$$

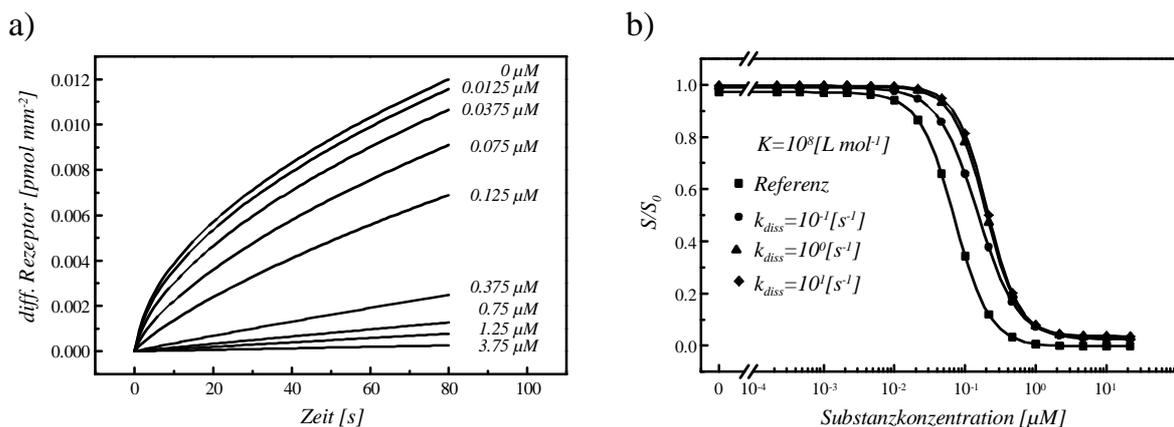
und für die Konzentrationen an freiem Rezeptor C_R und freier Substanz C_S

$$C_R = C_{R0} - C_{R-S}; \quad C_S = C_{S0} - C_{R-S} \quad (\text{Gl. 4.16})$$

Für die nun folgenden Simulationsberechnungen wurden außerdem bestimmte Randbedingungen gewählt. So sollten ähnlich der vorangegangenen Berechnungen zur Diffusion die Konzentrationen im letzten Element n keine Änderungen erfahren. Dies wurde dadurch gewährleistet, indem die Zahl der Elemente und damit auch die Breite der Element so hoch bzw. klein gewählt wurden, daß im zeitlichen Verlauf keine Änderungen auftraten. Eine weitere Randbedingung betraf die Reaktionen auf der Trans-

duceroberfläche im Element 0 . Hier sollte ebenfalls wie in den vorangegangenen Berechnungen die Konzentration an freiem Rezeptor ständig null sein, was bedeutet, daß freier Rezeptor durch die hohe Zahl an Bindungsstellen sofort an der Oberfläche bindet und bei Dissoziation nicht wieder zurück in Lösung geht, sondern an anderer Stelle auf der Oberfläche verbleibt. Somit konnten die kinetischen Prozesse auf der Oberfläche, die in Abb. 4.7 mit den Ratenkonstanten k_{ass} und k_{diss} für Hin- und Rückreaktion beschrieben sind, außer Acht gelassen werden.

Für die Simulationsrechnungen wurden unterschiedliche Affinitätskonstanten K von 10^4 - 10^8 $L mol^{-1}$ und unterschiedliche Dissoziationsratenkonstanten k_{diss} zwischen 10^{-1} - 10^1 s^{-1} ausgesucht, weshalb die Assoziationsratenkonstanten k_{ass} in einen Bereich zwischen 10^3 - 10^9 $L mol^{-1}s^{-1}$ lagen. Der Diffusionskoeffizient des freien Rezeptors wurde hingegen nicht variiert, da davon auszugehen war, daß nur bei hohen Diffusionskoeffizienten der Einfluß an frei gewordenem Rezeptor eine Rolle spielen wird. Somit wurde ein sehr hoher Diffusionskoeffizient mit $D=10^{-6} cm^2 s^{-1}$ gewählt. Als Rezeptorausgangskonzentration wurde konstant $C_{RO}=0,125 \mu M$ angenommen, da dies der in den Versuchen eingesetzten Thrombinkonzentration entsprach. Mit Hilfe der Berechnungen sollten nun unter o.g. Vorgaben Bindungshemmtests simuliert und ein geeignetes Modell zur Auswertung dieser Tests gefunden werden.



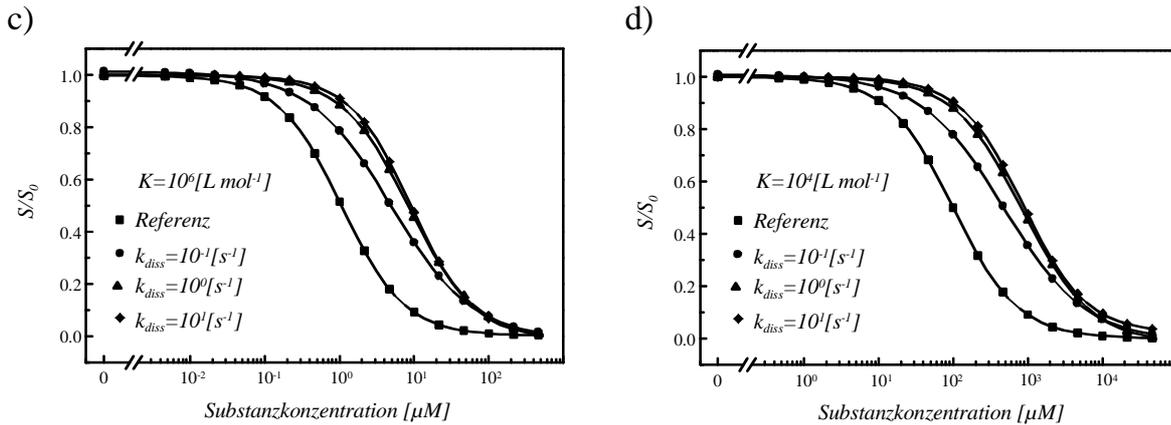


Abb. 4.9: Simulation von Bindungshemmtests in ruhenden Proben. a) Simulierte Bindungskurven in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration. b-d) Aus den Bindungskurven resultierende Titrationskurven. Die Referenzkurve spiegelt den Anteil an freiem Rezeptor nach dem Massenwirkungsgesetz wider, während die anderen Kurven für ein ruhendes System mit unterschiedlichen Dissoziationsratenkonstanten berechnet wurden.

Die Simulationen wurden mit steigender Substanzkonzentration durchgeführt, und die erhaltenen Bindungskurven mit Hilfe der Wurzelanpassung ausgewertet (Abb. 4.9a). Als ermittelte Signaländerung S wurde die Menge an auf die Oberfläche diffundiertem freien Rezeptor nach 80 s angenommen, welche in Relation zur Signaländerung S_0 bei einer Substanzkonzentration von $C_S=0$ gesetzt wurde (Abb. 4.9b-d). Die Titrationskurven geben die Ergebnisse der simulierten Bindungshemmtests wieder, einmal als Referenz berechnet nach dem Massenwirkungsgesetz gemäß Gl. 2.2, und nach dem oben beschriebenen numerischen Modell für unterschiedliche Affinitätskonstanten und verschiedene Dissoziationsratenkonstanten k_{diss} . Da das Ergebnis eines Bindungshemmtests der Konzentration an freiem Rezeptor im voreingestellten Gleichgewicht entspricht, sollten die Titrationskurven in Abb. 4.9b-d gemäß dem Massenwirkungsgesetz (Gl. 2.2) ausgewertet, und die Affinitätskonstante K ermittelt werden können. Es zeigte sich aber, daß die Ergebnisse, die für das ruhende System erhalten wurden, im Gegensatz zur Referenz, nicht mit Hilfe von Gl. 2.2 angepaßt werden konnten.

Somit wurde nach einer anderen Interpretation gesucht und in der logistischen Funktion gefunden:

Logistische Funktion
$$S = \frac{S_{\min} - S_{\max}}{1 + \left(\frac{C_{S0}}{C_{S(T_m)}} \right)^p} + S_{\max} \quad (\text{Gl. 4.17})$$

Dabei entsprechen S_{\min} und S_{\max} dem kleinsten bzw. größten Signal, $C_{S0(T_m)}$ der Substanzausgangskonzentration am Testmittelpunkt T_m , an dem 50% des Signalhubs von $S_{\max} - S_{\min}$ erreicht wird, C_{S0} der jeweils eingesetzten Substanzausgangskonzentration und p der Steigung im T_m . T_m kann hier als Maß für die Affinität der Substanz zum Rezeptor behandelt werden (Dudley 1985). Zusätzlich läßt sich aus T_m auch die Affinitätskonstante K berechnen, da am T_m gilt:

$$C_{R(T_m)} = C_{R-S(T_m)} = \frac{1}{2} C_{R0} \quad (\text{Gl. 4.18})$$

Wobei $C_{R(T_m)}$ und $C_{R-S(T_m)}$ die Konzentration an freiem Rezeptor bzw. Rezeptor-Substanz-Komplexes im Testmittelpunkt darstellt. Da immer gilt:

$$C_S = C_{S0} - C_{R-S} \quad (\text{Gl. 4.19})$$

ergibt sich aus Gl. 4.19 und dem MWG:

$$K = \frac{C_{R-S(T_m)}}{C_{R(T_m)} C_{S(T_m)}} = \frac{1}{C_{S(T_m)}} \quad (\text{Gl. 4.20})$$

woraus sich für K ergibt:

$$K = \frac{1}{C_{S0(T_m)} - C_{R-S(T_m)}} = \frac{1}{C_{S0(T_m)} - \frac{1}{2} C_{R0}} \quad (\text{Gl. 4.21})$$

wobei $C_{S0(T_m)}$ der Substanzausgangskonzentration im T_m entspricht.

Tab. 4.2 spiegelt das Ergebnis der Simulationsrechnungen wider. Anhand der Testmittelpunkte läßt sich, wie in Abb. 4.9 zu sehen ist, eine Verschiebung der Kurve zu höheren Substanzkonzentrationen feststellen. Dies bedeutet für den Bindungshemmtest in der Realität, daß der dissozierende Teil an Rezeptor-Substanz-Komplex und der damit frei werdende Rezeptor aufgrund der ruhenden Probe zusätzlich für eine Bindung sorgt, und damit zu einer vollständigen Hemmung des Rezeptors höhere Substanzkonzentrationen nötig sind. Für das Ergebnis eines solchen Bindungshemmtest bedeutet

dies, daß die Affinität von Rezeptor zur Substanz als zu klein ermittelt wird, in Abhängigkeit von der Dissoziationsratenkonstanten.

Tab. 4.2: Vergleich der durch Simulationsrechnungen von Bindungshemmtest in ruhenden Proben erhaltenen Testmittelpunkte bzw. Affinitätskonstanten in Abhängigkeit von k_{diss} .

Vorausgesetzte Affinitätskonstante K [L mol ⁻¹]	Referenz gemäß MWG		$k_{diss}=10^{-1}$ [s ⁻¹]		$k_{diss}=10^0$ [s ⁻¹]		$k_{diss}=10^1$ [s ⁻¹]	
	T_m [μM]	ber. K [L mol ⁻¹]	T_m [μM]	ber. K [L mol ⁻¹]	T_m [μM]	ber. K [L mol ⁻¹]	T_m [μM]	ber. K [L mol ⁻¹]
10^8	0,07	$1,1 \cdot 10^8$	0,15	$1,1 \cdot 10^7$	0,19	$7,4 \cdot 10^6$	0,21	$6,9 \cdot 10^6$
10^6	1,06	$1,0 \cdot 10^6$	4,88	$2,1 \cdot 10^5$	8,52	$1,2 \cdot 10^5$	9,25	$1,1 \cdot 10^5$
10^4	100	$1,0 \cdot 10^4$	483	$2,1 \cdot 10^3$	851	$1,2 \cdot 10^3$	869	$1,2 \cdot 10^3$

Ein weiterer Aspekt, der aus diesen Rechnungen sichtbar wird, ist, daß die logistische Funktion nicht zu einer korrekten Berechnung der Affinität herangezogen werden kann. Besonders deutlich wird das für $K=10^8$ L mol⁻¹, da aufgrund der zu hoch gewählten Rezeptorkonzentration mit $1,25 \cdot 10^{-7}$ M gegenüber $1/K=10^{-8}$ M die resultierende sigmoide Kurve zu asymmetrisch wird (siehe Kap. 2.1.3). Dadurch kann die Abweichung des mit Hilfe der logistischen Funktion ermittelten K -Wertes der Referenzkurve für $K=10^8$ L mol⁻¹ erklärt werden.

Als Fazit aus den Simulationsrechnungen ließ sich sagen, daß ein Bindungshemmtest durchaus in ruhenden Proben Anwendung finden kann. Die Bindungskurven lassen sich mittels Wurzelanpassung sinnvoll auswerten, und ein aus dieser Auswertung ermittelter Wert für die Signaländerung zu einem bestimmten Zeitpunkt ist für eine weitere Datenauswertung geeignet und trägt darüber hinaus auch zur Datenreduktion bei. Zwar muß aufgrund der oben gezeigten besonderen Verhältnisse in ruhenden Systemen mit höheren Substanzkonzentrationen zur vollständigen Hemmung gerechnet werden, und die ermittelten Affinitäten können bis zu einer Größenordnung in Richtung kleinerer Werte abweichen, dennoch ist die Methode für die Ansprüche im HTS, d.h. einfach, schnell und Reduktion der Daten, durchaus anwendbar.

4.1.2 Charakterisierung der Affinität von Thrombin zu kompetitiven Inhibitoren mittels Bindungshemmtests in ruhenden Proben

Die theoretischen Grundlagen eines Bindungshemmtests in ruhenden Proben sollten nun an einem realen Beispiel überprüft werden. Dazu diente die Protease Thrombin und eine Reihe kompetitiver Inhibitoren mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 700 g mol^{-1} . Die Untersuchungen wurden erst mittels eines *RfS*-Einzelkanalsystems durchgeführt.

Zunächst wurde nur der zeitliche Ablauf der Bindung von Thrombin an die Transduceroberfläche, welche mit dem kupplungsfähigen Referenzinhibitor modifiziert wurde, untersucht. Es galt zu klären, ob entsprechend der vorangegangenen Aussagen eine Auswertung mittels Anpassung an die Funktion $S_t = A\sqrt{t} + S_0$ geeignet erscheint. Abb. 4.10 zeigt den Verlauf der Bindung unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen auf der Transduceroberfläche.

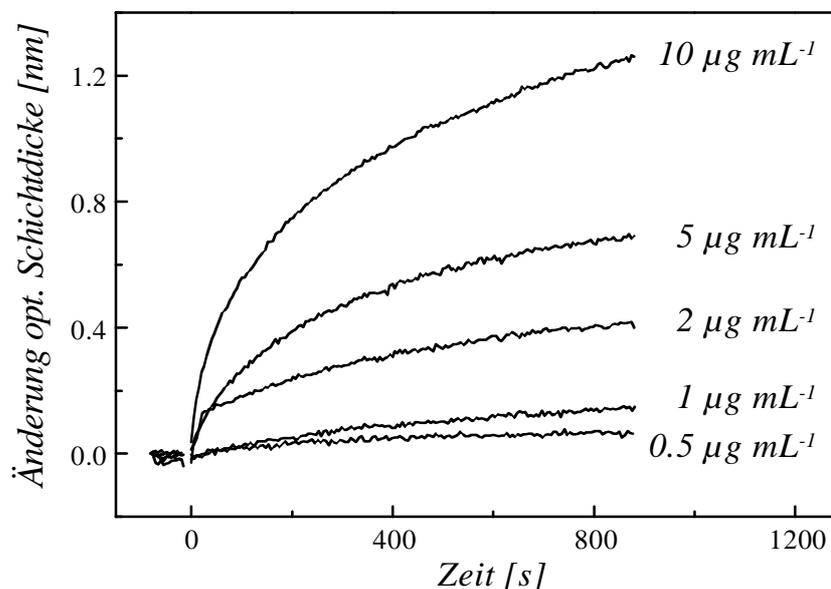


Abb. 4.10: Bindung von Thrombin an immobilisierten Thrombininhibitor in ruhender Probe.

Es wurde nun versucht, Bindungskurven dieser Art wie o.g. auszuwerten, was aber gerade für kleine Thrombinkonzentrationen und den damit verbundenen kleinen Änderungen der optischen Schichtdicke nicht mit großen Erfolg gelang (nicht gezeigt). Aus

diesem Grund wurde ein weiterer Parameter, nun ein linearer Faktor B , zur Auswertung herangezogen, so daß die Funktion zur Kurvenanpassung nun lautete:

$$S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0 \quad (\text{Gl. 4.22})$$

Der Faktor B sollte dabei den linearen Zuwachs der Schichtdicke beschreiben, der sich durch das Bewegen der Probe ergibt. Solche Vorgänge können zu Beginn der Messung durch das Pipettieren geschehen, oder während der Messung durch Konvektion bei Erwärmung der Probe etc. Die aus der Anpassung der Bindungskurven resultierenden Werte für A und B wurden auf ihre Aussagekraft für die Vorhersage der Thrombinkonzentration untersucht. Bei der graphischen Auftragung der Werte für A und B gegen die Thrombinkonzentration (Abb. 4.11) konnte für beide Faktoren ein linearer Zusammenhang zur Konzentration gefunden werden. Es wurde aber deutlich, daß Faktor A , der die Abhängigkeit der Bindung von \sqrt{t} beschreibt, den wichtigeren der beiden Faktoren darstellt. Faktor B weist dagegen sehr viel kleinere Werte auf, und die Standardabweichungen für die Anpassung von Bindungskurven mit gleicher Konzentration ist sehr viel höher als bei Faktor A , was den zufälligen Charakter dieses Faktors verdeutlicht.

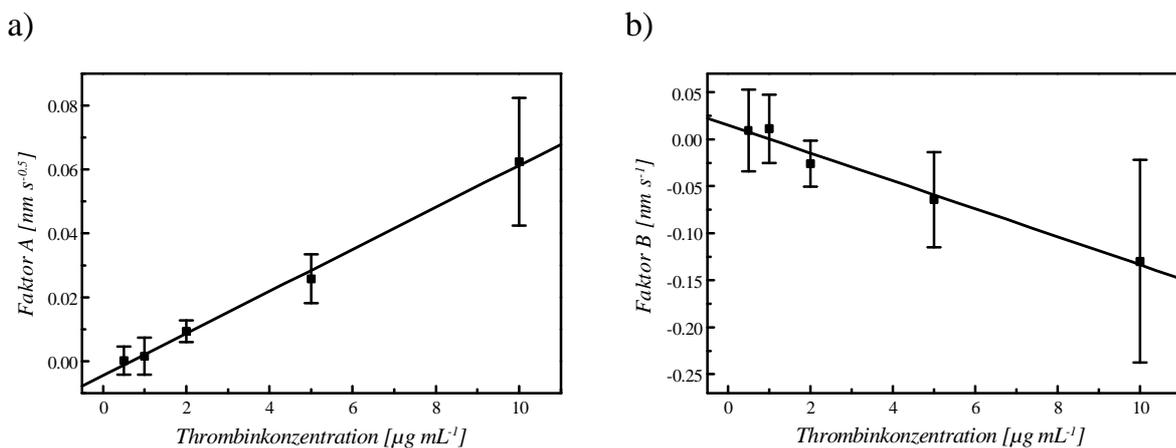


Abb. 4.11: Zusammenhang zwischen den Faktoren A und B der Anpassungsfunktion

$S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ und der Thrombinkonzentration. a) Faktor A zur Anpassung an \sqrt{t} . b) Linearer Faktor B .

Wie oben erwähnt wurde der lineare Faktor B wegen der damit besser zu erreichenden Anpassung der Bindungskurven hinzugenommen. Um nun beide Parameter in die

Auswertung einzubringen, wurden die Bindungskurven nach Gl. 4.22 angepaßt und ein Wert für die Änderung der optischen Schichtdicke zu einem bestimmten Zeitpunkt (i.d.R. zur Halbzeit der Bindung) berechnet. Abb. 4.12 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen diesem ermittelten Wert und der eingesetzten Thrombinkonzentration. Dies entspricht den in den Simulationsrechnungen gemachten Aussagen sehr gut (Abb. 4.6).

