

**MARKIERUNGSFREIES HOCHDURCHSATZSCREENING
MITTELS REFLEKTOMETRISCHER
INTERFERENZSPEKTROSKOPIE**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

OLIVER BIRKERT

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2001

Dekan:

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Heinz Oberhammer

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für seine stete Unterstützung und für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit, das seine freundliche Übernahme des Koreferats ermöglichte.

Bei allen Projektpartnern des BMBF-Projektes LIBRARIAN II bedanke ich mich ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Herrn Dr. Gerald Birk und Herrn Steffen Hadamovsky möchte ich mich zudem für die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung des EGF-Rezeptors bedanken. Herrn Dr. Rolf Tünnemann danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Triazine.

Der gesamten Arbeitsgruppe – insbesondere der Biosensor Gruppe – danke ich für die hilfsbereite und fröhliche Zusammenarbeit. Namentlich danken möchte ich Dr. Armin Schütz und Dr. Hans-Martin Haake für die enge Zusammenarbeit während LIBRARIAN II sowie Alexander Jung und Martin Mehlmann für ihren pausenlosen Einsatz im Dienste des IPC-Netzwerkes. Äußerst engagiert haben weiterhin Jochen Mehne und Oliver Frank zu dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Markus Enzelberg, Dr. Stefan Minning und Dr. Stefan Lange aus der Arbeitsgruppe von Prof. P.C. Schmidt danke ich für die Bereitstellung von unterschiedlichen His-Tag-Fusionsproteinen.

Für die Bereitstellung der Thrombininhibitoren danke ich Herrn Dr. Peter Eckard von der Firma Knoll GmbH.

All denen, die mir in der ganzen Zeit privat zur Seite standen kann ich nicht genug danken.

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Motivation der Arbeit	1
1.2	Zielsetzung und Gliederung	3
	Zielsetzung	3
	Gliederung der Arbeit	3
2	<i>Theoretische Grundlagen</i>	5
2.1	Biomolekulare Wechselwirkung	5
2.1.1	Detektion von Wechselwirkungsaffinität und –kinetik an Oberflächen	6
2.1.1.1	Bestimmung der Bindungskinetik	7
2.1.1.2	Bestimmung der Affinitätskonstanten in Lösung	8
2.2	Hochdurchsatzscreening oder High-Throughput Screening (HTS)	9
2.2.1	Entwicklung des HTS	10
2.2.2	Realisierung des HTS	10
2.2.2.1	Technische Realisierung	10
2.2.2.2	Detektionsmethoden im HTS	11
	Radiometrische Methoden	11
	Homogene Fluoreszenzmethoden	12
	Markierungsfreie Screeningmethoden	12
	Zellbasierte Methoden	12
2.2.2.3	Datenauswertung im HTS	13
2.2.3	Kombinatorische Chemie und HTS	13
2.3	Sensoroberflächen	14
2.3.1	Modifizierung von Oberflächen	14
2.3.2	Spezifische Funktionalisierung von Transduceroberflächen	15
2.3.2.1	Rückhaltung hinter einer inerten Membran	15
2.3.2.2	Adsorption	15
	Spezifische Adsorption	15
	Unspezifische Adsorption	16
2.3.2.3	Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien	16
2.3.2.4	Einschluss in Matrices	16
2.3.2.5	Kovalente Bindung	17
	Aminogruppen	17

Thiolgruppen	19
Carboxylgruppen	20
Weitere Kupplungsreaktionen	21
2.4 Biochemische Grundlagen der verwendeten Rezeptor-Ligand-Systeme	21
2.5 Avidin, Streptavidin und poly-Streptavidin	21
2.6 His-Tag	23
2.7 Thrombin	25
2.8 1,3,5-Triazine	27
2.9 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor	28
2.10 Grundlagen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie und deren Parallelisierung	29
2.10.1 Reflexion und Transmission des Lichtes	29
2.10.2 Reflexion an dünnen Schichten	31
2.10.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)	32
2.10.4 Parallelisierung von RIfS	33
3 Material und Methoden	35
3.1 Materialien	35
3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien	35
3.1.2 Lösungen	35
3.1.3 Geräte	36
3.1.3.1 RIfS Transducer	36
3.1.3.2 RIfS-Mikrotiterplatten	36
3.1.3.3 Einkanal RIfS-System	37
3.1.3.4 Mehrkanal RIfS-System	39
3.1.3.5 Mikrodosiersystem	40
3.2 Methoden	40
3.2.1 Modifikation der Transduceroberflächen	40
3.2.1.1 Reinigen der Glastransducer	40
3.2.1.2 Silanisierung	41
3.2.1.3 Belegung mit Polymer	41
Belegung mit Aminodextran	41