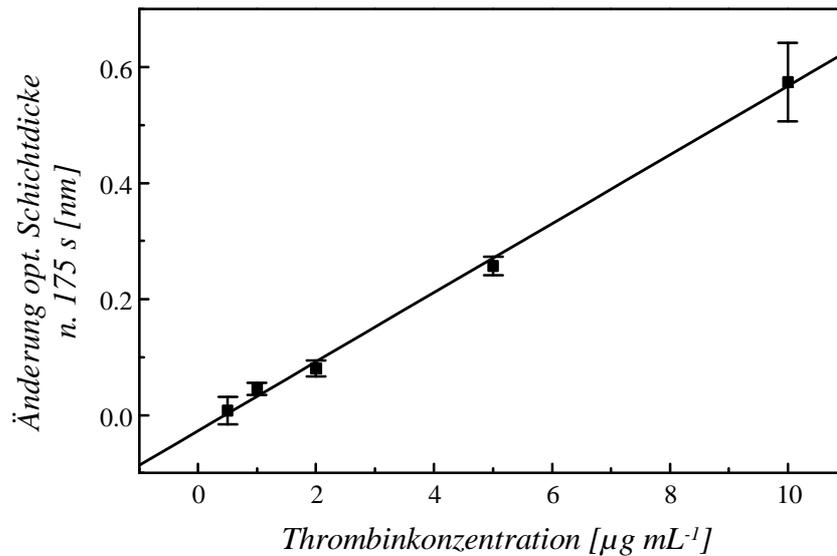


Abb. 4.12: Linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der aus der Kurvenanpassung ermittelten Änderung der opt. Schichtdicke nach 175 s. Es wurden jeweils 10 Bindungskurven vermessen.

Diese Ergebnisse zeigten, daß eine Auswertung der Bindungskurven mit Hilfe von $S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ geschehen konnten, so daß in den weiteren Experimenten ein Bindungshemmtest durchgeführt werden konnte.

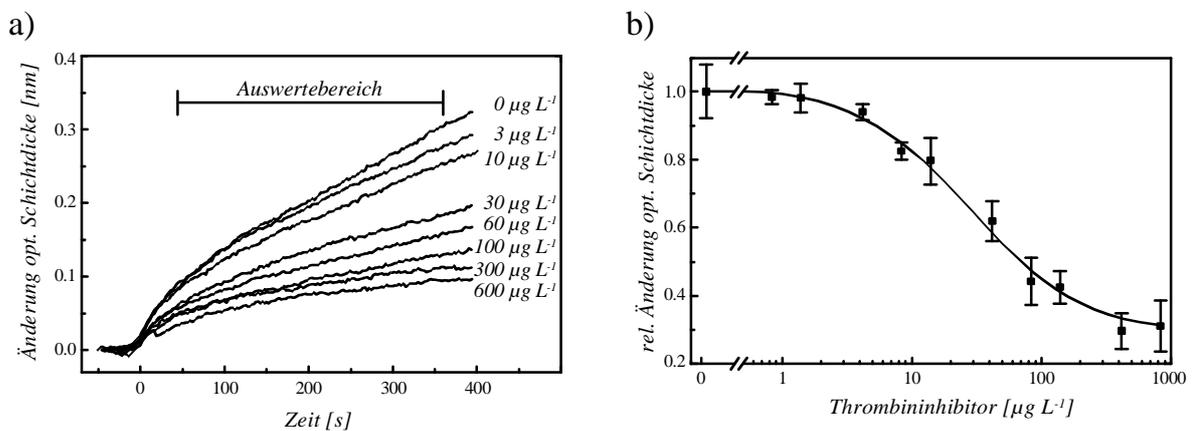


Abb. 4.13: Bindungshemmtest für Referenzthrombininhibitor. a) Bindung von Throm-

bin der Konzentration von $0,125 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von zugegebenen Inhibitor. b) Aus der Auswertung der Bindungskurven durch Anpassung an $S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ im angezeigten Auswertebereich resultierende Titrationskurve.

Die Thrombininhibitoren wurden zunächst im ruhenden System mittels eines Bindungshemmtests untersucht. Abb. 4.13 zeigt exemplarisch den Verlauf der Experimente. Die Bindung von Thrombin in Abhängigkeit vom zugegebenen Inhibitor wurde zeitaufgelöst verfolgt und gemäß der Anpassung an $S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ ausgewertet. Aus dieser Kurve wurde eine Schichtdickenänderung nach einem bestimmten Zeitpunkt als Endwert errechnet. Der Auswertebereich wurde so gewählt, daß der Beginn der Bindung nicht mit einbezogen wurde, da hier sich Fehler durch unterschiedliche Probenhandhabung bzw. Pipettieren am deutlichsten zeigten.

Im folgenden wurden nun vier Inhibitoren unter o.g. Bedingungen untersucht. Die resultierenden Titrationskurven wurden mit Hilfe der logistischen Funktion (Gl. 4.17) angepaßt und der Testmittelpunkt T_m bestimmt.

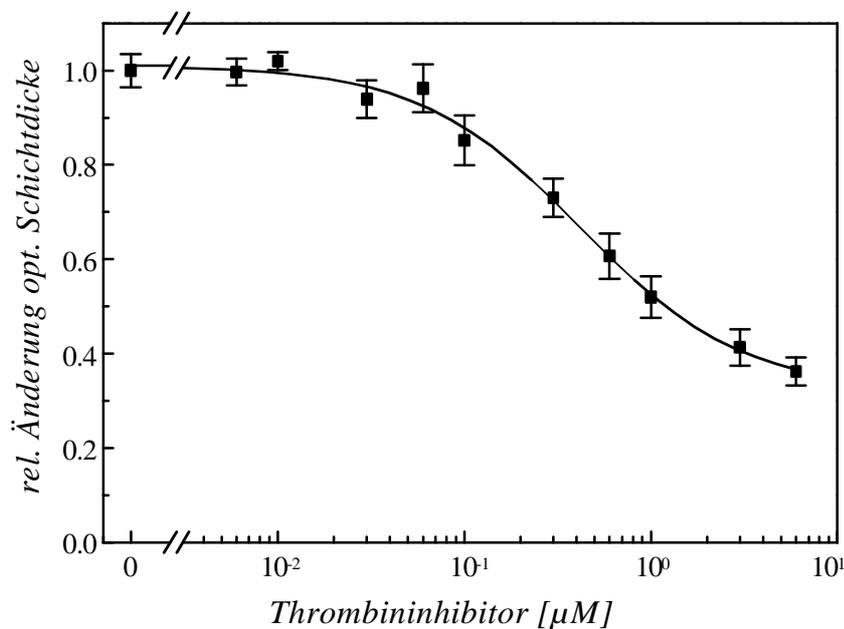


Abb. 4.14: Ergebnis des Bindungshemmtests von Inhibitor 1 mit einem MG von $519,65 \text{ g mol}^{-1}$. Die eingesetzte Thrombinkonzentration betrug $0,125 \mu\text{M}$.

Bei der Titration von Inhibitor 1 zeigte sich, daß trotz hoher Zugaben von Inhibitor keine vollständige Hemmung erreicht werden konnten, sondern nur bis etwa 30 % des Ausgangssignals. Für den S_{min} -Wert bei der Anpassung an die logistische Funktion wurde dieser Wert von 30 % gewählt, woraus sich ein T_m von $0,42 \mu\text{M}$ ergab.

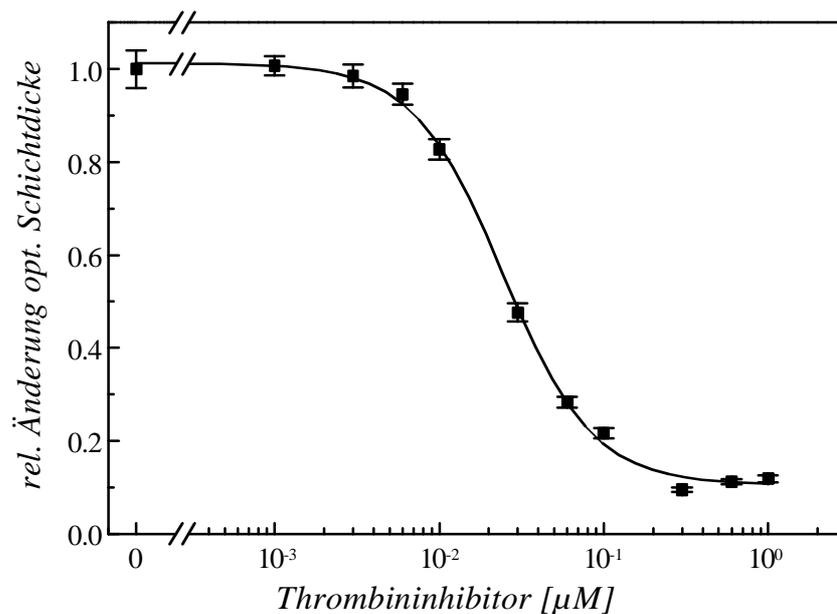


Abb. 4.15: Ergebnis des Bindungshemmtests von Inhibitor 2 mit einem MG von $573,72 \text{ g mol}^{-1}$. Die eingesetzte Thrombinkonzentration betrug $0,125 \mu\text{M}$.

Für Inhibitor 2 war eine Hemmung bis unter 10 % möglich, während für Inhibitor 3 wiederum nur eine Hemmung bis 20 % durchführbar wurde. Es ließ sich ein Testmittelpunkt von $0,02$ bzw. $21,95 \mu\text{M}$ für diese Inhibitoren bestimmen.

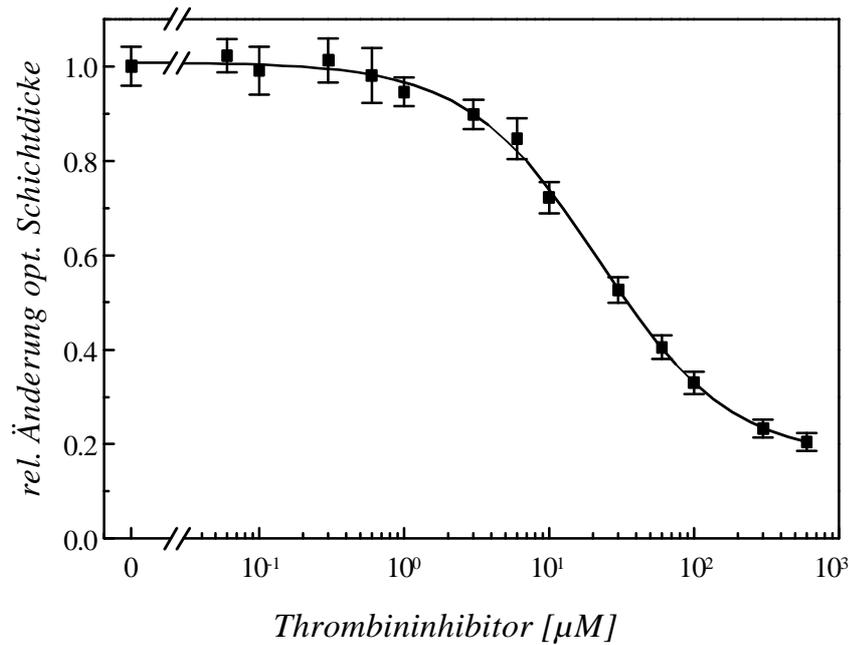


Abb. 4.16: Ergebnis des Bindungshemmtests von Inhibitor 3 mit einem MG von $500,86 \text{ g mol}^{-1}$. Die eingesetzte Thrombinkonzentration betrug $0,125 \text{ }\mu\text{M}$.

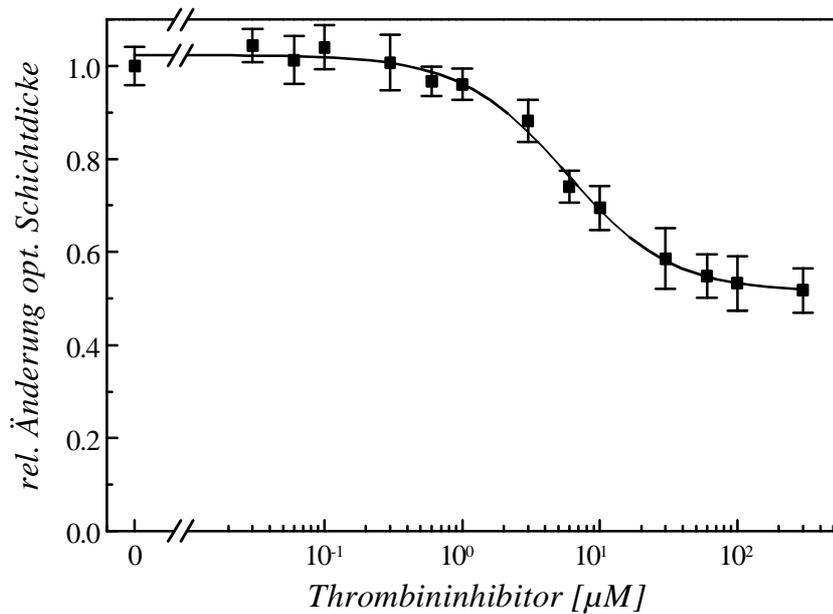
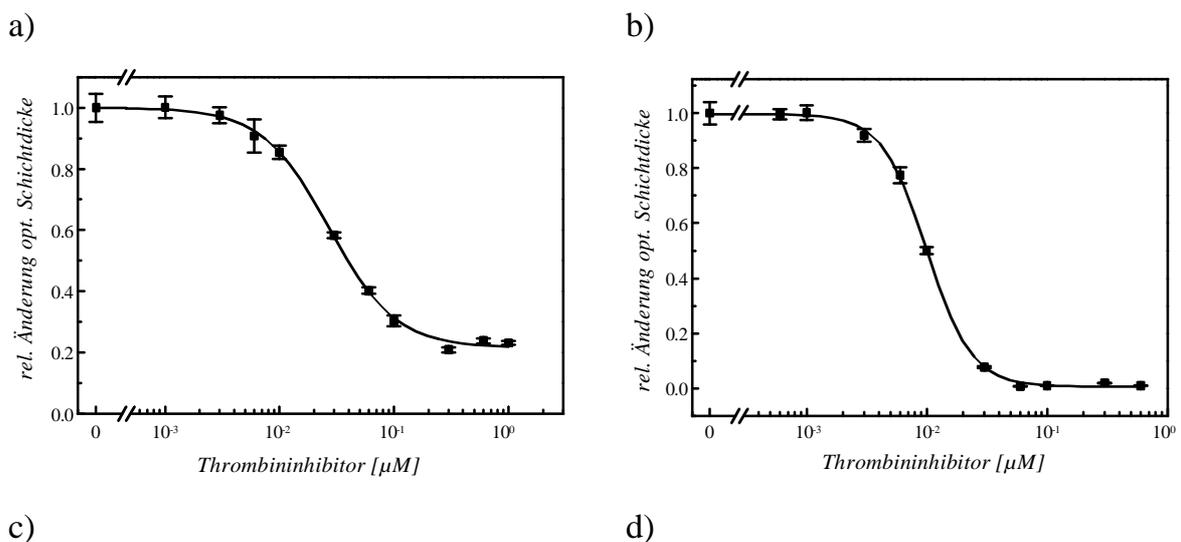


Abb. 4.17: Ergebnis des Bindungshemmtests von Inhibitor 4 mit einem MG von $699,64 \text{ g mol}^{-1}$. Die eingesetzte Thrombinkonzentration betrug $0,125 \text{ }\mu\text{M}$.

Bei der Titration von Inhibitor 4 zeigte sich, dass diese Substanz nur schlecht wasserlöslich ist, so daß hier in PBS mit 10 % (v/v) Methanol gearbeitet werden mußte. Die Konzentration an Methanol wurde mit Rücksicht auf den Einfluß von Methanol auf den Brechungsindex und damit auf das *RIfS*-Signal nicht höher gewählt, so daß im

Falle von Inhibitor 4 die maximale Löslichkeit erreicht wurde und aus diesem Grund keine weitere Hemmung des Thrombins zu sehen war.

Um nun einen Unterschied zwischen nicht gerührtem und gerührtem System unter vergleichbaren Bedingungen zu erhalten, wurden die 4 Inhibitoren ebenfalls mit Hilfe einer FIA, also in einem gerührten System, mittels Bindungshemmtest charakterisiert. Zur Auswertung der Bindungskurven von Thrombin in Abhängigkeit des zugegebenen Inhibitors wurde diesmal mittels linearer Regression die Steigung der Bindungskurven ermittelt. Der Auswertebereich lag dabei in vergleichbaren Grenzen wie bei den Versuchen im ungerührten System. Abb. 4.18 zeigt die Titrationskurven für die vier Inhibitoren, die ebenfalls mit Hilfe der logistischen Funktion angepaßt wurden und nicht mit dem Bindungshemmtest zugrunde liegende Modell (Gl. 2.2). Es fällt wieder auf, daß mit den Inhibitoren 1 und 4 keine vollständige Hemmung möglich wurde, die erreichte Hemmung lag aber mit jeweils 20 % höher als im nicht gerührten System. Aufgrund der vorausgegangenen Simulationsberechnungen kann man nicht davon ausgehen, daß der beobachtbare Offset durch Dissoziation des Thrombin-Inhibitor-Komplexes zustande kommt, da dies durch höhere Konzentrationen an Inhibitor ausgeglichen werden sollte. Im Fall des Inhibitor 4 ist das Erreichen der maximalen Löslichkeit eine mögliche Erklärung. Unter Umständen könnte dies auch für Inhibitor 1 gelten, obwohl dies bei den Experimenten nicht sichtbar wurde.



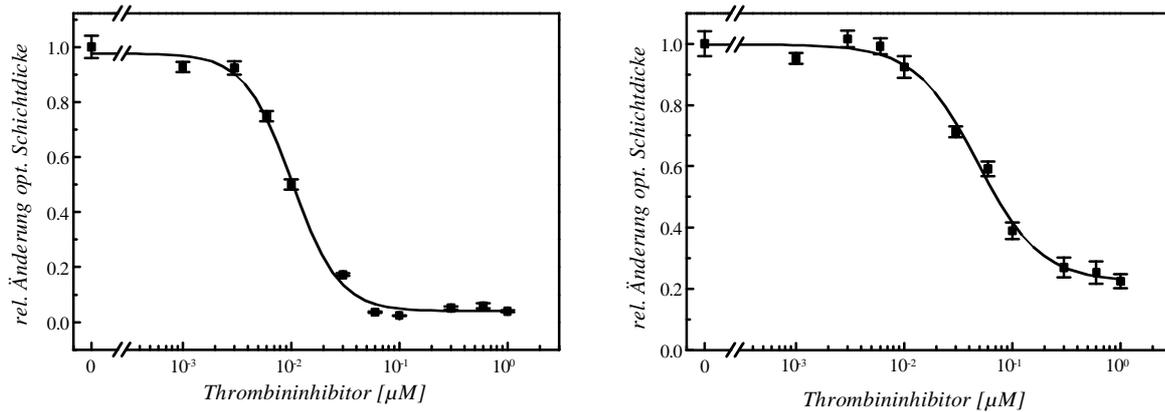


Abb. 4.18: Ergebnis der Bindungshemmtests für 4 Thrombininhibitoren mit Hilfe einer Fließinjektionsanlage (FIA). a) Inhibitor 1. b) Inhibitor 2. c) Inhibitor 3. d) Inhibitor 4. Die eingesetzte Thrombinkonzentration betrug $0,025 \mu\text{M}$.

Einen Vergleich der aus den Bindungshemmtests ermittelten Testmittelpunkte ist in Tab. 4.3 aufgelistet. Wie aus den Simulationen vorhergesagt werden konnte, nehmen die Testmittelpunkte im nicht gerührten System zu. Dies erstreckt sich über bis zu 3 Größenordnungen. Die größte Abweichung ist dabei bei Inhibitor 3 zu sehen, wo eine Änderung um Faktor 2000 zu sehen ist. Der Vollständigkeit wegen muß hier aber erwähnt werden, daß der verwendete Inhibitor 3 für die Versuche im gerührten und nicht gerührten System nicht aus der gleichen Charge stammt.

Tab. 4.3: Vergleich der Testmittelpunkte Bindungshemmtests für verschiedenen Inhibitoren ermittelt in gerührten und nicht gerührten Proben.

Thrombininhibitor	Testmittelpunkt T_m [μM]	
	bestimmt in bewegten Proben	bestimmt in ruhenden Proben
Inhibitor 1	0,03	0,42
Inhibitor 2	0,01	0,02
Inhibitor 3	0,01	21,95
Inhibitor 4	0,05	5,72

Abschließend kann man sagen, daß auch anhand eines realen Beispiels die Einsetzbarkeit des Bindungshemmtests in nicht gerührten Systemen möglich ist. Wiederum muß aber bei der Ermittlung von Affinitätskonstanten mit einer Abweichung zu höheren Werten gerechnet werden, so daß dieses System für eine genaue Bestimmung nicht geeignet ist. Die primäre Auswertung der Bindungskurven nach $S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ hat sich nach Einführung eines weiteren Parameters als praktikabel erwiesen und führt zu der erwünschten Datenreduktion.

4.1.3 Bindungshemmtests von Thrombininhibitoren mit kleinem Probenvolumen

In vielen Fällen bioanalytischer Anwendungen spielt die Menge oder Konzentration der dazu benötigten biologischen Komponente oft eine limitierende Rolle. Die kann zum einen an einer sehr geringen Ausgangskonzentration im frischen Rohextrakt oder zum anderen an Verlusten bei der Aufbereitung der Probe bzw. an einer Instabilität der Moleküle liegen. Da der Nachweisgrenze einer Methode technische Grenzen gesetzt sind, ist ein möglicher Weg der Materialersparnis die Verkleinerung der Probe. Dies ist mit ein Grund, weshalb große Anstrengungen im Bereich des HTS gemacht werden, um durch Einführung von Mikrotiterplatten mit höherer Kavitätendichte von 384 und 1536 anstatt 96 nicht nur den Durchsatz zu erhöhen, sondern gleichzeitig auch an Probenvolumen einzusparen (Kapitel 2.1.2).

Im Folgenden sollte hier anhand des Thrombin/Inhibitor-Systems nachgewiesen werden, ob Bindungshemmtests auch in kleinen ruhenden Volumen durchzuführen sind. Die zuvor vorgestellten Untersuchungen in ruhenden Systemen wurden in 50 μL Volumen durchgeführt. Nun wurde eine Meßküvette mit einem Durchmesser von 2,2 mm verwendet, mit der Messungen mit einem Volumen von 5 μL möglich sein sollten, welche mit Hilfe einer Hamiltonspritze gehandhabt wurden.

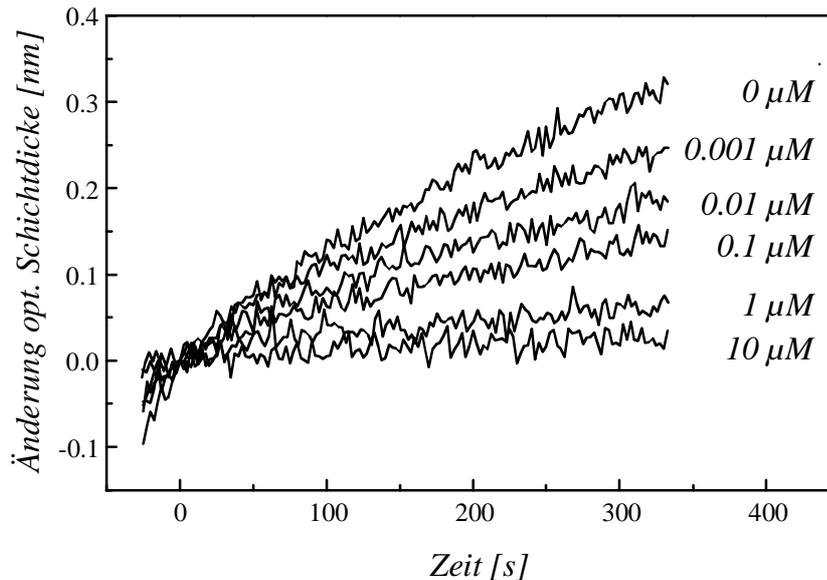


Abb. 4.19: Bindung von Thrombin in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentration von Thrombininhibitor 2. Die Messungen wurden im ruhenden System mit einem Volumen von $5 \mu\text{L}$ durchgeführt. Die Thrombinkonzentration betrug $0,125 \mu\text{M}$.

Mit dieser kleine Meßküvette wurde ein Bindungshemmtest für Inhibitor 2 durchgeführt. Die Bindung von Thrombin unter dem Einfluß zugegebenen Inhibitor ist in Abb. 4.19 gezeigt.

Im Gegensatz zu größeren Volumina über $20 \mu\text{L}$ bestand bei diesen Versuchen die Schwierigkeit vor allem in der manuellen Handhabung der kleinen Volumina. So mußte für eine sinnvolle Auswertung der Bindungskurven der entsprechende Auswertebereich weiter nach rechts verschoben werden, um dem System eine gewisse Zeit zur Beruhigung zu geben. Vor allem machten Luftblasen, die am Rand der Meßzelle entstanden, Schwierigkeiten, da sie für eine lange Drift des Signals sorgten und somit die Auswertung erschwerten bzw. unmöglich machten. Darüber hinaus erhielt man, verglichen mit größeren Volumen, die gleichen Signaländerung von etwa 300 pm für reines Thrombin.

Nach der Auswertung der Bindungskurven nach dem üblichen Schema mittels Kurvenanpassung erhielt man eine Titrationskurve, die wiederum mit Hilfe der logistischen Funktion angepaßt werden konnte. Abb. 4.20 zeigt eine solche Titrationskurve. Eine Hemmung des Thrombins bis unter 50% war unter diesen Bedingungen möglich,

ebenso wie eine Auswertung mit Hilfe der logistischen Funktion. Der ermittelte Testmittelpunkt betrug in diesem Fall $0,11 \mu\text{M}$ und ist damit um das fünffache höher als in den vergleichbaren Experimenten mit $50 \mu\text{L}$ Probenvolumen. Dies mag unter anderem an den Schwierigkeiten der Probenhandhabung liegen, die eine ungenaue Auswertung der Bindungskurven mit sich brachten. Ein anderer Punkt, der aber leider nicht nachgewiesen werden konnte, kann in der Erhöhung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses der Meßküvette liegen. Für ein Volumen von $50 \mu\text{L}$ in einer Küvetten mit einem Durchmesser von $3,6 \text{ mm}$ ergibt sich ein Verhältnis von $70/50 [\text{mm}^{-1}] = 1,4 [\text{mm}^{-1}]$, während bei $5 \mu\text{L}$ Proben bei einer $2,2 \text{ mm}$ Küvette sich das Verhältnis mit $3/5 [\text{mm}^{-1}] = 2,6 [\text{mm}^{-1}]$ fast verdoppelt. Dadurch ist es denkbar, daß mehr Substanz an den Wänden der Meßküvette adsorbiert werden kann und somit dem System entzogen wird, was sich in einer Verschiebung der Titrationskurve widerspiegelt.

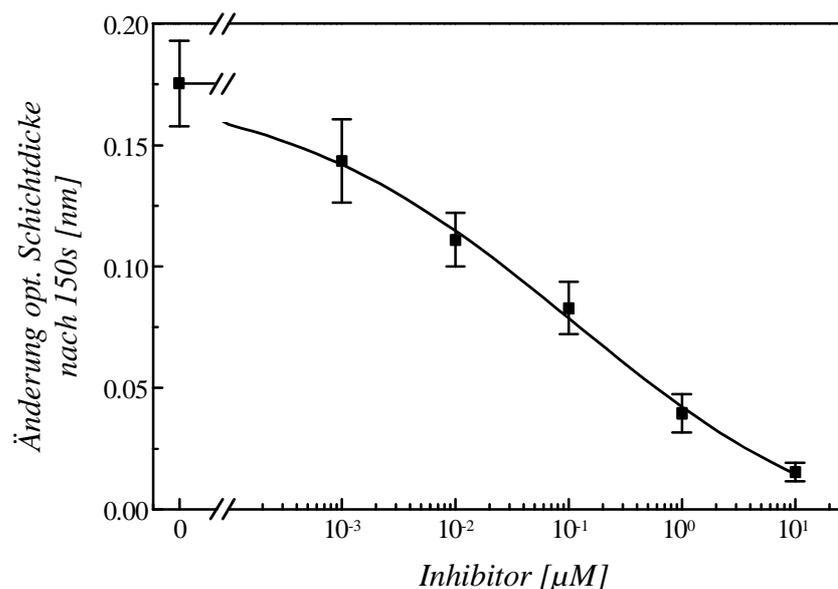


Abb. 4.20: Einfluß von Thrombininhibitor 2 auf die Bindung von $0,125 \mu\text{M}$ Thrombin.

Die Anpassung geschah mit Hilfe der logistischen Funktion.

Letztendlich kann man sagen, daß auch in kleineren Volumina ein Bindungshemmtest durchzuführen ist. Schwierigkeiten mit der Probenhandhabung und dem ungünstigeren Verhältnis von Oberfläche zu Volumen müssen dabei einkalkuliert werden. Diesen Problemen kann aber zum einen mit einer automatisierten Probenhandhabung und zum

anderen mit einer geeigneten Auswahl der Materialien, aus denen die Meßküvette oder später die Mikrotiterplatte besteht, begegnet werden.

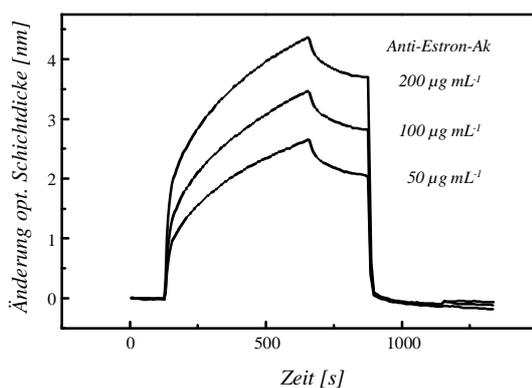
4.2 Untersuchung des Östrogen bindenden Proteins (EBP) von *Candida albicans* mittels *RIfS*

Markierungsfreie optische Methoden zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen, wozu auch *RIfS* gehört, zeichnen sich für ihren weiten Bereich an Anwendungsmöglichkeiten aus. Voraussetzung ist dabei nur eine Immobilisierung eines der Bindungspartner. So sollte mit einem neuen Target für die Wirkstoffsuche das Östrogen bindende Protein aus der Hefe *Candida albicans* mittels *RIfS* untersucht werden.

4.2.1 Charakterisierung von EHS-Transducern

Der erste Schritt zur Charakterisierung des EBP, die zunächst in einer FIA mittels *RIfS* erfolgen sollte, war die Modifikation eines Transducers, der mit AMD belegt war. Da EBP in der Lage ist, Estradiol zu binden (Buckman *et al.* 1998), wurde Estradiolhemisuccinat (EHS), ein Derivat, das eine Carboxygruppe zu kovalenten Immobilisierung bietet, auf AMD gekuppelt, und sowohl auf unspezifische als auch auf spezifische Wechselwirkungen hin untersucht. Die erfolgreiche Durchführung des zur Kupplung des EHS entwickelten Protokolls konnte mit einem Anti-Estron-Antikörper nachgewiesen werden, der in der Lage war, EHS auf der Oberfläche zu binden (Abb. 4.21 a).

a)



b)

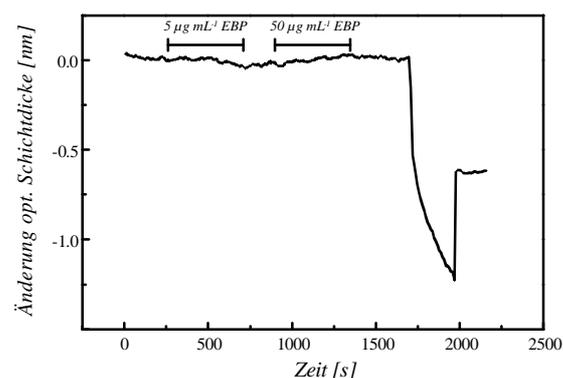


Abb. 4.21: a) Charakterisierung eines EHS-Transducers mit verschiedenen Konzentrationen eines Anti-Estron-Antikörpers. b) Charakterisierung der unspezifischen Wechselwirkungen der eingesetzten EBP-Fraktion auf einem mit Cholsäure modifizierten AMD-Transducer. Die anschließende Regeneration der Transducer wurde in beiden Fällen mit 10 mM HCl durchgeführt.

Andererseits wurde auch die unspezifische Wechselwirkung der für diese Versuche eingesetzten EBP-Lösung untersucht. Hierzu wurde ein Transducer zunächst mit AMD und danach mit Cholsäure, das eine ähnliche Struktur und damit auch ähnliche hydrophobe Eigenschaften wie Estradiol zeigt, nicht aber von EBP gebunden werden kann, modifiziert und die vorhandene Fähigkeit des EBPs untersucht, auf diesen Transducer unspezifisch zu binden (Abb. 4.21 b). Es konnte festgestellt werden, daß sowohl bei einer Konzentration von 5 als auch von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ keine nennenswerten unspezifischen Wechselwirkungen auftraten.

Ein weiterer Punkt zu Beginn der Studien war die Untersuchung der unspezifischen Wechselwirkung des EHS-Transducers mit einem Fremdprotein und der spezifischen Bindung des EBPs. Als Fremdprotein wurde eine Ovalbuminlösung herangezogen, die trotz hoher Konzentration keine nennenswerte Bindung an die Transduceroberfläche zeigte (Abb. 4.22). Spezifische Wechselwirkungen des EBPs mit der Oberfläche konnten sowohl bei einer Konzentration von 5 als auch von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ erkannt werden, die mit Hilfe von 10 mM HCl vollständig regeneriert werden konnten (Abb. 4.22).

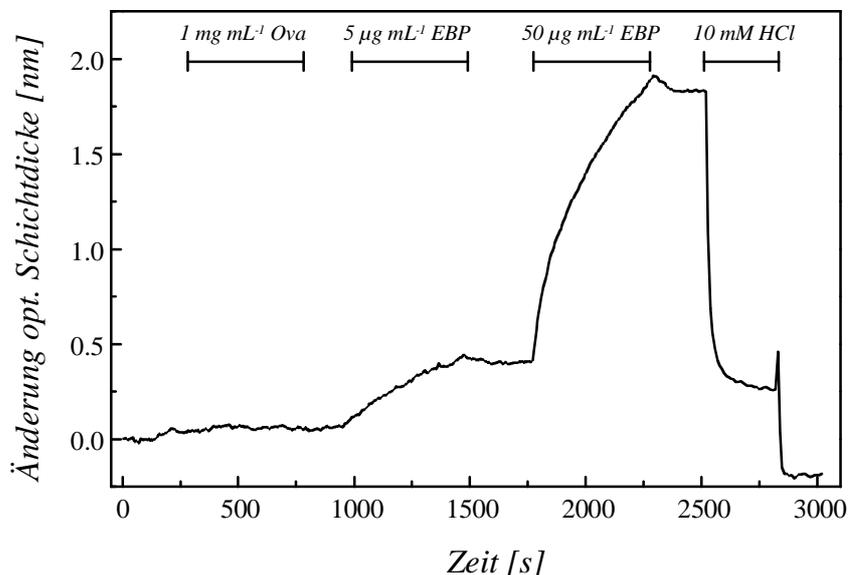


Abb. 4.22: Charakterisierung eines EHS-Transducers. Zunächst wurde die unspezifische Wechselwirkung der EHS-Transduceroberfläche mit einer 1 mg mL^{-1} Ovalbuminlösung (Ova) getestet, worauf zweimal EBP, einmal 5 und einmal $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ auf den Transducer gegeben wurden. Die Bindung des EBP konnte mit 10 mM HCl wieder regeneriert werden.

4.2.2 Untersuchung von EBP-Kompetitoren

Der nächste Schritt war die Bestimmung der Affinität einer Reihe von Kompetitoren des EBP. Dies sollte wieder mit Hilfe eines Bindungshemmtests geschehen, wobei der Transducer mit EHS modifiziert blieb. Hier wurde ein Vorteil des Bindungshemmtests sichtbar, der es erlaubt, auf ein und demselben Transducer unterschiedliche Substanzen zu testen, ohne den immobilisierten Bindungspartner ständig austauschen zu müssen.

Abb. 4.23 zeigt die Bindungskurven des EBP in Abhängigkeit von zugegebenem EHS. Obgleich die eingesetzte EBP-Konzentration von $0,07 \text{ } \mu\text{M}$ relativ klein war, und eine Absättigung der Bindungsstellen auf dem Transducer aufgrund der nur geringen Schichtdickenzunahme von $0,5 \text{ nm}$ nicht anzunehmen war, zeigten die Bindungskurven eine leichte Krümmung auf, was eigentlich für Messungen in ruhenden Proben spräche, wie im vorangegangenen Kapitel erörtert, aber in einem gerührten System wie diesem eher für eine kinetisch kontrollierte Bindung spricht. Ob dies nun der Fall war, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Skowronski (1989) ermittelte für die Wechselwirkung zwischen EBP und Estradiol eine Dissoziationsratenkonstante von $13,2 \pm 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Affinitätskonstante von $12,3 \pm 2,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, was eine Assoziationsratenkonstante von $1,6 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Diese ist für biologische Systeme recht hoch und kommt einer diffusionslimitierten Assoziationsratenkonstanten, die zwischen 10^7 und $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegen kann (Wedler 1987), sehr nahe. Unter Umständen liegt der ungewöhnliche Verlauf der Bindungskurven auch an der Beschaffenheit der Transduceroberfläche, da gezeigt werden konnte, daß im Vergleich zum Thrombinsystem (Abb. 4.1) statt einer zu erwartenden Maximalbelegung von 10 nm nur $4\text{-}5 \text{ nm}$ erreicht werden konnten.

Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung der Bindungskurven auf eine, wie im FIA-System üblich, lineare Anpassung verzichtet, und als Wert für die Konzentration des freien Rezeptors die Änderung der optischen Schichtdicke nach einem bestimmten Zeitpunkt herangezogen. Es wurde dabei deutlich, daß eine vollständige Hemmung mit EHS nicht möglich war, sondern nur 20 % Hemmung erreicht wurden. Dies kann an der beschränkten Löslichkeit des EHS in Wasser liegen. Die Auswertung der daraus resultierenden Titrationskurve geschah wiederum mit Hilfe der logistischen Funktion und ergab einen Testmittelpunkt von $0,05 \mu\text{M}$. Unter Berücksichtigung der schon in Kapitel 4.1.1 gemachten Einschränkung, aus dem T_m -Wert eine Affinitätskonstante abzuleiten, ergab sich eine Affinitätskonstante von $K=2,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, die um zwei Größenordnungen kleiner ist als die von Skowronski (1989) ermittelte. Hinzuzufügen ist dabei aber, daß die hier gezeigten Untersuchungen an einem EBP-GST-Fusionsprotein stattfanden, während die in der Literatur beschriebenen Affinitäten für das natürliche EBP gelten. Dies kann natürlich ein Grund für die unterschiedlichen Affinität sein.

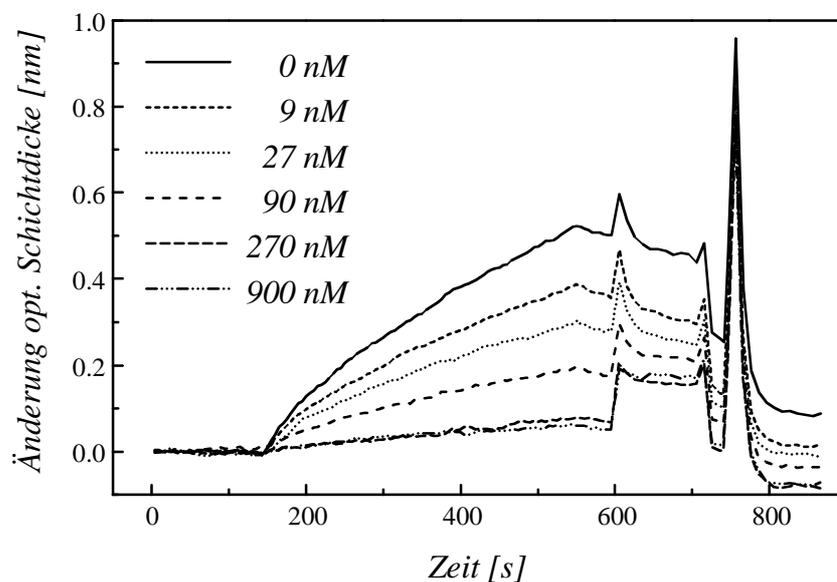


Abb. 4.23: Bindung von EBP an einen EHS-Transducer in Abhängigkeit von zugegebenen EHS. Die eingesetzte EBP-Konzentration betrug $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; das entspricht $0,07 \mu\text{M}$.