Belegung mit Polyethylenglycol _____	41
3.2.1.4 Immobilisierung von Thrombininhibitor _____	41
3.2.1.5 Immobilisierung von Phosphotyrosin _____	42
3.2.1.6 Triazinsynthese _____	42
3.2.1.7 Immobilisierung von Biotin _____	46
3.2.1.8 Kovalente Immobilisierung von (Strept-)Avidin _____	46
3.2.1.9 kovalente Immobilisierung von (Strept-)Avidin mittels Mikrodosiersystem 46	
3.2.2 Bindungshemmtest _____	47
3.2.3 Programmierte Messungen am BioSpec _____	47
3.2.3.1 Messung von Brechungsindexsprüngen _____	47
3.2.3.2 Messung von spezifischer und unspezifischer Absorption _____	47
4 Ergebnisse und Diskussion _____	49
4.1 Oberflächen zur Immobilisierung mit Hilfe einer Affinitätsreaktion _____	49
4.1.1 Immobilisierung von Avidin- und Streptavidinschichten auf SiO ₂ Transducern 49	
4.1.1.1 Immobilisierung von Streptavidin und Avidin über eine Affinitätsbindung zur Oberfläche _____	49
4.1.1.2 Aktivitätsbestimmung mit Hilfe von Avidinoberflächen _____	52
4.1.1.3 Theoretische Betrachtung der Affinitätsreaktion tetramerer Rezeptoren mit monomeren Liganden. _____	52
4.1.1.4 Messung der Titrationskurve mit verschiedenen Biotinderivaten _____	55
4.1.1.5 Kovalente Immobilisierung von Avidin und Streptavidin _____	60
4.1.1.6 Kovalente Immobilisierung in der Flusszelle _____	60
4.1.1.7 Kovalente Immobilisierung von Streptavidin mit Hilfe eines Mikrodosiersystems _____	62
4.1.2 Immobilisierung von Proteinen über einen poly-Histidin-Abschnitt in der Proteinsequenz _____	64
4.2 Parallele RfS-Messungen _____	68
4.2.1 Grundlegende Charakterisierungen des parallelen RfS-Aufbaus _____	68
4.2.1.1 Homogenität der Platten und der Bindungssignale _____	69
4.2.1.2 Abhängigkeit des Bindungssignals vom absoluten Schichtdickensignal ____	70
4.2.1.3 Kalibrierung der Bindungssignale _____	72

4.2.1.4	Temperatureffekte _____	73
4.2.1.5	Signalrauschen und dessen Abhängigkeit von der ausgewerteten Fläche _	75
4.2.1.6	Die Plattenqualität im Hinblick auf unspezifische Bindung _____	77
4.2.2	Assayentwicklung für das System Thrombin/Thrombininhibitor _____	79
4.2.2.1	Spezifische Bindung von Thrombin _____	80
4.2.2.2	Referenzieren der Thrombinbindungssignale _____	82
4.2.2.3	Aufbau des Assays _____	82
4.2.2.4	Optimierung der Thrombinkonzentration _____	84
4.2.2.5	Screeningversuche unter Idealbedingungen _____	85
4.2.2.6	Screeningversuche unter Realbedingungen _____	87
4.2.2.7	Übertragen des Assays auf das 384-Well Format _____	88
4.2.2.8	Auftreten von falsch positiven und falsch negativen Screening-Hits ____	91
4.2.2.9	Parallele Qualitative Untersuchung eines aktiven Inhibitors _____	92
4.2.2.10	Optimierung der Gesamtanalysenzeit _____	94
4.2.2.11	Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Optimierung _____	96
4.2.3	Untersuchung einer Triazin-Substanzbibliothek _____	97
4.2.3.1	Assayformat _____	98
4.2.3.2	Spezifität der Bindung _____	98
4.2.3.3	Screening der Triazinbibliothek mit unterschiedlichen Targets _____	99
4.2.3.4	Zusammenfassung _____	103
4.2.4	Assayentwicklung zur Untersuchung von Phosphotyrosinkinasen _____	104
4.2.4.1	Der Aufbau des Screening-Assays _____	104
4.2.4.2	Optimierung der Phosphotyrosinoberfläche _____	106
4.2.4.3	Wechselwirkung des Phosphotyrosinantikörpers mit der Phosphotyrosinoberfläche _____	109
4.2.4.4	Optimierung der Assay-Komponenten _____	110
4.2.4.5	Parallele Messung von Inhibitoraktivität _____	113
4.2.4.6	Screening einer Substanzbibliothek _____	115
4.2.4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Optimierung _____	115
5	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i> _____	117
5.1	Zusammenfassung _____	117
5.2	Einordnung und Bewertung _____	118
5.3	Ausblick _____	118

Oberflächenchemie	119
Messsystem	119
Probenträger	119
Charakterisierung der Biomolekularen Erkennung	119
6 Literatur	120
7 Anhang	133
7.1 Abkürzungen	133
7.2 Veröffentlichungen	135
7.3 Akademische Lehrer	136
7.4 Lebenslauf	137

1 EINLEITUNG

1.1 Motivation der Arbeit

Mit der Theorie der Pharmakon-Wirkung wird versucht, die Wirksamkeit von Pharmaka auf definierte physikalisch-chemische Wechselwirkungen in biologischen Systemen zurückzuführen. Die Bindung des Arzneistoffs an spezifische Rezeptoren ist hiernach für dessen pharmakologischen Effekt notwendige Voraussetzung und die Wirksamkeit einer Arzneisubstanz wird unter anderem durch die Spezifität und Stärke dieser Wechselwirkung bestimmt. Die Bedeutung dieser Rezeptortheorie für das Verständnis der Wirkung der überwiegenden Zahl von Arzneistoffen ist dabei unbestritten. Für die Neuentwicklung von Pharmaka ist damit die Untersuchung des Bindungsverhaltens zwischen Biomolekülen von großer Bedeutung. Dafür hat sich in den letzten Jahren der Begriff Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) etabliert.

Zur Untersuchung der Stärke und Natur der Bindung wurden zuerst Methoden wie Gleichgewichtsdialyse, Fällung, Ultrazentrifugation, Elektrophorese u. a. entwickelt. Durch die Einführung von radioaktiven Markern und später durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkern und Enzymen eröffneten sich neue Detektionsmöglichkeiten zur systematischen Untersuchung biomolekularer Wechselwirkung. Insbesondere die Markteinführung einer markierungsfreien optischen Detektionsmethode an einer Transduceroberfläche (das BIACORE System) im Jahre 1990 führte zur Entwicklung und zum Einsatz verschiedener optischer und massensensitiver markierungsfreier Detektionsverfahren. Ihnen gemeinsam ist, dass die Wechselwirkungen einer an der Transduceroberfläche immobilisierten Spezies mit einem gelöstem Bindungspartner zeitaufgelöst und markierungsfrei verfolgt werden können.