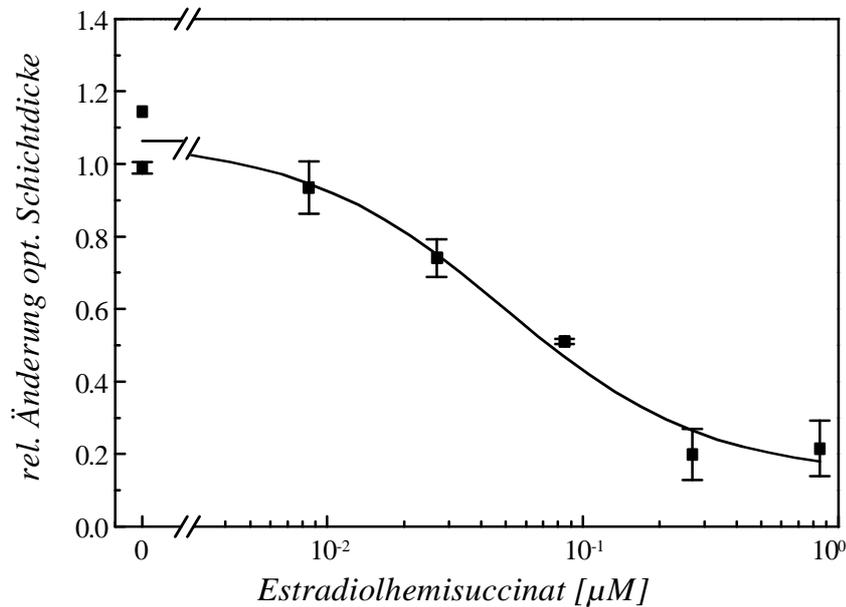
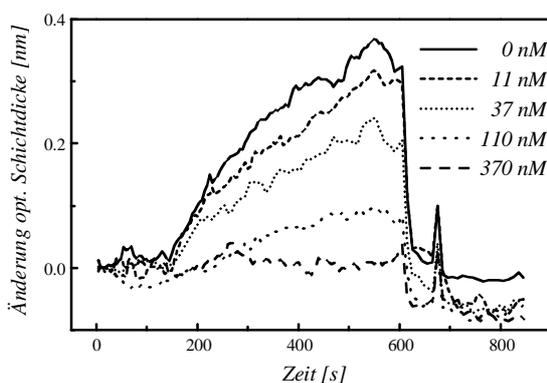


Abb. 4.24: Affinitätstiteration von EBP mit EHS. Die Kurvenanpassung erfolgte mit der logistischen Funktion.

Als weiteren Kompetitor wurde in den nächsten Experimenten Estradiol untersucht. Ebenfalls wurde hier ein mit EHS modifizierter Transducer verwendet. Sowohl die Bindungskurven als auch die daraus resultierende Titrationskurve sind in Abb. 4.25 dargestellt. Die Ermittlung eines Testmittelpunktes von $0,05 \mu\text{M}$ erbrachte keine Veränderung zum vorherigen Ergebnis, so daß man sagen kann, daß der Succinatrest des Estradiols keinen Einfluß auf die Affinität des EBP zu haben scheint.

a)



b)

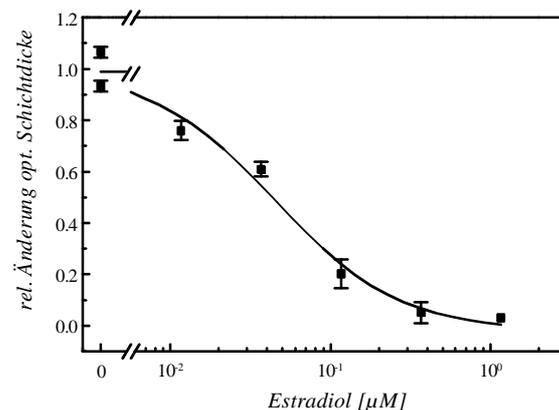


Abb. 4.25: Bindung von EBP an einen EHS-Transducer in Abhängigkeit von zugegebenen Estradiol. Die eingesetzte EBP-Konzentration betrug $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a) Bindungskurven b) Titrationskurve

In ähnlicher Weise wurden daraufhin weitere Substanzen auf ihre Affinität zum EBP untersucht. Ein Teil der Substanzen gehörten dabei zu den natürlichen Östrogenen, während ein anderer Teil zu den Phytoöstrogenen gerechnet wird, Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die hormonelle oder pharmazeutisch relevante Wirkung besonders in der Krebsbekämpfung zeigen (Breinholt *et al.* 1998, Knight *et al.* 1995). Abb. 4.26 gibt die Strukturformeln der untersuchten Substanzen wieder. Die Substanzen lagen als Stammlösung in einer Konzentration von 5 mM in DMSO und im Falle des Kämpferols in Methanol vor und wurden in PBS bis zu einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ für nur mäßig bis gar nicht affinen Substanzen verdünnt. Die damit einhergehende DMSO-Konzentration von 2 % (v/v) in der Proben hatte keinen Einfluß auf das *RfS*-Signal und mußte somit auch nicht durch Referenzmessungen eliminiert werden.

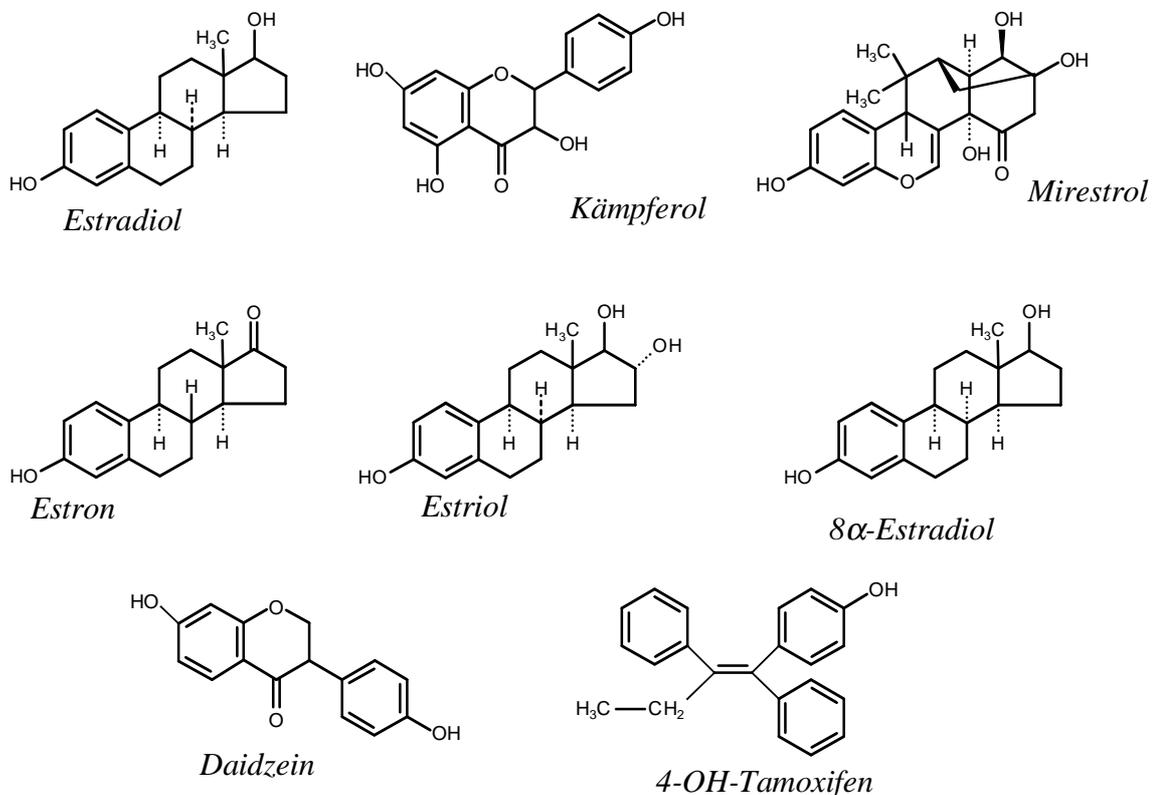


Abb. 4.26: Strukturformeln der Untersuchten Kompetitoren des EBP.

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.27) sind die mittels der einzelnen Bindungshemmtests ermittelten Testmittelpunkte in Relation zum Testmittelpunkt für Estradiol dargestellt. Zwar erweckt die gewählte Darstellung den Eindruck, daß die getesteten Substanzen im Vergleich zum Estradiol eine sehr geringe Affinität zum EBP zeigen. Die aus den Testmittelpunkten berechneten Affinitätskonstanten zeigen aber, daß die Östrogene Estron, Estriol und auch das 8α -Estradiol eine Affinität zum EBP in der Größenordnung des Estradiols aufweisen, während die Phytoöstrogene Daidzein und Kämpferol jeweils um eine Größenordnung geringere Affinität zeigen. Für Mirestrol und 4-OH-Tamoxifen konnten keine Affinität zum EBP gefunden werden. Die Affinitätskonstanten sind hier nicht aufgeführt, da der Fehler bei der Bestimmung größer als der ermittelte Wert wäre.

In wieweit die Löslichkeit der doch stark polaren Substanzen Einfluß auf dieses Ergebnis ausübte, konnte nicht festgestellt werden. Es spielte aber u.U. eine Rolle in der nicht zu ermittelnden Affinität der beiden Phytoöstrogene Mirestrol und 4-OH-Tamoxifen zum EBP. Dagegen konnte recht gut beobachtet werden, wie stark sich der strukturelle Unterschied zwischen Estradiol und 8α -Estradiol hinsichtlich der Affinität zum EBP deutlich macht, denn während Estradiol ein in einer Ebene liegendes Molekül ist, ist 8α -Estradiol in seiner Mitte gewinkelt und stellt damit u.U. ein sterisches Hindernis in der Bindungstasche des EBP dar.

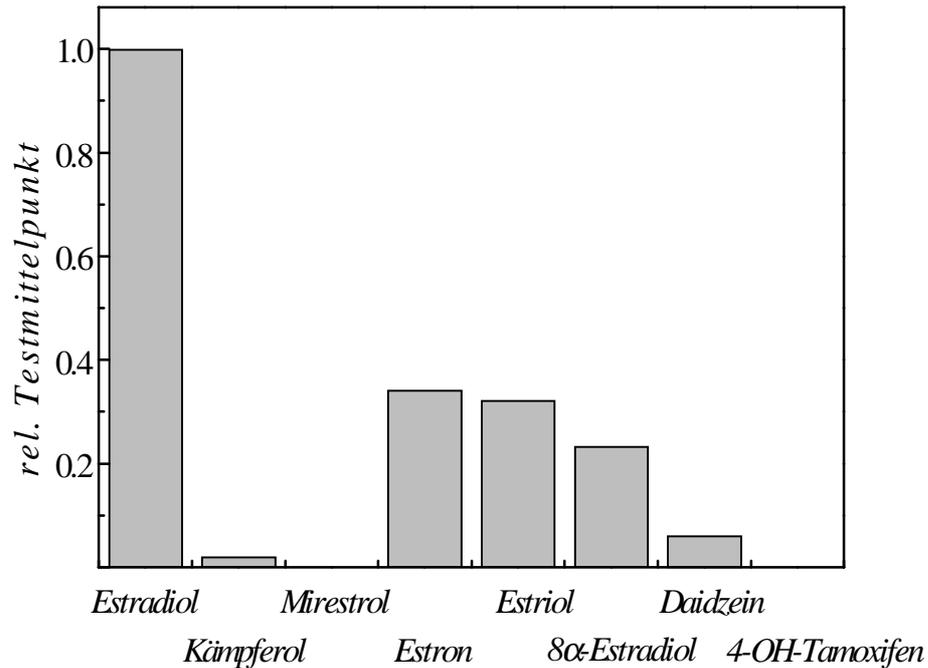


Abb. 4.27: Testmittelpunkte der Bindungshemmtests für die getesteten EBP-Kompetitoren in Relation zum ermittelten Testmittelpunkt für Estradiol (Abb. 4.25).

Mit Hilfe des EBP-Systems konnte die Vielseitigkeit markierungsfreier Methoden gezeigt werden. Mit Hilfe des Bindungshemmtests konnten eine Reihe von Substanzen auf ihre Bindungsfähigkeit zum EBP überprüft werden. Dabei stellte sich der Vorteil dieses indirekten Testformates heraus, auf einer Transduceroberfläche unterschiedliche Substanzen testen zu können.

4.3 Assayentwicklung für ein paralleles RfS-Detektionssystem

Drei unterschiedliche Entwicklungsstufen des parallelen RfS-Detektionssystem wurden im folgenden untersucht, die Implementierung des Bindungshemmtests durchgeführt und Protokolle zur Modifikation der Transduceroberfläche für das parallele System angewendet.

4.3.1 Untersuchungen des ersten parallelen RfS-Aufbaus Demonstrator 0a

Am Demonstrator 0a sollte neben der technischen Realisierung auch die Implementierung von Assays und der Transducermodifikation für eine Fläche von $45 \times 60 \text{ mm}^2$ gezeigt werden. Dazu wurden zunächst das Drift- und Rauschverhalten des Aufbaus untersucht. Eine Wellmaske wurde über ein Array von 8×5 Kavitäten nach einem Kamerabild (wie in Abb. 4.28 dargestellt) erstellt, die für die richtige Zuordnung der Kavitäten und der die Kavitäten abbildenden Pixel sorgte. Diese Maske mußte für jeden neu aufgelegten Transducer neu angefertigt werden, da eine genaue reproduzierbare Positionierung des Transducers in der verlangten Qualität nicht möglich war. Die ovale Abbildung der in der Realität runden Kavitäten ist durch die vom rechten Winkel (50°) abweichende Ausleuchtung der Transducerunterseite begründet. Man erkennt deutlich, daß keine homogene Ausleuchtung gegeben ist. Vor allem am rechten Rand ist die Ausleuchtung sehr lichtschwach. Dies lag zum einen am optischen Aufbau und an der verwendeten DALSA-Kamera mit 256×256 Pixel, die eine Abbildung einer Fläche von nur knapp $31 \times 45 \text{ mm}^2$ erlaubte. Zum anderen wurde zum Befestigen der Probenplatten auf den Transducer über eine Silicondichtung ein über die Platte unterschiedlicher Druck ausgeübt. Dies zusammen mit dem Glycerin, das zum Aufbringen des Transducers auf eine unter dem Transducer befindlichen Keilplatte genutzt wurde, führte zu geringen Verwerfungen des Transducer, die Ursache für das inhomogene Reflexlicht waren.

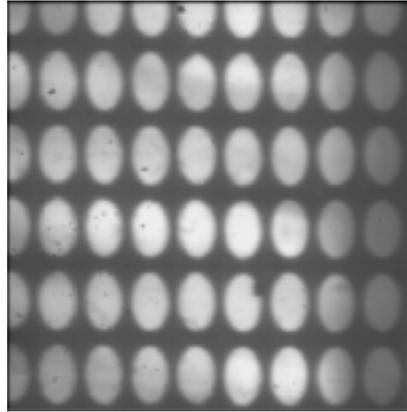


Abb. 4.28: Kamerabild des vom Transducer reflektierten Lichtes bei einer Wellenlänge. Deutlich sind die Kavitäten zu erkennen, wonach die Zuordnungsmaske für die Kavitäten und den dazugehörigen Pixel erstellt wurde.

Aus der Inhomogenität der Ausleuchtung und den Fehlern des optischen Aufbaus und des Monochromators resultierten unterschiedliche Lagen des Extremums des Interferenzspektrums, das für jede einzelne Kavität bestimmt wurde (Abb. 4.29a). Die Extrema lagen zwischen 727 und 736 nm. Die Standardabweichung mehrerer Schichtdickenbestimmungen als Maß für das Rauschen lag zwischen 11 und 135 pm. Dabei war ein deutlicher Gang von links nach rechts zu höherem Rauschen zu sehen (Abb. 4.29b), der mit der Ausleuchtung und der geringen Lichtintensität zusammenhing.

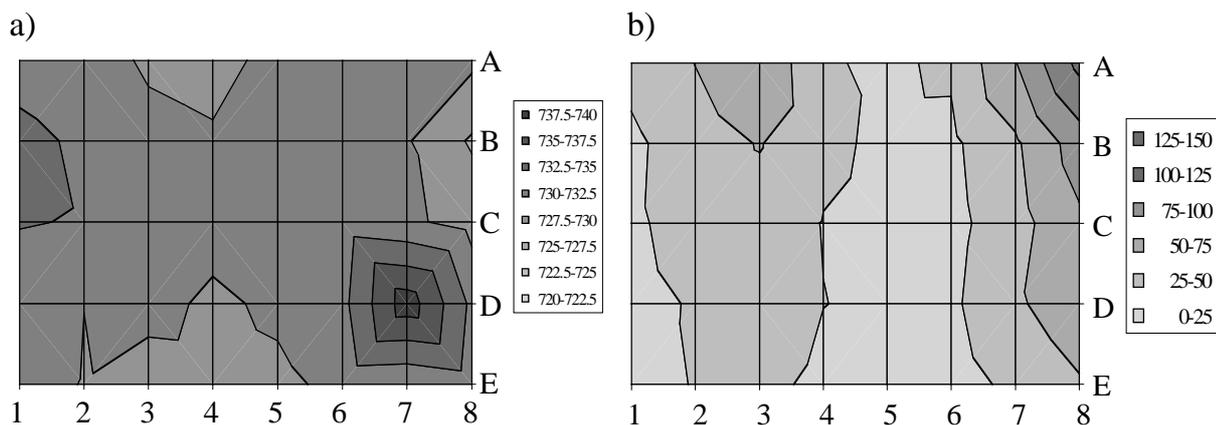


Abb. 4.29: a) Verteilung der Lage des Extremums des Interferenzspektrums jeder Kavität auf dem Transducer. b) Standardabweichung für die Bestimmung der Lage des Extremums als Maß des Rauschens in jeder Kavität für 10 Messungen in pm.

Zur Überprüfung der Transducermodifikation, die mit der dafür entwickelten Sandwichmethode durchgeführt wurde, wurden Transducer mit Aminodextran und dem

Referenzthrombininhibitor modifiziert. Bindung unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen konnte simultan in verschiedenen Kavitäten beobachtet werden (Abb. 4.30a). Die Auswertung der Bindungskurven erfolgte, wie schon gezeigt, mit Hilfe der Anpassung an eine Wurzelfunktion. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Änderung der optischen Schichtdicke nach 300 s und der eingesetzten Thrombinkonzentration konnte erwartungsgemäß gezeigt werden (Abb. 4.30b). Ein Unterschied zwischen dem Mehrkanalsystem und dem Einzelkanalsystem wurde hier deutlich. Während im Einzelkanalsystem nach 300 s eine Änderung der optischen Schichtdicke von 8 nm bei einer Thrombinkonzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ gemessen wurde (Abb. 4.1a), betrug die Änderung im Mehrkanalsystem nach 300 s lediglich 3 nm. Dies ist mit dem schrägen Einfallswinkel des Lichtes und der damit verbundenen Reduktion des Signalhub zu erklären. Dies bedeutet letztendlich, daß mit einer Verringerung des Signalhubs um die Hälfte gerechnet werden mußte.

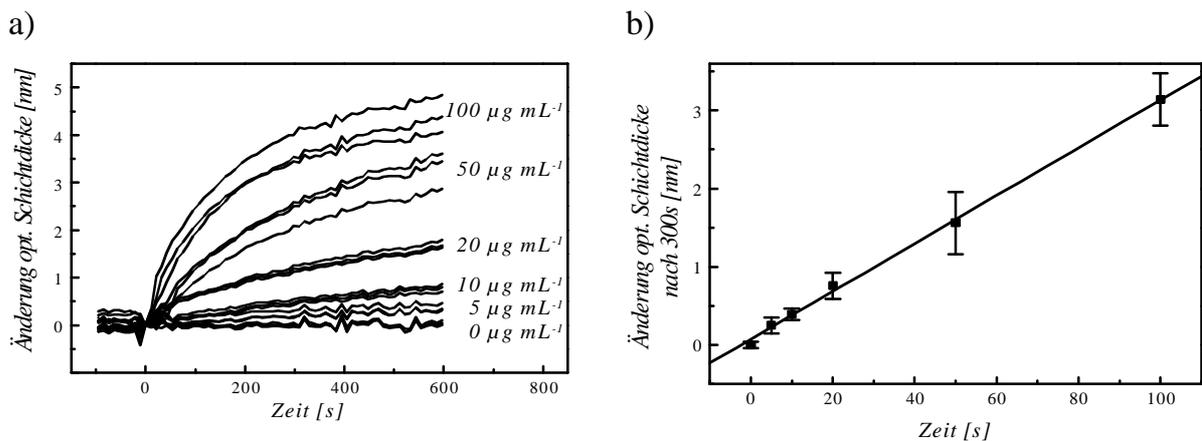


Abb. 4.30: Bindung von Thrombin mit Hilfe des Demonstrators 0a beobachtet. a) Unterschiedliche Thrombinkonzentrationen wurden zeitgleich in verschiedenen Kavitäten vermessen. b) Linearer Zusammenhang zwischen der Änderung der optischen Schichtdicke nach 300 s und der eingesetzten Thrombinkonzentration.

Die Bindungskurven in Abb. 4.30a zeigen das eigentliche Problem des Demonstrators 0a, nämlich ein recht hohes Rauschen, das bei besonders hohen Werten bzw. Ausreißern in allen Kavitäten korreliert auftritt. Es wurde auch deutlich, daß eine höhere Thrombinkonzentration für den Bindungshemmtest verwendet werden mußte. So wur-

de die Thrombinkonzentration von den normalerweise eingesetzten $0,125 \mu\text{M}$ auf das Doppelte erhöht. Ein Bindungshemmtest konnte unter diesen Bedingungen durchgeführt werden (Abb. 4.31). Während die Auswertung der Bindungskurven mit Hilfe der Wurzelanpassung geschah, wurde die resultierende Titrationskurve mit der logistischen Funktion angepaßt. Obwohl ein sehr hoher Offset von etwa 0,4 zu beobachten war, der vermutlich aus der Alterung des Transducers herrührte, wurde ein Testmittelpunkt von $T_m=0,06 \mu\text{M}$ festgestellt, der sich in der gleichen Größenordnung befindet, wie der im Einkanalssystem ermittelte T_m von $0,02 \mu\text{M}$.

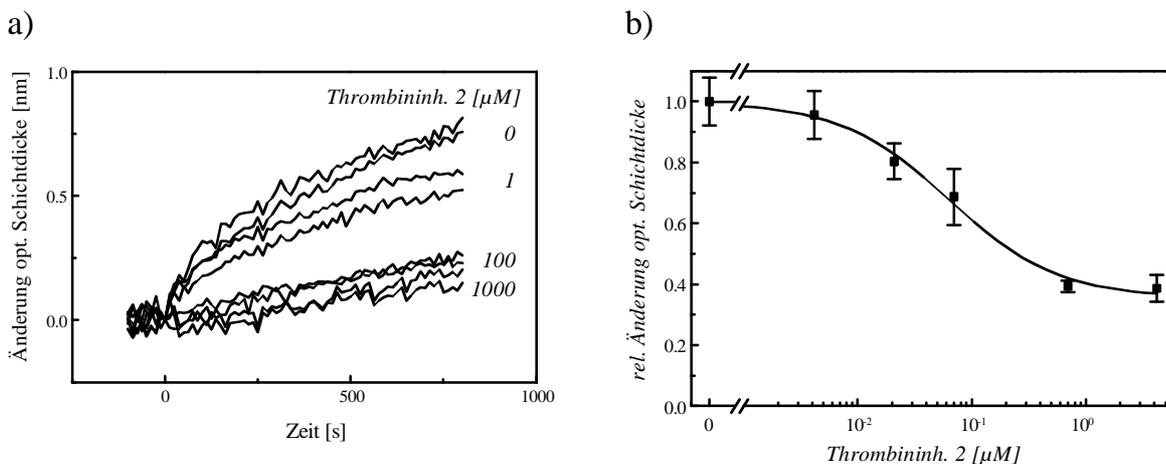


Abb. 4.31: Bindungshemmtest für Thrombininhibitor 2. a) Bindung von Thrombin der Konzentration von $0,25 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit zugegebener Inhibitors. Die Bindungen wurden simultan gemessen. b) Aus der Auswertung der Bindungskurven durch Anpassung an $S_t = A\sqrt{t} + Bt + S_0$ im angezeigten Auswertebereich resultierende Titrationskurve.

Ein weiteres System unter Verwendung eines direkten Assays wurde auf dem Demonstrator 0a versucht, die Interkalierung von Substanzen in DNA. Dazu wurde zunächst DNA auf einen gereinigten Transducer über elektrostatische Wechselwirkungen immobilisiert. Als Grundlage diente Polyethylenimin in PBS auf das im Ultraschallbad gescherte DNA inkubiert wurde. Diese Immobilisierung konnte zeitaufgelöst parallel verfolgt werden (Abb. 4.32). Ein nächster Schritt war die Beobachtung der Interkalierung von Doxorubicin in DNA. Abb. 4.33 zeigt die zeitlich verfolgte Bindung von Doxorubicin an DNA. Es wurde deutlich, daß eine Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ein ausreichend hohes Signal lieferte, so daß es mit dem Demonstrator 0a detektiert wer-

den konnte. Es zeigte sich aber auch, daß die Bindung in den Kavitäten sehr inhomogen verlief. So belief sich die Änderung der optischen Schichtdicke nach 300 s von 1 bis 2,5 nm. Damit wurde es schwierig, Ergebnisse innerhalb der einzelnen Kavitäten zu vergleichen.

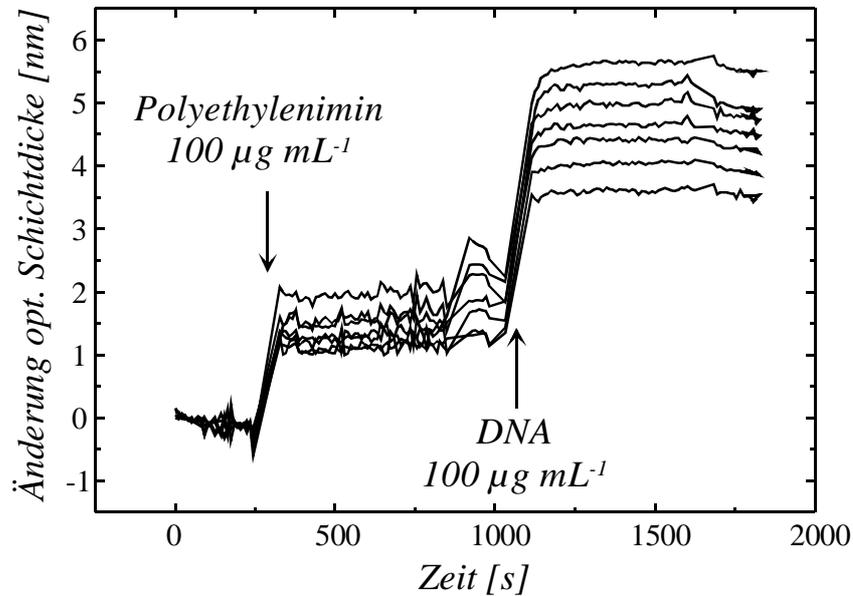


Abb. 4.32: Immobilisierung von DNA auf einen gereinigten Transducer über elektrostatische Wechselwirkungen. Zunächst wurde das Polykation Polyethylenimin und danach gescherte DNA auf dem Transducer inkubiert. Gezeigt sind Bindungskurven für verschiedene Kavitäten, die parallel gemessen wurden.

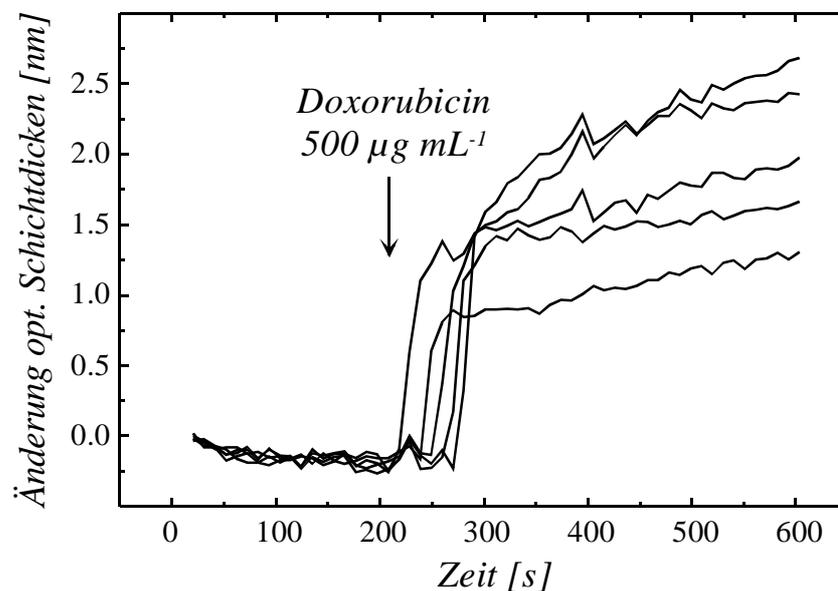


Abb. 4.33: Interkalierung von Doxorubicin in DNA, hier parallel in verschiedenen Kavitäten beobachtet.

Probleme zeigten sich auch hier weiterhin im hohen Rauschen und starken Ausreißern, die in allen Kavitäten korreliert auftraten und auf Fehler in der Optik und Detektion, vor allem aber in der Ungenauigkeit des Lyotfilters beruhten (Rothmund 1999). Aus diesem Grund war es wichtig, weitere Verbesserungen am Demonstrator 0a durchzuführen. Es konnte aber mit dem System gezeigt werden, daß die Transducermodifikation auch für große Flächen durchzuführen war und daß die Bindungskurven den theoretischen Berechnungen für ruhende Proben gehorchten. Somit konnte die Auswertung von Bindungskurven durch Anpassung an eine Wurzelfunktion beibehalten werden.

4.3.2 Untersuchungen des parallelen RfS-Aufbaus Demonstrator 0b

Der Demonstrator 0a wurde in einigen Bereichen umgebaut. So wurde das Lyotfilter durch ein Filterrad mit 6 festen Interferenzfiltern ersetzt. Auch die Kamera wurde ersetzt und bot nun eine Auflösung von 640x480 Pixel. Damit war es möglich, auf dem Chip sowohl das reflektierte Licht des Transducers als auch das einer unter dem Transducer befindlichen Keilplatte zeitgleich zu detektieren, was eine Referenzierung der Lampe ermöglichte. Dies führte somit zu einem niedrigeren Rausch/Signal-Verhältnis, einer homogenen Bestimmung der optischen Schichtdicke (Abb. 4.34a) und einer niedrigeren Standardabweichung dieser Schichtdickenbestimmung (Abb. 4.34b). Die über den Transducer hinweg ermittelten optischen Schichtdicken lagen in einem Bereich von 431 bis 436 nm, also in einer etwa halb so großen Spanne als beim Demonstrator 0a, und die Standardabweichung lag ebenfalls deutlich unter der des Vorgängermodells, in weiten Bereichen unterhalb von 10 pm.

a)

b)

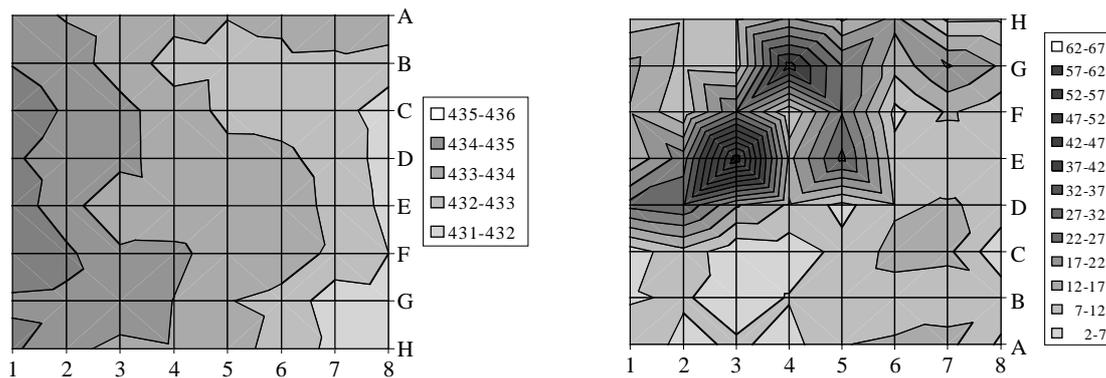


Abb. 4.34: a) Verteilung der optischen Schichtdicke jeder Kavität auf dem Transducer.
 b) Standardabweichung der Bestimmung der optischen Schichtdicke jeder Kavität für 10 Messungen in pm.

Auch beim Demonstrator 0b wurde eine grundlegende Charakterisierung des Aufbaus mit Hilfe des Thrombin als Modelltarget durchgeführt. Zunächst wurden Transducer mit dem bewährten Verfahren im Sandwich mit dem Referenzthrombininhibitor modifiziert und die Bindung unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen simultan gemessen (Abb. 4.35).

Nach dem bewährten Verfahren der Anpassung der Bindungskurve an eine Wurzelfunktion konnte die Änderung der optischen Schichtdicke nach 500 s bestimmt werden. Es konnte festgestellt werden, daß der Signalhub sich durch die Verwendung von Transducern mit einer 330 nm SiO_2 -Schicht nochmals verkleinerte, im Gegensatz zum Demonstrator 0a mit Transducern mit einer SiO_2 -Schicht mit 375 nm. Dies wurde aber durch eine deutliche Verbesserung des Rauschens gerne in Kauf genommen. Ein wichtiger Punkt der folgenden Untersuchungen war die Homogenität der erzielten Ergebnisse über den Transducer hinweg und die Reproduzierbarkeit der Bindungsmessung in einer Kavität, da der Transducer durch Regeneration zu einem mehrfachen Einsatz kommen sollte.

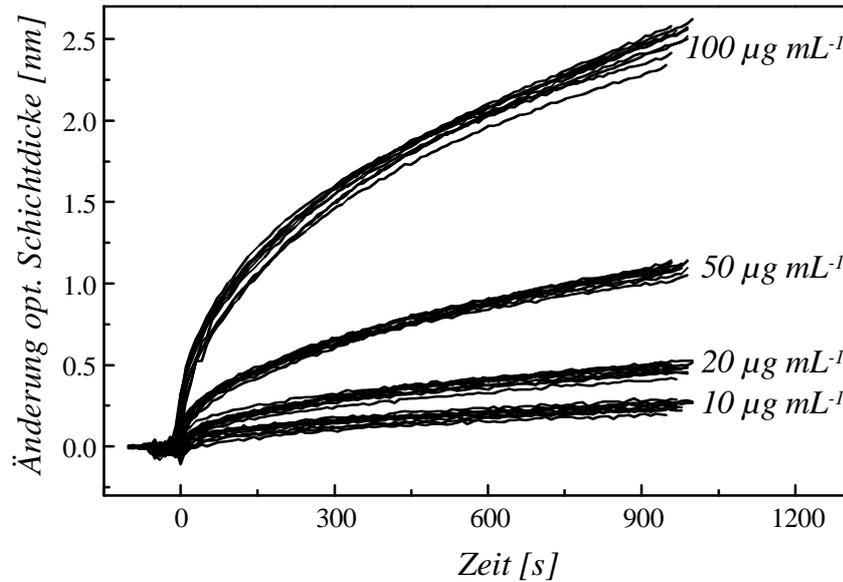


Abb. 4.35: Bindung von Thrombin unterschiedlicher Konzentration an immobilisierten Thrombininhibitor in ruhender Probe simultan gemessen.

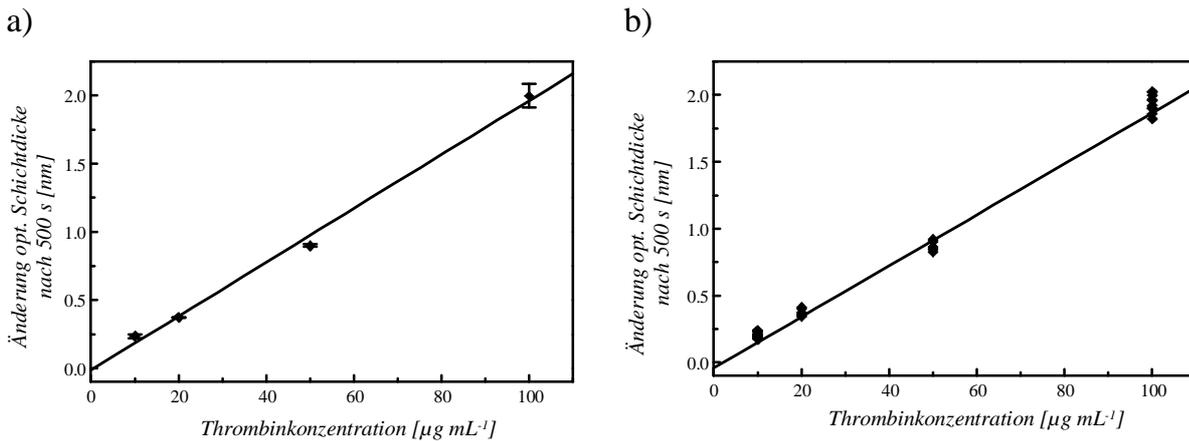


Abb. 4.36: Linearer Zusammenhang zwischen der Änderung der optischen Schichtdicke nach 500 s und der eingesetzten Thrombinkonzentration. a) Simultan für jeweils 10 Kavitäten pro Konzentration dreimal gemessen b) Hintereinander in 10 zufällig ausgewählten Kavitäten bestimmt.

Abb. 4.36 zeigt die Änderung der optischen Schichtdicke in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration. Dazu wurde dreimal simultan über den Transducer hinweg gemessen, wobei pro Konzentration 10 Kavitäten genutzt wurden (Abb. 4.36a). Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Bindungsmessung wurden in einem anderen Experiment in 10 Kavitäten hintereinander unterschiedliche Thrombinkonzentrationen vermessen.