Während alle genannten Methoden zu Anfang dazu entwickelt wurden, eine Wechselwirkung möglichst genau hinsichtlich Affinität oder auch Bindungskinetik zu charakterisieren, erwuchs bald die Forderung, solche Detektionsmethoden zum schnellen Aufspüren von Wirkstoffen zu nutzen, die im Hinblick auf die pharmakologische Wirkung eine

Wechselwirkung mit dem Rezeptor zeigen. Um ideale Antagonisten oder Agonisten eines spezifischen biologischen Targets zu finden, werden idealerweise alle einem Forschungslabor zur Verfügung stehenden Substanzen auf eine potentielle Aktivität hin untersucht. Denn je größer die strukturelle Diversität der Moleküle ist, die auf pharmakologische Wirkungen hin untersucht werden, desto größer die Wahrscheinlichkeit, Kandidaten für die Weiterentwicklung zu Medikamenten zu finden. Dies erforderte aber hoch parallele Detektionssysteme für ein Hochdurchsatzscreening oder High-Throughput Screening (HTS). Vor allem die Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie haben die Anzahl potentiell wirksamer Verbindungen so rasant ansteigen lassen, dass heute oftmals über eine Million Substanzen pro Assay zu testen sind. Gleichzeitig bleibt für einen Test immer weniger Zeit, da durch das Human Genome Projekt (HUGO) immer neue, mögliche Targets gefunden werden, die den Wettlauf nach neuen Medikamenten weiter beschleunigen.

Der resultierende Zeit- und Kostendruck für die Pharmabranche bei der Suche nach neuen Wirkstoffen stellt an HTS-Analysemethode deshalb hohe Forderungen wie

- Stabilität
- einfache Handhabung
- Automatisierbarkeit
- Hohe Parallelisierbarkeit
- Miniaturisierung.

Auf Grund ihrer günstigen Eigenschaften finden im Hochdurchsatzscreening die optischen Methoden besonders große Verbreitung. Sie funktionieren normalerweise unter Zuhilfenahme einer Markierung wie z.B. Fluorophoren, Radiomarkern oder Enzymen. Mit der Weiterentwicklung einer markierungsfreien optischen Detektionsmethode, der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS), kann nun erstmals auch bei der parallelen Detektion im HTS auf die Verwendung von Markern verzichtet werden. Das Screening wird in der Regel in einer Standardmikrotiterplatte (MTP) durchgeführt. Das sind Trägerplatten, auf denen mehrere Probenkavitäten untergebracht sind. Die Anzahl der Kavitäten geht von 96 über 384 bis hin zu 1536 und höher und zeigt, dass nur mit Hilfe hochparalleler Probenträger der geforderte Durchsatz zu erreichen ist. Design, Vielfalt und Flexibilität der Probenträger und der Testformate, Informationsgehalt der Daten, sowie Geschwindigkeit und Kosten entscheiden dabei, ob eine Methode sich im HTS-Bereich behaupten kann.

1.2 Zielsetzung und Gliederung

Zielsetzung

In Anbetracht der geschilderten Situation war das Ziel der vorliegenden Arbeit eine

Untersuchung der Möglichkeiten, die markierungsfreie Detektion für den Einsatz im Hochdurchsatzscreening zu nutzen und durch ein breites Angebot an Sensoroberflächen und Assay-Testformaten ein möglichst breites Anwendungsgebiet zu eröffnen.

Dabei stand im Rahmen des BMBF-Projektes LIBRARIAN II erstmals eine Detektionseinheit zur Verfügung, mit der die Wechselwirkung eines Rezeptors mit der Biosensoroberfläche hochparallel markierungsfrei detektiert werden konnte und die auf Grund des optischen Aufbaus und des Probenträgerformates mit typischen HTS-Problemstellungen kompatibel war. Es sollte untersucht werden, ob mit diesem Aufbau die Wechselwirkungen an der Oberfläche detektiert werden können und ob die physikalisch-chemische Qualität der aus dem Bindungsprozess resultierenden Daten, die man aus den beobachteten Schichtdickenänderungen erhält, aussagekräftig genug sind, eindeutige Screeningergebnisse zu liefern. Durch die Implementierung unterschiedlicher Testformate und Assays auf dem optischen Messsystem sollte die Einsatzbreite der Screeningplattform aufgezeigt und validiert werden.

Obwohl in der Vergangenheit bereits intensiv auf dem Gebiet der Oberflächenmodifikation für RfS-Biosensoren gearbeitet wurde und daraus eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächen zur kovalenten oder adsorptiven Immobilisierung der Wechselwirkungspartner hervorging, war noch keine Strategie zugänglich, mit der Rezeptoren über eine spezifische Adsorption, also über eine Affinitätsreaktion, an RfS-Biosensoren gebunden werden konnten. Deshalb wurden unterschiedliche Möglichkeiten für solche Immobilisierungsstrategien entwickelt und validiert.

Gliederung der Arbeit

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

- Prinzipien der biomolekularen Wechselwirkungen sowie Thermodynamik und Kinetik von Affinitätsreaktionen,
- die Detektion solcher Wechselwirkungen im Hochdurchsatzscreening,
- Methoden zur Modifizierung von Oberflächen,

- Biochemie der Systeme, die in dieser Arbeit zur Oberflächenmodifizierung und in den Screening-Untersuchungen Verwendung fanden,
- sowie die Grundprinzipien der optischen Detektion im Fall von Einzel- und Parallelmessungen.