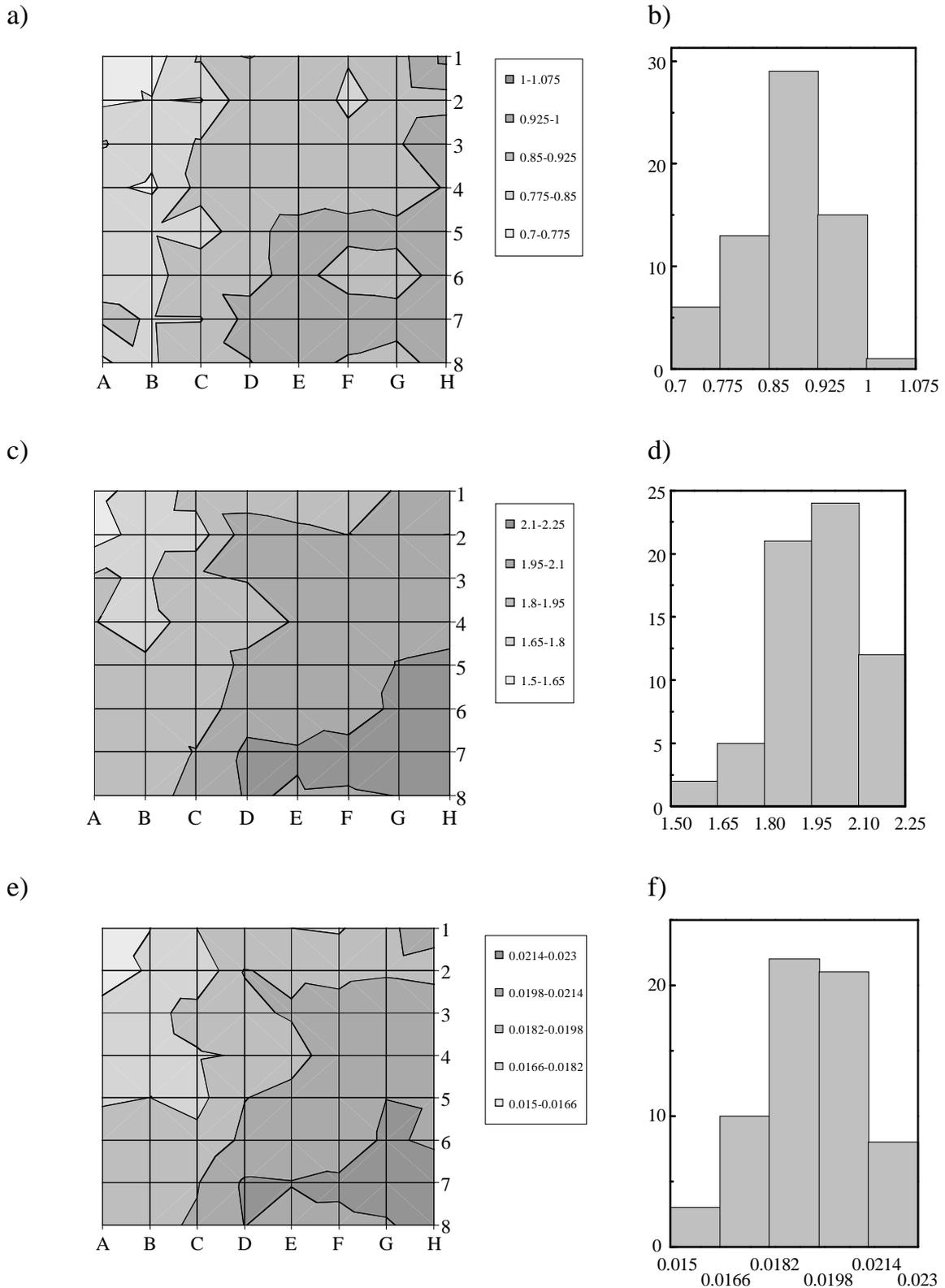


Abb. 4.37: Bindung von Thrombin auf modifizierten Transducer. a) Änderung der optischen Schichtdicke durch Bindung von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin in 64 Kavitäten b) dazugehöriges Histogramm c) von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin und d) Histogramm und e) Dynamik in 64 Kavitäten als Steigung des linearen Zusammen-

hangs zwischen der Änderung der optischen Schichtdicke nach 500 s und der eingesetzten Thrombinkonzentration und f) Histogramm.

Weitere Untersuchungen betrafen die Homogenität der Messungen über dem gesamten Transducer. Dabei waren sowohl die Änderung der optischen Schichtdicke für bestimmte Thrombinkonzentrationen als auch die Dynamik in Form der Steigung des linearen Zusammenhangs zwischen der Änderung der optischen Schichtdicke nach 500 s und der eingesetzten Thrombinkonzentration von besonderer Bedeutung (Abb. 4.37).

Aus den Histogrammen sind der Median als auch die Quantilen für 25 und 75 % in Tab. 4.4 wiedergegeben. Die Homogenität über den Transducer ist für ein System im HTS durchaus ausreichend. So liegen die Quantilen von 25 bzw. 75 % für $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ z.B. nur bei -110 bzw. +90 pm.

Tab. 4.4: Median und Quantilen für 25 und 75 % für die in Abb. 4.37 gezeigten Histogramme.

	Median	Quantilen für 25/75 %
$50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin	0,88 [nm]	0,85 / 0,92 [nm]
$100\mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin	1,97 [nm]	1,86 / 2,06 [nm]
Dynamik	$0,0196 [\text{nm mL } \mu\text{g}^{-1}]$	$0,0183 / 0,0206 [\text{nm mL } \mu\text{g}^{-1}]$

Aufgrund der guten Resultate wurden Bindungshemmtests mit zwei Target durchgeführt, dem Thrombin und dem EBP. Abb. 4.38 zeigt die simultan gemessene Bindung von Thrombin in Abhängigkeit von zugegebenem Inhibitor 2. Die große Veränderung der optischen Schichtdicke nach der Bindung und der Regeneration rührt von der Entnahme der Lösung aus der Kavität und der damit verbundenen Messung gegen Luft her.

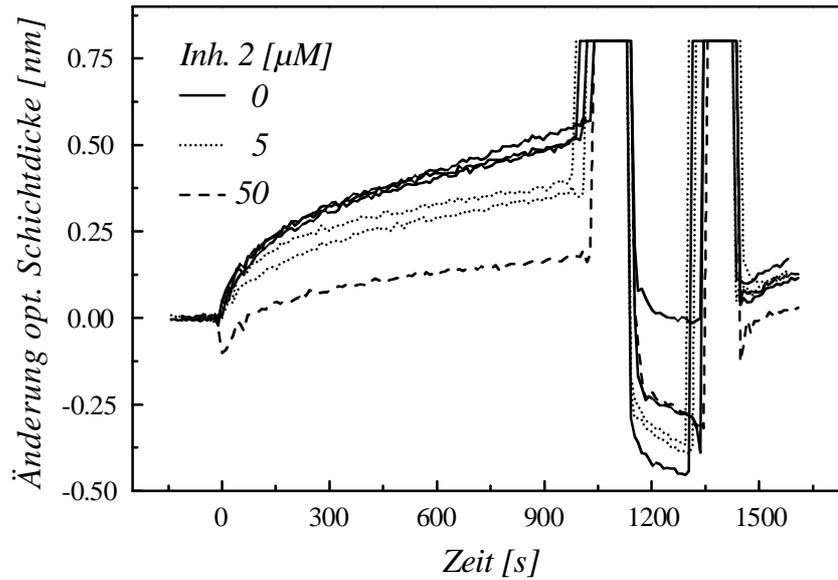


Abb. 4.38: Bindung von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin in Abhängigkeit von zugegebenen Inhibitor 2, jeweils zwei Messungen. Alle Messungen wurden simultan durchgeführt.

Durch die Auswertung der Messungen über eine Anpassung an eine Wurzelfunktion entstand folgender 3D-Plot (Abb. 4.39), der das Ergebnis des Bindungshemmtests für 4 Thrombininhibitoren zeigt, in dem jeweils zwei Konzentrationen zweimal vermessen wurden. Als Kontrolle diente dabei Thrombin ohne Inhibitor. Es kann deutlich zwischen kompetenten Inhibitoren wie Inhibitor 2 und weniger kompetenten Inhibitoren wie Inhibitor 1 und 3 unterschieden werden. Inhibitor 4 zeigte keine besonders hohe Affinität, da aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser die angegebene Konzentration nicht erreicht wurde.

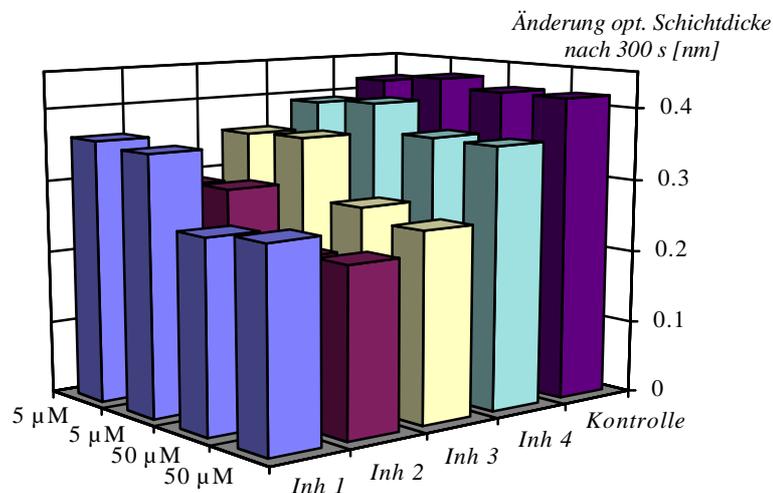


Abb. 4.39: Ergebnis des Bindungshemmtests für 4 Thrombininhibitoren. Jeweils 2

Konzentrationen wurden zweimal vermessen. Als Kontrolle diente Thrombin ohne Inhibitor.

Ein weiteres Target in Form des EBP wurde ebenfalls auf dem Demonstrator 0b getestet. Abb. 4.40 zeigt die simultan gemessene Bindung von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ EBP in Abhängigkeit von zugegebenem Estron.

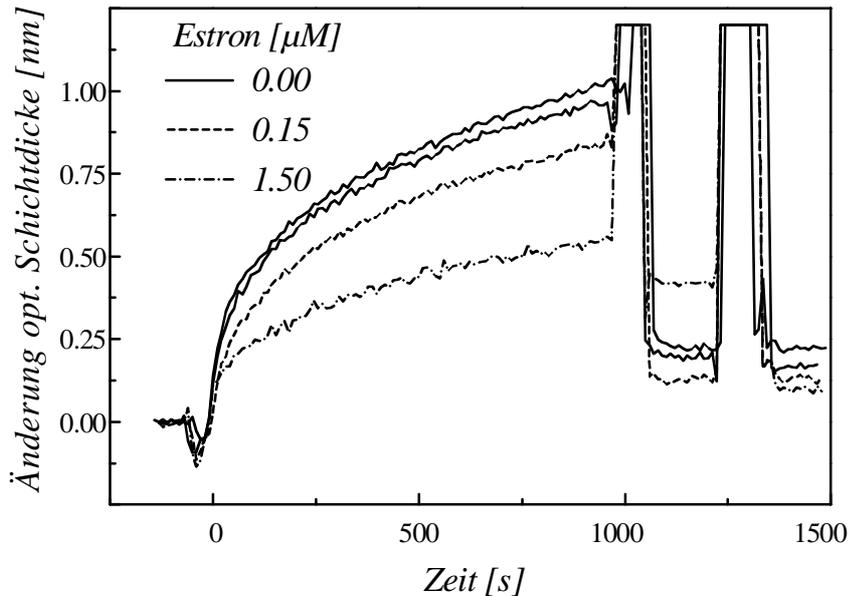


Abb. 4.40: Bindung von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ EBP in Abhängigkeit von zugegebenen Estron. Alle Messungen wurden simultan durchgeführt.

Ein ebenfalls parallel durchgeführter Bindungshemmtest wurde für verschiedene Kompetitoren durchgeführt (Abb. 4.41). Auch hier kann im Vergleich zur Kontrolle zwischen kompetenten und weniger kompetenten Substanzen unterschieden werden.

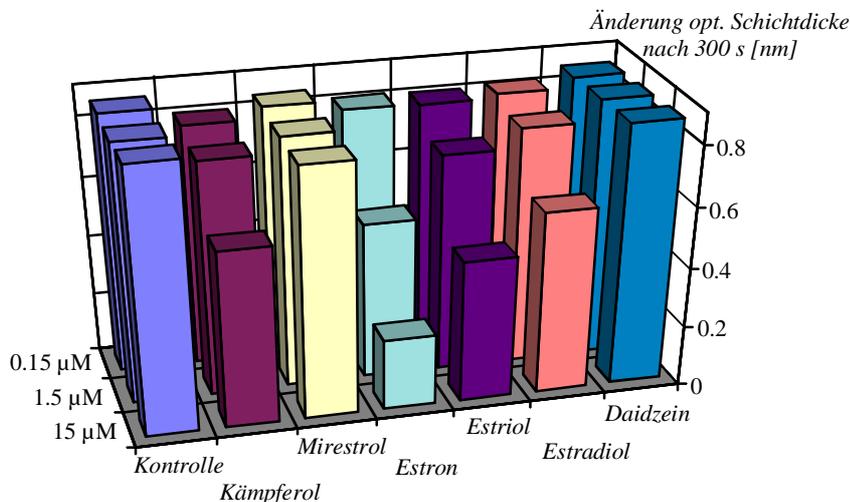


Abb. 4.41: Ergebnis des Bindungshemmtests für verschiedene EBP-Kompetitoren in drei unterschiedlichen Konzentrationen. Als Kontrolle diente EBP ohne Zugabe eines Kompetitors.

Mit dem Demonstrator 0b konnte gezeigt werden, daß ein paralleles *RIfS*-Detektionssystem funktioniert und das Assayformat des Bindungshemmtests erfolgreich darauf angewendet werden konnte. Die in den vorangegangenen Untersuchungen gemachten Aussagen über den Bindungshemmtest in ruhenden Proben konnten mit diesem System ebenfalls bestätigt werden, so daß die Auswertung der Bindungskurven mittels Anpassung an eine Wurzelfunktion auch hier erfolgreich eingesetzt werden konnte. Modellhaft konnte für diesen Aufbau eine Meßreihe, die denjenigen im HTS ähnlich ist, für zwei Targets durchgeführt werden. Die Messungen waren dabei mit einer Abweichung von unter 10 % reproduzierbar, und die Ergebnisse in den Kavitäten zeigten eine Abweichung von unter 10 % untereinander auf.

*4.3.3 Untersuchungen des parallelen *RIfS*-Aufbaus Demonstrator 1 für 96er Standard-Mikrotiterplatten (MTP)*

In der letzten Stufe der Entwicklung eines parallelen *RIfS*-Detektionssystems stand ein Aufbau zur Verfügung, der mit 96er Standard-MTP arbeitete. Der Transducer war, um einen schnelleren Wechsel der Probenplatte zu ermöglichen, nur aufgelegt und nicht wie in den beiden Vorgänger-Modellen mit Glycerin fest auf dem optischen Aufbau angebracht. Zudem erhöhte sich das Probenvolumen von durchschnittlich 50 μL auf 150 μL , da eine Bedeckung des Kavitätenbodens erst mit 80 μL möglich war. Andererseits bot dieser Aufbau nun die Möglichkeit, die Probenhandhabung mit einem Pipettierroboter automatisch durchzuführen, was den Fehler, der mit der manuellen Probenhandhabung einher geht, vermindern sollte. Die Verteilung der in den 96 Kavitäten gemessenen Lage des Extremums der Interferenzspektrums ist in Abb. 4.42a und c gezeigt, und die Standardabweichung dieser Bestimmung als Maß für das Rauschen in Abb. 4.42b und d (jeweils gegen Luft und Wasser). Gegen Luft lagen die Extrema in einem Bereich von 10 nm und das Rauschen lag zum größten Teil unter 10 pm. Gegen Wasser sah dies schon etwas anders aus. Hier lagen die Extrema in einem Bereich von

24 nm und das Rauschen zwischen 2 und 37 pm, bis auf eine Kavität, in der ein Rauschen von 78 pm festgestellt wurden. Beim Vermessen mehrerer Transducerplatten traten immer wieder solche Effekte auf, die auf eine unsaubere Verklebung des Grid zurückzuführen waren.

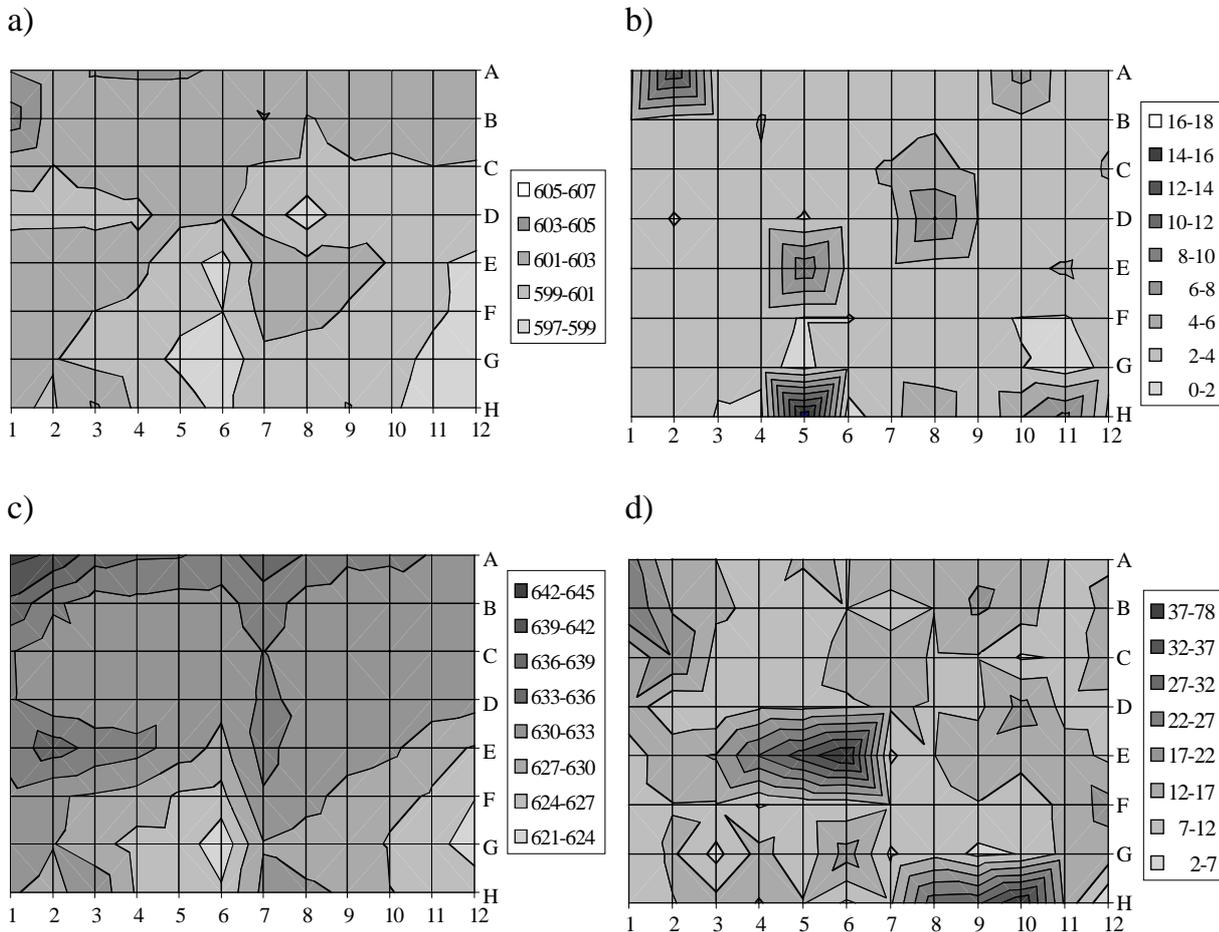


Abb. 4.42: a) Verteilung der optischen Schichtdicke jeder Kavität auf dem Transducer.

b) Standardabweichung der Bestimmung der optischen Schichtdicke jeder Kavität für 10 Messungen.

Als weiteren Schritt sollte die Bindung von Thrombin an einen entsprechend modifizierten Transducer beobachtet werden. Da zu dieser Zeit nur Transducer mit einem Polystyrol-Grid als Probenträger zur Verfügung standen, mußte das Protokoll zur kovalenten Kupplung von Liganden auf die Transduceroberfläche geändert werden. Das sonst üblicherweise angewendete Verfahren mit organischen Lösungsmitteln wurde wegen der Unverträglichkeit des Polystyrols gegen solche Lösungsmittel durch ein Verfahren in wässriger Lösungen ausgetauscht. Somit wurde ein Verfahren unter Zu-

hilfenahme von N-Hydroxysuccinimid-Aktivestern zur kovalenten Kupplung von Liganden entwickelt. Dazu wurden die Aminogruppen der Aminodextranoberfläche zunächst umfunktionalisiert und die entstandenen Carboxygruppen durch einem Aktivester aktiviert. Danach reichte es aus, den Liganden, hier den Standardthrombininhibitor, in Wasser zu lösen und auf die Oberfläche zu geben. Die Inhibitorlösung konnte wieder aus den Kavitäten gesammelt werden und zu einer erneuten Modifikation herangezogen werden, da die Inhibitorkonzentration so im Überschuß vorlag, daß dies für mehrere Transducerplatten ausreichte.

Die Qualität und Reproduzierbarkeit der Kupplung in wässriger Lösung wurde zunächst im Einkanalssystem überprüft (Abb. 4.43) und danach auf das Mehrkanalsystem, den Demonstrator 1 übertragen (Abb. 4.44).

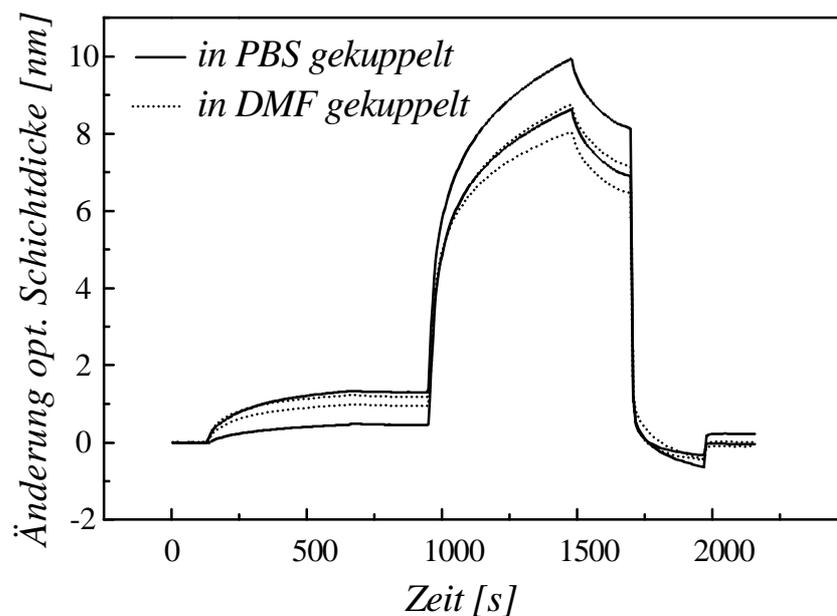


Abb. 4.43: Vergleich der Maximalbelegung eines Transducers, modifiziert mit Thrombininhibitor in organischer und wässriger Lösung durch Bindung von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin.

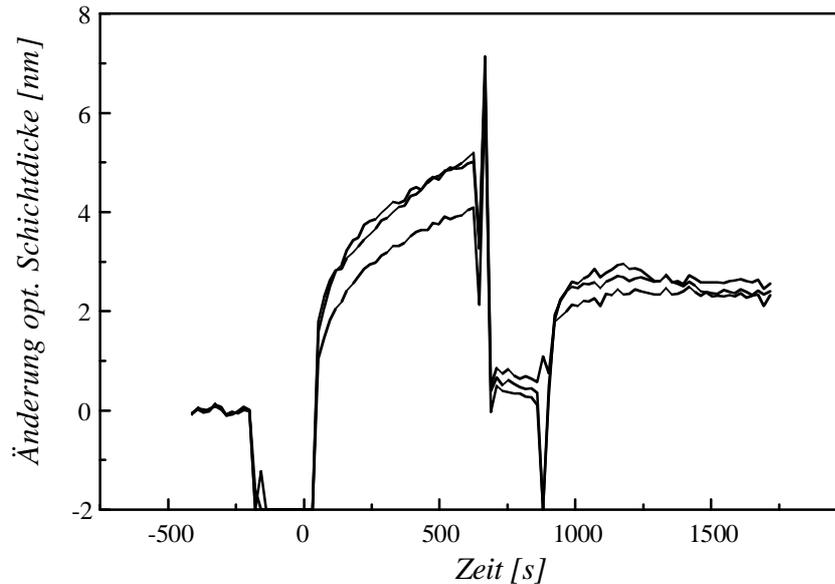


Abb. 4.44: Maximalbelegung eines Transducers im Demonstrator 1, modifiziert mit Thrombininhibitor in wässriger Lösung durch Bindung von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thrombin.

In Abb. 4.44 wird ebenfalls deutlich, daß der Demonstrator 1 eine hohe Inhomogenität in den Signaländerungen der einzelnen Kavitäten bei Bindung von Thrombin an die Oberfläche aufwies. Es schien, als beruhe dieses Verhalten auf dem optischen Aufbau, da sowohl das Probenhandlungssystem (nicht gezeigt) als auch die Oberflächenmodifikation der Transducer sehr zuverlässig funktionierten.

Weiter wurde neben dem Bindungshemmttest auch die Einführung des direkten Testformats zur Untersuchung DNA-interkalierender Substanzen versucht. Da der Proben-träger mit einem positiv geladenen Aminodextran beschichtet war und die DNA nicht direkt auf das Aminodextran immobilisiert werden sollte, wurde ein Polyanion, Polyvinylsulfat, als Zwischenschicht eingesetzt (Abb. 4.45).

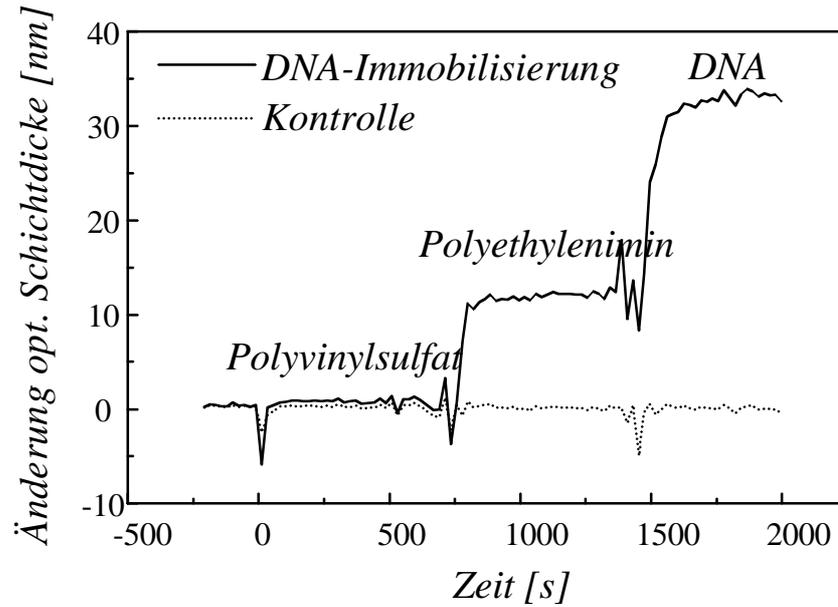


Abb. 4.45: Immobilisierung von DNA über elektr. Wechselwirkungen. Zeitgleich zur DNA-Immobilisierung wurde eine Kavität, in die nur PBS pipettiert wurde, als Kontrolle herangezogen.

Auf diese DNA konnten nun DNA-interkalierende Substanzen gegeben werden, deren Bindung direkt detektiert werden konnte (Abb. 4.46 und Abb. 4.47). Auch hier spielte die Inhomogenität der durch die Interkalierung hervorgerufenen Änderung der optischen Schichtdicke über die Transducerplatte hinweg eine für die Auswertung beschränkende Rolle.

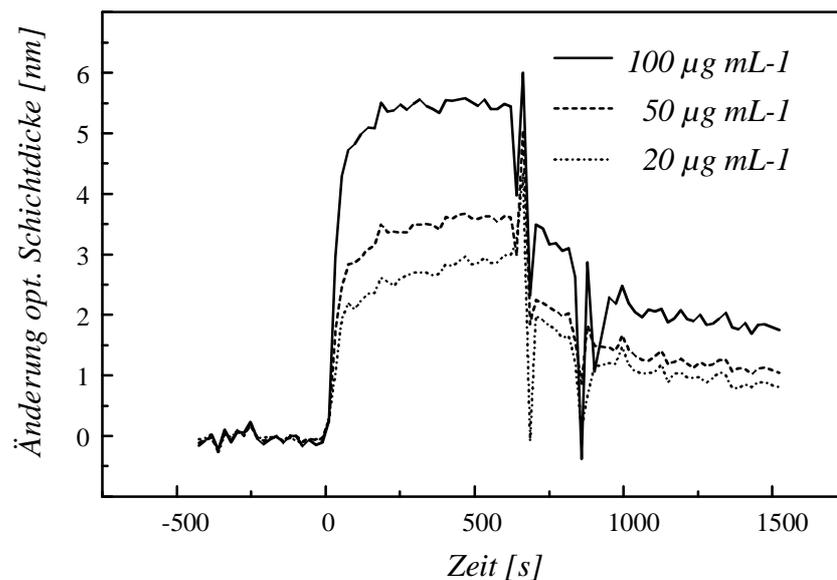


Abb. 4.46: Interkalierung von Doxorubicin in unterschiedlichen Konzentrationen.

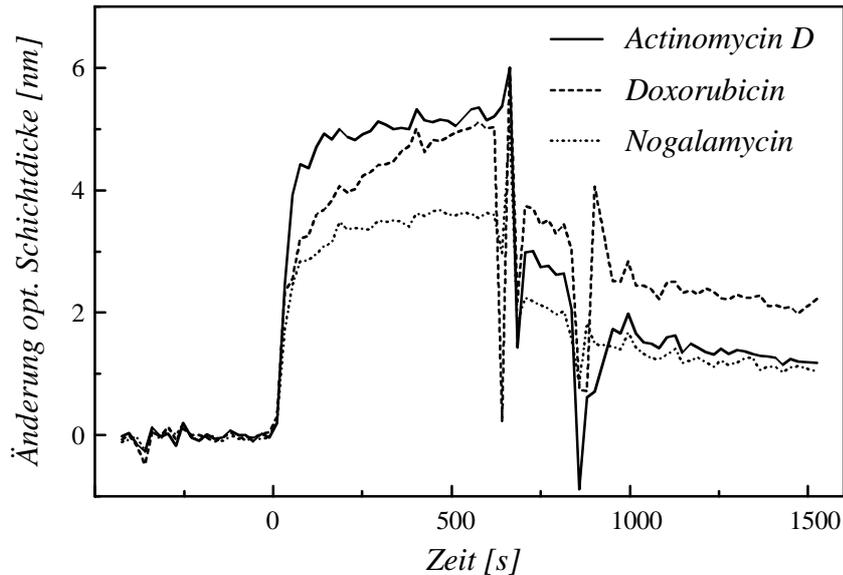


Abb. 4.47: Interkalierung verschiedener DNA-bindender Substanzen

Fazit ist, daß mit dem Demonstrator 1 gezeigt werden konnte, daß die Modifikation der Transducer mit den entwickelten Protokollen erfolgreich war, auch wenn der Einsatz von Grids aus Lösungsmittel festem Polypropylen statt aus Polystyrol hier bessere Dienste leisten würde, da mit diesen Platten die herkömmliche Oberflächenchemie auch in DMF und damit wasserfrei ablaufen könnte. Der Einsatz eines automatischen Pipettiersystems brachte keine Schwierigkeiten bei der Durchführung von Bindungsmessungen, im Gegenteil, durch die Automation kann davon ausgegangen werden, daß der Fehler von 10 %, der noch im Demonstrator 0b in Homogenität und Reproduzierbarkeit auftrat, weiter herab gesetzt werden kann.

4.4 Oberflächenmodifikation von RfS-Transducern

Ein weiterer Punkt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Entwicklung von Alternativen zur üblichen Kupplungschemie von Liganden über Carbodiimide. Ein interessanter Aspekt war die spezifische Kupplung von Liganden über SH-Gruppen, die sich in Peptiden als Cysteinreste finden lassen. Als Modellsystem fungierte die Glutathion-S-Transferase, ein Enzym, das reduziertes Glutathion überträgt. In dieser Eigenschaft ist es in der Lage, Glutathion zu binden, wobei der Cysteinrest nicht frei vorliegen muß.

Die Kupplung von Glutathion über den mittelständigen Cysteinrest auf die Transduceroberfläche wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. Die erste Methode fand unter Verwendung von EMCS statt, das ein heterobifunktionelles Kupplungsreagenz darstellt. Abb. 4.48 zeigt die Bindung des EBP-GST-Fusionsproteins über seine GST-Aktivität.

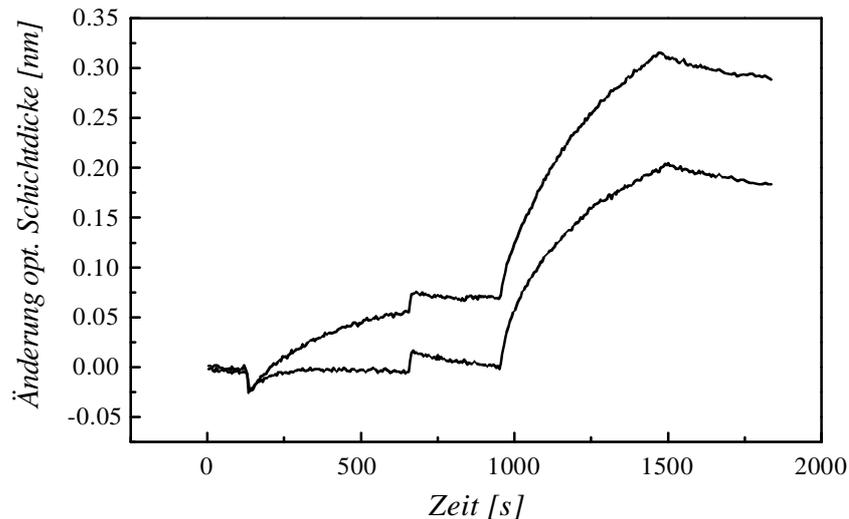


Abb. 4.48: Kupplung von EBP über die GST-Aktivität. Glutathion wurde über EMCS auf Dextran gekuppelt. Zunächst wurde 1 mg mL^{-1} Ova-Lösung zur Untersuchung der unspezifischen Wechselwirkung der Oberfläche und danach $74 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ EBP-GST-Protein zur spezifischen Wechselwirkung inkubiert, für zwei Sensoren gezeigt.

Die Glutathionoberfläche zeigte nur geringe unspezifische Wechselwirkung mit Ova, die spezifische Wechselwirkung fiel aber mit 250 pm Änderung der optischen Schichtdicke sehr klein aus. Dies hatte zwei Ursachen, zum ersten die geringe Aktivität der GST und zum zweiten, daß die Oberflächenmodifikation nicht ausreichend funktionierte.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Methoden eingeführt, die einen Butandiol-diglycidylether verwendet. Dieses bifunktionelle Molekül ist in der Lage über seine Epoxygruppen verschiedene funktionelle Gruppen zu binden. Abb. 4.49 zeigt die Bindung von GST an eine über Butandiol-diglycidylether modifizierte Glutathion-Oberfläche. GST wurde an Stelle des EBP-GST-Fusionsproteins verwendet, um eine höhere Aktivität für die Versuche zu haben. Diese mußte aber zuvor erst durch Umpuf-

fern von Glutathion in der Probe befreit werden. Es zeigte sich, daß die so erhaltene Oberfläche eine höhere Wechselwirkung mit Ova zeigte als die mit EMCS. Andererseits konnte eine höhere spezifische Bindung von GST beobachtet werden. Eine Regeneration der Oberfläche mit freiem reduzierten Glutathion war nicht komplett möglich, so daß hier mit HCl (nicht gezeigt) vollständig regeneriert werden mußte.

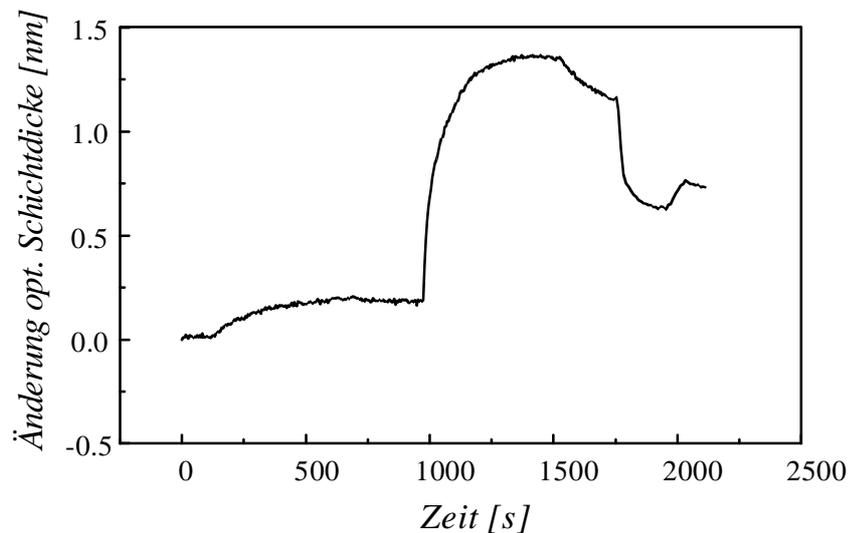


Abb. 4.49: Kupplung von GST. Glutathion wurde über Butandiol-diglycidylether auf Dextran gekuppelt. Zunächst wurde mit 1 mg mL^{-1} Ova-Lösung zur Untersuchung der unspezifischen Wechselwirkung der Oberfläche und danach mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ GST inkubiert. Die Regeneration wurde mit 1 mM Glutathion_{red} versucht.

Sowohl über EMCS als auch über Butandiol-diglycidylether lassen sich Liganden auf Transduceroberflächen kupplern. Dies ist besonders dann attraktiv, wenn Amino- bzw. Carboxygruppe von Peptiden (auch die endständigen) für die Bindung wichtig sind und damit nicht zur Kupplung zur Verfügung stehen. Es besteht somit auch die Möglichkeit, spezielle Thiolreste in den Liganden einzuführen, um eine Kupplung über diesen Rest erst zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Markierungsfreie optische Methoden zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen sind wegen ihrer vielseitigen Anwendbarkeit für verschiedene Targets sehr attraktive Verfahren für ein High Throughput Screening. Die Tatsache, daß es bis vor kurzem kein System gab, das auch den erfordernten Durchsatz bot, ließ die Verbreitung dieser Methoden im HTS aber leider nicht zu. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Parallelisierung eines solchen Systems der geforderte Durchsatz durchaus erreicht werden kann, und daß damit auch Wirkstoffstudien durchgeführt werden können. Das auf Basis von *RfS* von Carl Zeiss Jena und der Arbeitsgruppe von Prof. Gauglitz entwickelte Detektionssystem war in der Lage, 96 Proben parallel zu vermessen, in einem im HTS weit verbreiteten Format der Mikrotiterplatte.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der Aufgabe, auf dem entstehenden parallelen *RfS*-Detektionssystem Assays und Assayformate zu entwickeln und zu etablieren. Mit dem Bindungshemmtest gelang ein solches Testformat, mit dem auch zwei Targetproteine modellhaft untersucht werden konnten. Die besondere Art der Messung in ruhenden Proben, die sich aus den Anforderungen des HTS für ein solches Detektionssystem ergab, wurde durch Simulationsrechnungen sehr genau studiert und der Einfluß auf das Ergebnis diskutiert. So ist damit zu rechnen, daß die im Bindungshemmtest in ruhenden Proben bestimmten Affinitäten unterbestimmt werden und für eine vollständige Hemmung eine höhere Substanzkonzentration eingesetzt werden muß. Andere Parameter wie Targetverbrauch oder die Dauer eines Tests liegen dagegen in den für ein HTS üblichen Grenzen.

Auf drei parallelen Systemen wurden die auf dem Einkanalssystem gemachten Grundlagen überprüft. So war es ebenfalls möglich, zwei Targets mit Hilfe dieser Systeme zu charakterisieren und Bindungshemmtests in der Art, wie sie später einmal im HTS

durchgeführt werden könnten, auf den Systemen zu etablieren. Die entwickelte Auswertemethode der Bindungskurven durch Anpassung an eine Wurzelfunktion erwies sich als solide und brachte auch die geforderte Datenreduktion. Mit dieser Methode ist es ebenfalls möglich, die Hemmungswirkung der Substanzen in Wirkklassen, z.B. Hemmung in Prozent, auszudrücken, was mehr Information als die klassische Ja/Nein-Entscheidung enthält.

Ein zweites Testformat, der direkte Test, stellte weit höhere Anforderungen an das Detektionssystem und konnte lediglich für DNA und DNA-Interkalatoren realisiert werden. Dabei half die Tatsache, daß DNA über eine sehr hohe Zahl an Bindungsstellen verfügt und damit für ein ausreichend hohes Signal sorgte.