Nach der Beschreibung von Materialien, Geräten und verwendeten Methoden werden im Ergebnisteil zunächst die neuen Affinitätsoberflächen, die auf der Wechselwirkung von (Strept-)Avidin mit Biotin und von Nickel-NTA mit His-Tag-Fusionsproteinen beruhen, charakterisiert und deren Einsatzmöglichkeiten vorgestellt.

Anschließend wird durch allgemeine Charakterisierungen geprüft, inwieweit sich der Prototyp zur parallelen RfS-Detektion zur Untersuchung von Wechselwirkungsereignissen eignet. Am Beispiel von drei Assays mit unterschiedlichem Aufbau und unterschiedlicher Zielrichtung wird dann gezeigt, wie bei der Entwicklung eines Assays für das Hochdurchsatzscreening vorgegangen werden muss. Gleichzeitig soll damit gezeigt werden, welche Assaytypen für eine Anwendung grundsätzlich zugänglich gemacht werden können. In einer abschließenden Zusammenfassung werden die neuen Oberflächen und das parallele RfS-Screeningmodul kritisch bewertet.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Biomolekulare Wechselwirkung

Biochemische Rezeptoren wie Proteine oder Nukleinsäuren haben die Fähigkeit, an bestimmten Regionen des Moleküls, den sogenannten Bindungsstellen oder Bindungstaschen, mit anderen Molekülen, wie z.B. niedermolekularen Liganden, Proteinen oder Oligonukleotiden eine spezifische Wechselwirkung einzugehen. Besondere Kennzeichen eines solchen Ligand-Rezeptor-Komplexes sind die hohe Selektivität und die mögliche Reversibilität der Wechselwirkung. Die Gleichgewichtskonstante K einer solchen Bindung ist häufig sehr hoch, und ergibt sich aus der Summe einer Vielzahl von schwachen attraktiven Kräften. Durch die Gleichgewichts- oder Affinitätskonstante sind Konzentrationen von Ligand, Rezeptor und Ligand-Rezeptor-Komplex im Gleichgewicht über das Massenwirkungsgesetz gegeben

$$K = \frac{c_{RL}}{c_R \cdot c_L}$$

Formel 1

mit den Gleichgewichtskonzentrationen an freiem Rezeptor c_R , freiem Liganden c_L und Rezeptor-Ligand-Komplex c_{RL} . Einen Überblick über gängige Methoden zur Ermittlung der Affinitätskonstanten in homogener Phase findet sich in Steward *et al.* 1983.

Während die Affinitätskonstante Aufschluss über die thermodynamischen Eigenschaften der Wechselwirkung gibt, kann die Kinetik der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung nur über eine zeitaufgelöste Beobachtung während der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts ermittelt werden. Häufig verläuft die Assoziation nach einem bimolekularen Mechanismus und die Dissoziation nach einem monomolekularen Mechanismus, so dass sich für die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes die Geschwindigkeit dc_{RL}/dt zu

$$\frac{dc_{RL}}{dt} = k_a \cdot c_R \cdot c_L - k_d \cdot c_{RL}$$

Formel 2

mit der Assoziationsratenkonstanten k_a und der Dissoziationsratenkonstanten k_d ergibt.

2.1.1 DETEKTION VON WECHSELWIRKUNGS-AFFINITÄT UND -KINETIK AN OBERFLÄCHEN

Bei der Detektion von Affinitätsreaktionen an Biosensoroberflächen spielt die Abfolge von mehreren Prozessen, wie in Fig. 1 gezeigt sind, eine Rolle. Um an die Oberfläche binden zu können, muss der Rezeptor an die Oberfläche hindiffundieren. Der Massentransport hängt dabei im wesentlichen von der Dicke der Diffusionsgrenzschicht, vom Diffusionskoeffizienten und von der Rezeptorkonzentration im freien Volumen ab. Wird die Volumlösung gerührt, so erhält man eine konstante Diffusionsgrenzschicht. Bei ruhender Lösung beobachtet man auf Grund der Verarmung der Rezeptorkonzentration in Oberflächennähe eine mit \sqrt{t} wachsende Diffusionsgrenzschicht. Die eigentliche Bindung des Rezeptors an die oberflächengebundenen Liganden ist durch die kinetischen Bindungskonstanten charakterisiert.

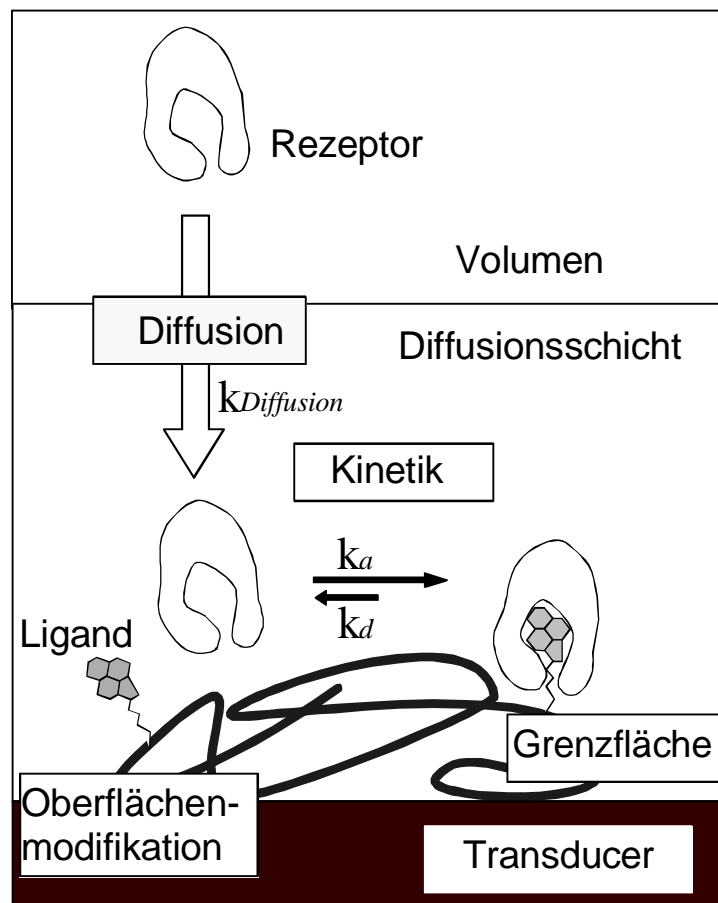


Fig. 1: Effekte, die bei der Detektion von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen an Sensoroberflächen entscheidend sind.

Damit setzt sich die Bindung des Rezeptors an die Oberfläche aus zwei Phänomenen zusammen, die formal als Folgereaktion betrachtet werden können: Diffusion an die Oberfläche und spezifische Wechselwirkungskinetik mit der Oberfläche. Da nur der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in die Zeitabhängigkeit der Detektion der Bindung

eingeht, können durch günstige Wahl der Reaktionsparameter beide Phänomene getrennt und so unterschiedliche Informationen über das System erhalten werden.

2.1.1.1 Bestimmung der Bindungskinetik

Zur Bestimmung der Bindungskinetik muss erreicht werden, dass die Diffusion deutlich schneller erfolgt als die Bindung des Rezeptors an den Liganden. Dies wird erreicht, indem man das Verhältnis zwischen freiem Rezeptor in Lösung und freiem Ligand an der Oberfläche sehr groß wählt, das heißt sehr hohe Rezeptorkonzentrationen und Oberflächen mit wenigen Bindungsstellen benutzt. Bei konstanter Rezeptorkonzentration in Lösung (also bei Konvektion) erhält man eine Kinetik pseudo-erster Ordnung mit einer aus Formel 2 folgenden Bindungsrate $\Gamma(t)$:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t})$$

Formel 3

wobei Γ_{GG} die Gleichgewichtsbeladung der Oberfläche darstellt und k_s die sogenannte Ratenkonstante. Diese konzentrationsabhängige Ratenkonstante berücksichtigt die während der Assoziationsphase bereits stattfindende Dissoziation von gebundenem Rezeptor, so dass aus ihr die beiden kinetischen Konstanten k_a und k_d bei konzentrationsabhängigen Messungen mit

$$k_s = k_a \cdot c + k_d$$

Formel 4

über eine lineare Regression ermittelt werden können. Zur Veranschaulichung sind in Fig. 2 beispielhaft ein Satz berechneter Bindungskurven und die resultierenden Ratenkonstanten gezeigt.

Eine ausführliche Herleitung dieser Zusammenhänge ist in (Piehler 1997) zu finden.

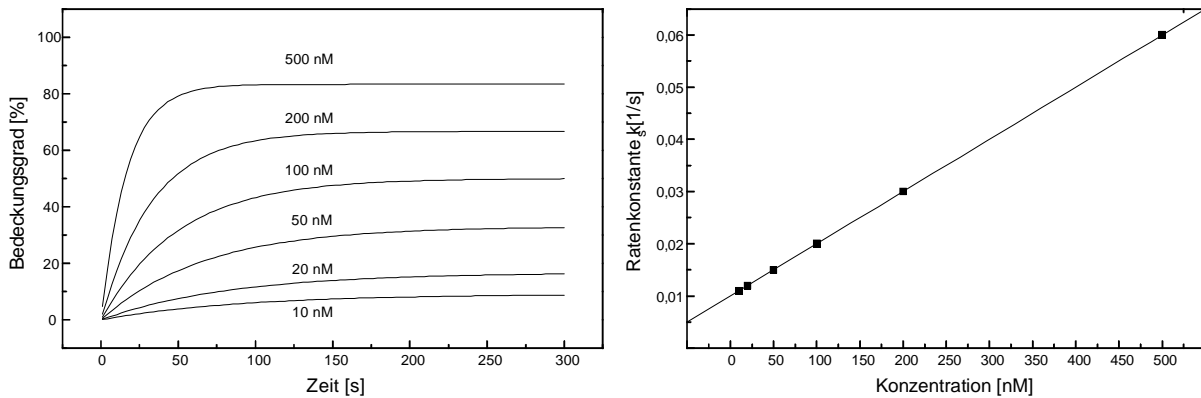


Fig. 2: Bestimmung der kinetischen Wechselwirkungsparameter an Sensor-Oberflächen: links ist der zeitliche Verlauf des Bedeckungsgrades bei der Bindung von Rezeptor in unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt ($k_a=10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; $k_d= 10^{-1}\text{s}^{-1}$). Rechts sind die Ratenkonstanten, die sich aus den Kurvenanpassungen mit Formel 3 ergeben, gegen die Konzentration aufgetragen. Aus diesem Sekundärplot sind die kinetischen Parameter über Steigung und Achsenabschnitt über Formel 4 zugänglich.

2.1.1.2 Bestimmung der Affinitätskonstanten in Lösung

Natürlich kann aus den kinetischen Konstanten auch die Affinitätskonstante K bestimmt werden. Da sich die Wechselwirkung an der Oberfläche jedoch von der ungestörten Wechselwirkung im freien Volumen unterscheiden kann, wird zur Bestimmung von K häufig anders vorgegangen:

Wählt man Bedingungen, unter denen die Wechselwirkung des Rezeptors mit der Oberfläche durch den Massentransport zur Oberfläche limitiert ist, also bei niedriger Rezeptorkonzentration in Lösung und hoher Ligandkonzentration an der Oberfläche, so wird die Bindung über die Fickschen Gesetze beschrieben. Im Durchfluss oder unter Konvektion erhält man für den Massentransport J_D an die Oberfläche nach dem 1. Fickschen Gesetz

$$J_D = D \cdot \frac{dc}{dx} = D \cdot \frac{c - c_s}{\delta} = k_D (c - c_s) \quad \text{Formel 5}$$

wenn man unter der Annahme einer Nernstschen Diffusionsgrenzschicht der Dicke δ den Konzentrationsgradienten dc/dx durch eine lineare Näherung beschreibt, wobei c_s die Konzentration direkt an der Phasengrenze ist. Da die Diffusionskonstante k_D bei konstanten Rahmenbedingungen wie Temperatur und Viskosität eine konzentrationsunabhängige Konstante darstellt, hängt der Massentransport an die Oberfläche lediglich von der Konzentration an bindungsfähigem Rezeptor in Lösung ab. Damit ist auch die Geschwindigkeit der Bindung an die Oberfläche

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = J_D \quad \text{Formel 6}$$

direkt von der Konzentration an freiem Rezeptor in Lösung abhängig. Befinden sich in der Probenlösung nicht nur Rezeptormoleküle, sondern auch Ligandmoleküle, so ändert sich auf Grund von Formel 1 die Konzentration an freiem Rezeptor c_R . Die Konzentration an c_R ergibt sich dabei für einen Rezeptor mit einer Bindungsstelle zu:

$$c_R = c_{0R} - c_{LR} = c_{0R} - \left(\frac{c_{0R} + c_{0L} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0R} + c_{0L} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0R} \cdot c_{0L}} \right)$$

Formel 7

Damit erhält man bei sogenannten Titrationsen, bei denen in mehreren Experimenten mit konstanter Rezeptorkonzentration die Ligandkonzentration variiert wird, Kalibrier- oder Titrationskurven aus denen durch Kurvenanpassung die Affinitätskonstante bestimmt werden kann. Beispielhaft ist ein berechneter Datensatz aus Oberflächenbeladung und daraus resultierender Kalibrierkurve in Fig. 3 gezeigt. Eine detaillierte Herleitung der Zusammenhänge findet sich bei Piehler *et al.* 1997.

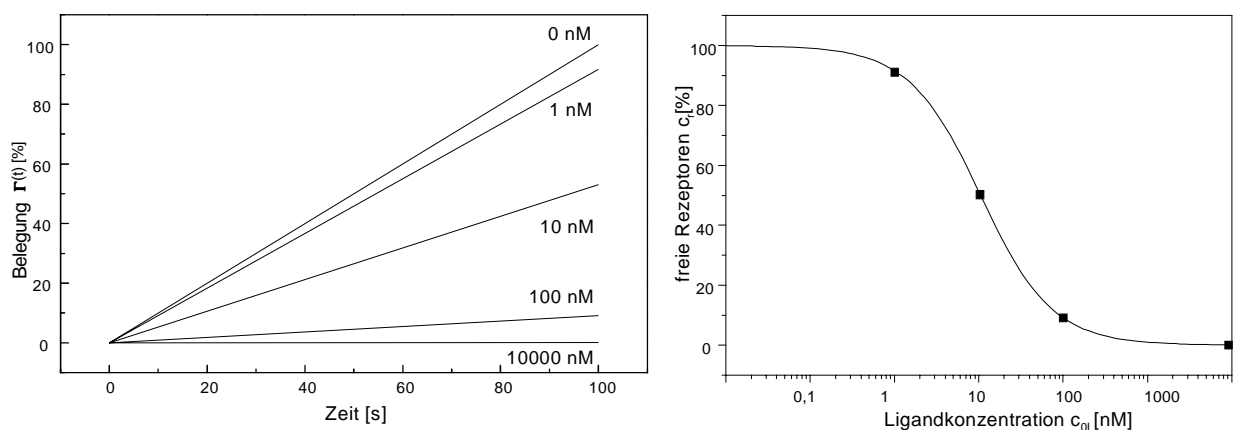


Fig. 3: Änderung der Oberflächenbeladung bei diffusionslimitierter Bindung bei einer Rezeptorkonzentration $c_{0R}=1$ nM, einer Affinitätskonstanten $K=10^8$ M⁻¹ und unterschiedlicher Ligandkonzentration. Die Kurvensteigung ist auf die Bindungsrate und damit auf den Massentransport bzw. auf die Konzentration an freiem Rezeptor in Lösung zurückzuführen. Aus der Titrationskurve (rechts) lässt sich die Affinitätskonstante durch Kurvenanpassung mit Formel 7 bestimmen.

2.2 Hochdurchsatzscreening oder High-Throughput Screening (HTS)

Werden sehr viele biomolekulare Wechselwirkungen gleichzeitig oder sequenziell untersucht, so spricht man von einem Hochdurchsatzscreening oder High-Throughput Screening (HTS). Dabei geht es in der Regel zuerst um die Frage, ob zwei Moleküle miteinander in Wechselwirkung treten, also der Identifizierung eines sogenannten Screening-Hits. Die quantitative Betrachtung der Bindung tritt häufig in den Hintergrund bzw. wird erst dann untersucht, wenn ein interessantes Wechselwirkungspaar gefunden wurde.

2.2.1 ENTWICKLUNG DES HTS

Die Molekularmedizin eröffnet mit der Untersuchung des grundlegenden molekularbiologischen Verständnisses von Krankheiten neue Wege zum Auffinden und Optimieren neuer Medikamente. Die Untersuchung der Signalübertragungswege auf molekularer Ebene führt dabei zur Identifizierung von Substanzen, die in einem Zusammenhang zur Erkrankung stehen. Nachdem solche biologischen Targets gefunden werden, beginnt in der Regel die Suche nach sogenannten Leitstrukturen, die eine spezifische Interaktion mit dem Target zeigen und deshalb zur kausalen Therapie genutzt werden können. Während die Wirksubstanzen früher direkt im Tierversuch oder an isolierten Organen getestet wurden, finden seit den 80er Jahren zunehmend die Prüfungen direkt an den isolierten Zielstrukturen, den pharmakologischen Targets, statt.

In den 90er Jahren wurde der Durchsatz dieser Verfahren durch die Laborautomation drastisch gesteigert und das Hochdurchsatzscreening (HTS) etabliert. Konnten früher ca. 100 Substanzen pro Labor und Tag auf Wirksamkeit geprüft werden, erlaubt das HTS das Testen von bis zu 100.000 Substanzen pro Tag. Bei noch höherem Probendurchsatz spricht man von ultra-HTS (u-HTS) mit dem in naher Zukunft ein Durchsatz von bis zu einer Million Proben pro Tag und Labor erreicht werden soll. Die Forderung, den Probendurchsatz immer weiter zu steigern, liegt in der Entdeckung immer neuer Targets und der wachsenden Zahl an zugänglichen Testsubstanzen begründet.

Während heute nur rund 400 molekulare Targets bei der Pharmakotherapie eine Rolle spielen, wird die Zahl der noch unbekanntem therapierelevanten Targets auf mindestens 5000 geschätzt. Diesen Schatz, den das menschliche Genomprojekt zugänglich machte, gilt es nun zu heben und unter Betracht der weltweit konkurrierenden Pharmakonzerne möglichst rasch auf pharmakologische Bedeutung und daraus folgende Therapiemaßnahmen zu testen. Gleichzeitig wachsen die Substanzbibliotheken, die für ein HTS genutzt werden können, dank den Methoden der kombinatorischen Chemie, die seit Anfang der 90 Jahre zur Verfügung stehen, mit unglaublicher Geschwindigkeit (Jung 1999).

2.2.2 REALISIERUNG DES HTS

2.2.2.1 Technische Realisierung

Dass eine solch enorme Probenzahl nicht manuell getestet werden kann, verdeutlicht die Tatsache, dass bei einem Durchsatz von 100.000 Proben pro Tag selbst bei kontinuierlichem Laborbetrieb für jeden Einzeltest weniger als 1 Sekunde für Durchführung und Auswertung

zur Verfügung stünde. Wie aber kann nun dieser unglaubliche Probendurchsatz realisiert werden? Heute arbeiten die meisten HTS-Anlagen vollautomatisch eine Vielzahl von Proben gleichzeitig ab (Houston *et al.* 1997). In der Regel werden die Testsubstanzen in Kavitätenplatten, sogenannten Deep-Well-Mikrotiterplatten (Deep-Well-MTP), in DMSO gelöst gelagert. Bei den gängigen Formaten befinden sich 96, 384 oder neuerdings bis zu 1536 Substanzen auf einer Platte. Aus diesen Vorratsplatten werden mit Hilfe von Pipettierautomaten sogenannte Tochterplatten hergestellt, die die für den Test gewünschten Substanzkonzentrationen enthalten. Die Pipettierautomaten übernehmen auch die Zugabe von Target und Reagenzien. Das Auslesen des Assay-charakteristischen Signals geschieht dann für alle Proben einer Mikrotiterplatte (MTP) simultan. Die ausgewerteten Signale werden mit Hilfe der Barcode-Markierung der MTP zugewiesen und dann abgespeichert. Durch intelligente Logistik- und Transportsysteme ist es möglich, während des Auslesens einer MTP bereits weitere Platten vorzubereiten, so dass auch längere Inkubations-, Wasch- oder Sedimentationsschritte den Absolutdurchsatz nicht herabsetzen. Um das HTS noch schneller zu machen und gleichzeitig die Kosten zu senken, werden zur Zeit höherparallele, miniaturisierte Plattformen entwickelt (Burbaum 1998, Harrison 1998). Dabei werden u.a. neue Entwicklungen in der Mikrostrukturierung (Roberts *et al.* 1997, Jakeway *et al.* 2000), Mikrofluidik (Kopp *et al.* 1997) und Mikrodosierung (Lemmo *et al.* 1998) genutzt.

2.2.2.2 Detektionsmethoden im HTS

Auf Grund des enormen Marktes, den das HTS in der pharmazeutischen Industrie eröffnete, wurden sehr schnell ganz unterschiedliche Detektionsprinzipien für das HTS entwickelt. Eine mögliche Einteilung kann wie folgt vorgenommen werden.

Radiometrische Methoden

Die ersten erfolgreichen Screeningmethoden basierten auf dem sehr empfindlichen Nachweis von radioaktiven Markern. Trotz der Vorhersagen, dass diese Methoden auf Grund der problematischen Handhabung von radioaktivem Material sehr schnell von fluoreszenzbasierten Tests ersetzt würden, sind noch heute zwischen 20-50% aller industriellen Screeninganwendungen radiometrische Assays. Die wichtigste Methode ist dabei schon seit Anfang der 90er Jahre der Scintillation Proximity Assay (SPA), bei dem die Bindung einer markierten Substanz an eine Oberfläche (Bead oder Mikrotiterplattenboden) dadurch nachgewiesen wird, dass der oberflächengebundene Radiomarker ein ebenfalls gebundenes Farbstoffmolekül zur Lichtemission anregt (z.B. Cook *et al.* 1996). Die

Forschungsschwerpunkte beim SPA liegen derzeit vor allem auf der Entwicklung neuer Detektoren und neuer SPA-Beads (Ramm 1999).

Homogene Fluoreszenzmethoden

Methoden, die auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals in einer Probenlösung beruhen, gehören zu den wichtigsten und am weitesten verbreiteten Screeningmethoden. Die Vorteile einer optischen Detektionseinheit und die hohe Empfindlichkeit, die mit solchen Methoden erreicht werden kann, ermöglichen ihren Einsatz im u-HTS durch massive Parallelisierung und Miniaturisierung (Oldenburg *et al.* 1998). Unter der Vielzahl an Messmethoden haben die Fluoreszenzanisotropie (FA), der Fluoreszenz Energie Transfer (FRET, Gauglitz 1999), der Zeitaufgelöste Energietransfer (TRET Pope *et al.* 1999) und die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS, z.B. Haupts *et al.* 2000, Moore *et al.* 1999) den größten Stellenwert bei den kommerziell verfügbaren HTS-Methoden. Während sich die fluoreszenzbasierten Methoden technisch sehr rasch entwickeln, scheint das Auffinden von neuen Fluoreszenzfarbstoffklassen derzeit ein Problem darzustellen (Hertzber *et al.* 2000), so dass sich die Forschung vor allem auf die Modifikation bereits vorhandener Farbstoffe konzentriert (z.B. Amersham 2001). Die Verwendung von Halbleiternanokristallen als Fluorophor könnte diese Probleme lösen (Bruchez *et al.* 1998, Chan *et al.* 1998).

Markierungsfreie Screeningmethoden

Markierungsfreie Methoden werden zur Zeit noch nicht für Routine-HTS-Anwendungen eingesetzt. Allerdings zeigen sich sowohl bei Methoden der optischen Detektion wie Oberflächenplasmonenresonanz (Biacore 1998) und Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS, Rothmund *et al.* 1999, Birkert *et al.* 2002) als auch bei der Massenspektrometrie Entwicklungen, die ein markierungsfreies HTS ermöglichen werden.

Zellbasierte Methoden

Zellbasierte Assays werden häufig mit Fluoreszenz- oder radiometrischer Detektion durchgeführt. Trotzdem werden die zellbasierten Assays oft als separates Gebiet betrachtet. In der Regel können die Informationen, die aus zellbasierten Assays erhalten werden, nicht durch einfache Bindungsassays zugänglich gemacht werden (Sundberg 2000). Solche, biologisch sehr komplexen Assays werden eingesetzt, um durch membrangebundene Rezeptoren initiierte Signaltransduktion zu verfolgen (Second Messenger Assay, Gonzales *et al.* 1999), das Verhalten von Transkription und Translation zu untersuchen (Reportergen Assay) oder das Wachstumsverhalten von Zellen bei Stimulation von außen zu beobachten

(Zellproliferations Assay). Der hohe Informationsgehalt, der teilweise aus solchen Assays gezogen werden kann, führte zur Einführung des Begriffes High Content Screening (HCS). Während bei klassischen Bindungsassays oftmals die Optimierung der Detektionsmethoden im Vordergrund steht, werden zellbasierte Assays meist von den molekularbiologischen Fortschritten geprägt (Silverman *et al.* 1998).

2.2.2.3 Datenauswertung im HTS

Oftmals werden die Daten im HTS zu Gunsten des hohen Probendurchsatzes nur qualitativ oder semiquantitativ ausgewertet. In der Regel wird nur untersucht, ob es sich bei der Probe um eine aktive Substanz handelt. Solche Proben werden als Hit oder Treffer bezeichnet. Nur diese Hits werden z.B. in einem Sekundärscreening weiteruntersucht, wobei erst dann die speziellen Bindungseigenschaften von Interesse sind. Die Qualität eines Screening-Assays drückt sich deshalb auch dadurch aus, wie viele der eigentlichen Hits nicht gefunden werden (falsch negativer Hit). Solche falsch negativen Hits sind besonders kritisch, da inaktive Proben bereits beim ersten Screening ausgesondert werden und solche falsch negativen Hits damit die Ausbeute an potentiellen Wirkstoffkandidaten verringern. Als falsch positive Hits werden dagegen Proben bezeichnet, die im Test zwar Signale einer aktiven Verbindung zeigen, die aber keine Wechselwirkung mit dem untersuchten Target eingehen. Falsch positive Hits werden in der Regel beim Sekundärscreening ausgesondert und sind deshalb deutlich unkritischer zu bewerten als falsch negative Hits. Gründe für falsch negative und positive Hits sind in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1 Gründe für falsch negative und falsch positive Hits.

Falsch negative Hits	Falsch positive Hits
<ul style="list-style-type: none"> •Die Testempfindlichkeit ist zu gering •Die Substanz ist nicht gelöst •Die Substanz ist instabil 	<ul style="list-style-type: none"> •Zu geringe Reproduzierbarkeit •Unspezifische Störungen des Testsignals durch Farbstoffe, toxische Substanzen, etc. •Unspezifische Wirkung auf das Zielmolekül durch das Lösungsmittel, etc.

2.2.3 KOMBINATORISCHE CHEMIE UND HTS

Die kombinatorische Chemie, die sich aus der kombinatorischen Peptidsynthese nach Furka (Furka *et al.* 1988) entwickelte, stellt einen der Pfeiler dar, auf denen sich das HTS stützt. Das Grundprinzip der kombinatorischen Chemie ist es, eine enorme Anzahl an unterschiedlichen

Substanzen gleichzeitig, unter einheitlichen Synthesebedingungen anstatt durch sequenzielle Einzelsynthese herzustellen (Jung 1999). Die Menge aller bei solchen Reaktionen entstandenen Substanzen wird als Substanzbibliothek bezeichnet. Die ersten Entwicklungen zielten darauf ab, möglichst viele unterschiedliche Substanzen in einer Reaktionslösung zu