Der Demonstrator 0b zeigte hinsichtlich der Homogenität der Resultate über den Transducer hinweg als auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Resultate Abweichungen, die kleiner als 10 % waren. Bedenkt man, daß in einem System im HTS die Probenhandhabung automatisch und damit reproduzierbarer arbeiten würde, hätte dieses System einen ausreichend hohen Standard, der einem Analysesystem im HTS genügen würde. Die sehr gute optische Leistung des Demonstrators 0b konnte nicht auf die erste Version des Demonstrators 1 übertragen werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß alle entwickelten Testformaten übernommen werden konnten.

Aufgrund der Polystyrol-Transducerplatten für dieses System waren Änderungen in der Transducermodifikation notwendig. Es konnte gezeigt werden, daß in wässrigen Lösungen die Kupplungschemie ebenfalls durchgeführt werden konnte. Als einen Ausblick auf weitere Entwicklungen kann man in diesem Zusammenhang sagen, daß der Einsatz von Kupplungsprotokollen in wasserfreiem Milieu für weit mehr Bindungsstellen auf dem Transducer und damit auch für ein höheres Signal sorgen würde. Damit wäre es bestimmt in weiteren Entwicklungsphasen sinnvoll, auf Transducerplatten mit Polypropylen-Grid umzusteigen.

Auch die fehlende Homogenität des Demonstrator 1 sollte beseitigt werden. Zwar bietet sich die Möglichkeit an, diese Unterschiede durch Referenzierung auszugleichen, es stellt sich aber die Frage, ob dies für ein HTS praktikable ist. Auch ist eine Einsparung

an Probelösung durch Einführung des 384er Plattenformates wünschenswert, da die Detektionsgrenzen der getesteten Geräte es zur Zeit nicht zulassen, die Targetkonzentration merklich herabzusetzen.

6 Literatur

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molekularbiologie der Zelle, zweite Auflage, VCH, Weinheim (1990).
- Andersson K., Hamalainen M., Malmqvist M. Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach, *Anal. Chem.* (1999) **71** 2475-2481.
- Apeler H., Gottschalk U., Guntermann D., Hansen J., Massen J., Schmidt E., Schneider K-H., Schneidereit M., Ruebsamen-Waigmann H. Expression of natural and synthetic genes encoding herpes simplex virus 1 protease in *Escherichia coli* and purification of the protein. *Eur J. Biochem.* (1997) **247** 890-895.
- Appel J.R., Johnson J., Narayanan V.L., Houghten R.A. Identification of novel antitumor agents from mixture-based synthetic combinatorial libraries using cell-based assays, *Mol. Divers.* (1999) **4** 91-102.
- Arteca G.A Characterization of global molecular shape transitions between „open“ and „closed“ protein conformations, *Biopolymers* (1996) **39** 671-680.
- Atkins P.W. *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1990).
- Aurora Biosciences Corp. Firmenm-Web-Seite: <http://www.aurorabio.com/products/instrumentation.htm>
- Betts M.J., Sternberg M.J.E. An analysis of conformational changes on protein-protein association: Implications for predictive docking, *Prot. Engineer.* (1999) **12** 271-283.
- Brasch J. Hormones, fungi and skin, *Mycoses* (1997) **40** 11-16.

- Brecht A., Burckhardt R., Rickert J., Stemmler I., Schütz A., Fischer S., Friedrich Th., Gauglitz G., Göpel W. Transducer based approaches for parallel binding assays in HTS, *J. Biomolec. Screening* (1996) **1** 191-201.
- Brecht A., Gauglitz G. Optimised Layer system for immunosensors based on the *RlfS* transducer, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1994) **349** 360-366.
- Brecht A., Kraus G., Nahm W., Gauglitz G. Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators, B* (1993) **11** 21-27.
- Brecht A., Schobel U., Gauglitz G. Resonant Energy Transfer Detection for Low Volume Immunoassay in Environmental Applications, in 'Biosensors for Environmental Diagnostics', Hock, Barcelo, Cammann, Hansen, Turner (Eds.) In Teubner-Reihe 'Umwelt', Teubner Verlag, Stuttgart, pp. 11-27 (1998).
- Breinholt V., Larsen J.C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MDF7 cell proliferation assay, *Chem. Res. Toxicol.* (1998) **11** 622-629.
- Brock R., Vamosi G., Vereb G., Jovin T.M. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) **96** 10123-10128.
- Bromberg L., Salvati L.Jr. Bioactive surfaces via immobilization of self-assembling polymers onto hydrophobic materials, *Bioconjugate Chem.* (1999) **10** 678-686.
- Brown B.J., Deng Z., Karplus P.A., Massey V. On the active site of old yellow enzyme. Role of histidine 191 and asparagine 194, *J. Biol. Chem.* (1998) **273** 32753-32762.
- Buckman J., Miller S.M. Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates, *Biochemistry* (1998) **37** 14326-14336.
- Buckman J.S., Miller S.M. Kinetic characterization of the redox-active estrogen binding protein from *Candida albicans*, *FASEB Journal* (1997) **11** A1144.

- Caporale L.H. Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995) **92** 75-82.
- Comley J.C.W., Reeves T.R.P. A 1536 colorimetric SPAP reporter assay: Comparison with 96- and 384-well formats, *J. Biomolec. Screening* (1999) **3** 217-225.
- Cosnier S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosens. Bioelectron.* (1999) **14** 443-456.
- Coughlin S.R. How the protease thrombin talks to cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) **96** 11023-11027.
- Cush R., Cronin J.M., Stewart W.J., Maule C.H., Molloy J., Goddard N.J. The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: principle of operation and associated instrumentation, *Biosens. Bioelectron* (1993) **8** 347-353.
- Dagnelie C.F., Touw Otten F.W., Kuyvenhoven M.M., Rozenberg Arska M., de Melker R.A., Bacterial flora in patients presenting with sore throat in Dutch general practice, *Fam. Pract.* (1993) **10** 371-377.
- Desai M.C., Zuckermann R.N., Moos W.H. Recent advances in the generation of chemical diversity libraries, *Drug Develop. Res.* (1994) **33** 174-188.
- Dudley R.A., Edwards P., Ekins R.P., Finney D.J., McKenzie I.G.M., Raab G.M., Rodbard D., Rodgers R.P.C. Guideline for immunoassay data processing, *Clin. Chem.* (1985) **31** 1264-1271.
- Eddowes M.J. Theoretical methods for analysing biosensor performance, in *Biosensors-A practical approach*, Cass A.E.G (Ed.) Oxford University Press (1990).
- Edwards D.A. Estimating rate constants in a convection-diffusion system with a boundary reaction, *J. Appl. Math.* (1999) **63** 89-112.
- Fischer-Früholz St. Das Labor auf dem Chip, *BioTec* (1997) **1** 40-41.

- Flotow H., Purton T.J., Whitaker D.P., Williams D.H., Wilkinson S.E. Substrate specificity and inhibitor profile of human recombinant p56-lck from a baculovirus expression vector, *Inflammation Res.* (1996) **45** 412-415.
- Fussenegger M., Bailey J.E., Hauser H., Mueller P.P. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells, *Trends Biotech.* (1999) **17** 35-42.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators, B* (1993) **11** 21-27.
- Glaser R.W. Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics, *Anal. Biochem.* (1993) **213** 153-161.
- Grahn S., Kurth T., Ullmann D., Jakubke H-D. S' subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer, *Biochim. Biophys. Acta* (1999) **1431** 329-337.
- Haake H., Schütz A., Gauglitz G. Label-free Detection of Biomolecular Interaction by Optical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.* (2000) in Druck.
- Hall S.E. Parallel organic synthesis in array format, Gordon E.M., Kerwin J.F.Jr. (Eds.) *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery*, 291-306, (1998).
- Hardcastle A., Boxall C., Newbatt Y., Rowlands M.G., Turlais F., Aherne G.W. High-throughput screening (HTS) assays for MAP kinase and farnesyl transferase (FTase), *British J. Cancer* (1999) **80** 47.
- Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, San Diego (1992).
- Horvath J.J. Biosensors based on DNA intercalation using light polarization, *Methods in Biotechnology*. Rogers K.R., Mulchandani A. (Eds.) *Methods in Biotechnology, Affinity biosensors: Techniques and protocols* p161-171, (1998).

- Jung G. (Ed.) Combinatorial Peptide and nonpeptide libraries, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1996).
- Karlsson R., Stahlberg R. Surface Plasmon Resonance Detection and Multispot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low-Molecular-Weight Analytes and for Determination of Low Affinities, *Anal. Biochem.* (1995) **228** 274-280.
- Klingler J., Friedrich T. Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* (1997) **73** 2195-2200.
- Knight D.C., Eden J.A. Phytoestrogens-a short review, *Maturitas* (1995) **22** 167-75.
- Koltermann A., Ketting U., Bieschke J., Winkler T., Eigen M. Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998) **95** 1421-1426.
- Koo K., Foegeding P.M., Swaisgood H.E. Development of a streptavidin-conjugated single-chain antibody that binds *Bacillus cereus* spores, *Appl. Environ. Microbiol.* (1998) **64** 2497-2502.
- Kraus G. Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1993).
- Kukanskis K., Elkind J., Melendez J., Murphy T., Miller G., Garner H. Detection of DNA hybridization using the TISPR-1 surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Biochem.* (1999) **274** 7-17.
- Lawler J.F., Snyder Jr. S.H. Viral protease assay based on GAL4 inactivation is applicable to high-throughput screening in mammalian cells, *Anal. Biochem.* (1999) **269** 133-138.
- Lee C.S., Lee J.D., Han C.H. New fabrication process of single-crystalline silicon islands using double diffusion: Application to a heating resistor of a thermal inkjet printhead, *Jpn. J. Appl. Phys.* (1998) **37** 7100-7103.

- Lemmo A.V., Fisher J.T., Geysen H.M., Rose D.J. Characterization of an inkjet chemical microdispenser for combinatorial library synthesis, *Anal. Chem.* (1997) **69** 543-551.
- Liedberg B., Nylander C., Lundström I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators* (1983) **4** 299-304.
- Loo J.A., DeJohn D.E., Du P., Stevenson T.I., Loo R.R.O. Application of mass spectrometry for target identification and characterization, *Med. Res. Rev.* (1999) **19** 307-319.
- Lynch B.A., Loiacono K.A., Tiong C.L., Adams S.E., Macneil I.A. A fluorescence polarization based Src-SH2 binding assay, *Anal. Biochem.* (1997) **247** 77-82.
- Markgren P.O., Hamalainen M., Danielson U.H. Screening of compounds interacting with HIV-1 proteinase using optical biosensor technology, *Anal. Biochem.* (1999) **265** 340-350.
- Martens C., Bakker A., Rodriguez A., Mortensen R.B., Barrett R.W. A generic particle-based nonradioactive homogeneous multiplex method for high-throughput screening using microvolume fluorimetry, *Anal. Biochem.* (1999) **273** 20-31.
- Martinez H.E., Stock A.M. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors, *J. Mol. Biol.* (1997) **269** 301-312.
- McDonald O.B., Chen W.J., Ellis B., Hoffman C., Overton L., Rink M., Smith A., Marshall C.J., Wood E.R. A scintillation proximity assay for the Raf/MEK/ERK kinase cascade: High-throughput screening and identification of selective enzyme inhibitors, *Anal. Biochem.* (1999) **268** 318-329.
- Mellentin-Michelotti J., Evangelista L.T., Swartzman E.E., Miraglia S.J., Werner W.E., Yuan P-M. Determination of ligand binding affinities for endogenous seven-transmembrane receptors using fluorometric microvolume assay technology, *Anal. Biochem.* (1999) **272** 182-190.
- Nakayama G.R., Parandoosh Z. An immunoassay for assessment of receptor tyrosine kinase autophosphorylation, *J. Immunol. Meth.* (1999) **225** 67-74.

- Nellen Ph., Tiefenthaler K., Lukosz W. Integrated optical input grating couplers as biochemical sensors, *Sens. Actuators* (1988) **15** 285-295.
- Nilsson J., Szecsi P., Schafer-Nielsen C. A flow-through microsampling device applied to an ion-exchange chromatography system, *J. Biochem. Biophys. Meth.* (1993) **27** 181-190.
- Panayotova-Heiermann M., Leung D.W., Hirayama B.A., Wright E.M. Purification and functional reconstitution of a truncated human Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) expressed in *E. coli*, *FEBS Let.* (1999) **459** 386-390.
- Pandey P.C., Weetall H.H. Evanescent fluorobiosensor for the detection of polyaromatic hydrocarbon based on DNA intercalation, *Appl. Biochem. Biotech.* (1995) **55** 87-94.
- Parks C.A., Crippen G.M., Topliss J.G. The measurement of molecular diversity by receptor site interaction simulation, *J. Comp. Aided Molec. Design* (1998) **12** 441-449
- Piehler J. Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducer, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1997c).
- Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., Maul C., Grabley S., Zerlin M. Specific binding of low molecular weight ligands with direct optical detection, *Biosens. Bioelectron.* (1997) **12** 531-538.
- Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin M., Maul C., Thiericke R., Grabley S. Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.* (1997a) **249** 94-102.
- Piehler J., Brecht A., Geckeler K.E., Gauglitz G. Surface Modification for Direct Immunoprobes, *Biosens. Bioelectron.* (1996) **11** 579 - 590.
- Piehler J., Brecht A., Giersch T., Hock B., Gauglitz G. Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *J. Immunol. Meth.* (1997b) **201** 189-206.

- Piervincenzi R.T., Reichert W.M., Hellinga H.W. Genetic engineering of a single-chain antibody fragment for surface immobilization in an optical biosensor, *Biosen. Bioelectron.* (1998) **13** 305-312.
- Pospiech A., Bietenhader J., Schupp T. Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*, *Microbiol.* (1996) **142** 741-746.
- Quinn R.J. High-throughput screening in natural product drug discovery in Australia utilising Australia's biodiversity, *Drug Develop. Res.* (1999) **46** 250-254.
- Rothmund M. Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1999).
- Rothmund M., Schutz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Graefe D. Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1997) **359** 15-22.
- Sandman K.E., Marla S.S. Zlokarnik G., Lippard S.J. Rapid fluorescence-based reporter-gene assays to evaluate the cytotoxicity and antitumor drug potential of platinum complexes, *Chem. Biol.* (1999) **6** 541-551.
- Schmitt H.-M., Brecht A., Piehler J., Gauglitz G. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosen. Bioelectron.* (1997) **12** 219-233.
- Schmitt H.-M., Brecht A., Piehler J., Gauglitz G. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosen. Bioelectron.* (1997) **12** 219-233.
- Schober A., Günther R., Schwienhorst A., Döring M., Lindemann B.F. Accurate high-speed liquid handling of very small biological samples, *BioTechniques* (1993) **15** 324-329.
- Seethala R., Menzel R. A homogeneous, fluorescence polarization assay for Src-family tyrosine kinases, *Anal. Biochem.* (1999) **253** 210-218.

- Sharif T.R., Sharif M. A high throughput system for the evaluation of protein kinase C inhibitors based on Elk1 transcriptional activation in human astrocytoma cells, *Int. J. Oncology* (1999) **14** 326-335.
- Skowronski R., Feldman D. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*, *Endocrinol.* (1989) **124** 1965-1972.
- Stevens M.E., Bouchard P.J., Kariv I., Chung T.D.Y., Oldenburg K.R. Comparison of automation equipment in high throughput screening, *J. Biomolec. Screening* (1998) **3** 305-311.
- Stryer L. *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1990).
- Takatsuji H. Zinc-finger proteins: The classical zinc finger emerges in contemporary plant science, *Plant Mol. Biol.* (1999) **39** 1073-1078.
- Terrett N.K., Gardner M., Gordon D.W., Kobylecki R.J., Steele J. *Combinatorial Synthesis: The Design of Compound Libraries and their Application to Drug Discovery*, Tetrahedron (1995) **51** 8135-8173.
- The Technology partnership Firmenm-Web-Seite: <http://www.acusite.co.uk/acumen/>
- Trurnit H.J. Studies of enzyme systems at a solid-liquid interface. I. The system chymotrypsin-serum albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* (1953) **47** 251-271.
- Trurnit H.J. Studies of enzyme systems at a solid-liquid interface. II. The kinetics of adsorption and reaction, *Arch. Biochem. Biophys.* (1954) **51** 176-199.
- Walker D.L., Reid J.M., Ames M.M. Preclinical pharmacology of bizelesin, a potent bifunctional analog of the DNA-binding antibiotic CC-1065, *Cancer Chemotherapy Pharmacology* (1994) **34** 317-322.
- Warrior U., Chiou X.G., Sheets M.P., Sciotti R.J., Parry J.M., Simmer R.L., Surber B.W., Burns D.J., Beutel B.A., Mollison K.W., Djuric S.W., Trevillyan J.M. Development of a p38 kinase binding assay for high throughput screening, *J. Biomolec. Screening* (1999) **4** 129-135.

Wedler G. Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1987).

White S., Larsen B. Candida albicans morphogenesis is influenced by estrogen, Cell. Molec. Life Sci. (1997) **53** 744-749.

Zhang R., Beyer B.M., Durkin J., Ingram R., Njoroge F.G., Windsor W.T., Malcolm B.A. A continuous spectrophotometric assay for the hepatitis C virus serine protease (1999) Anal. Biochem. **270** 268-275.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMD	Aminofunktionalisiertes Dextran
Da	Dalton
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleinacid)
EBP	Östrogen bindende Protein (engl. estrogen binding protein)
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EHS	Estradiolhemisuccinat
EMCS	6-Maleinimido-capronsäure-N-succinimidylester
FIA	Fließinjektionsanlage
Gl.	Gleichung
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan
GST	Glutathion-S-Transferase
HTS	High Throughput Screening
MG	Molekulargewicht

MTP	Mikrotiterplatte
MWG	Massenwirkungsgesetz
NHS	N-Hydroxysucciniimid
Ova	Ovalbumin (Hühnereiweiß-Albumin)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
<i>RIS</i>	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SPA	engl. Scintillation Proximity Assay
SPR face	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. Surface plasmon resonance)
Tab.	Tabelle
upm	Umdrehungen pro Minute

7.2 Veröffentlichungen

Brecht A., Burckhardt R., Rickert J., Stemmler I., Schütz A., Fischer S., Friedrich Th., Gauglitz G., Göpel W. Transducer based approaches for parallel binding assays in HTS, *J. Biomolec. Screening* (1996) **1** 191-201.

Rothmund M., Schutz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Graefe D. Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1997) **359** 15-22.

Günter Gauglitz, Andreas Brecht, Hans-Martin Haake, Matthias Rothmund, Matthias Sauer, Uwe Schobel, Armin Schütz, Ivo Stemmler, Array configurations based on read-out techniques, *SPIE* (1998) **3570**, 80- 86.

Hans-Martin Haake, Armin Schütz, Günter Gauglitz, Label-free Detection of Biomolecular Interaction by Optical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.*, im Druck.

Oliver Birkert, Hans-Martin Haake, Armin Schütz, Andreas Brecht, Jürgen Mack, Günter Jung, Günter Gauglitz, A Streptavidin-Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, eingereicht.

7.3 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Eicher, Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Giffhorn, Prof. Dr. Kaltwasser, Prof. Dr. Kroeger, Prof. Dr. Leibenguth, Prof. Dr. Mosbacher, Prof. Dr. Mues, Prof. Dr. Nachtigall, Prof. Dr. Unruh, Prof. Dr. Veith, Prof. Dr. Wohleben, Prof. Dr. Zeppezauer, Prof. Dr. Zinsmeister,

7.4 Lebenslauf

Name:	Armin Schütz
Geburtsdatum:	09.08.1967
Geburtsort:	Saarlouis
Schulbildung:	1972-1978 Grund- und Hauptschule Rehlingen 1978-1987 Staatl. Gymnasium Dillingen Abitur
Wehrdienst:	1987-1989 Stabskompanie Fernmeldestab 94, Daun
Studium:	1989-1995 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Diplomprüfung:	1994
Diplomarbeit:	1994-1995 bei Prof. Dr. Heinrich Kaltwasser, Fach bereich Mikrobiologie, Universität des Saarlandes
Titel:	Zelluläre Lokalisierung der Urease und immuno- logischer Nachweis der Apo-Urease bei <i>Bacillus pa- steurii</i> DSM 33
Diplom:	09.11.1995
Promotion:	1996-2000 unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen
Titel:	Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (<i>RI/S</i>) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening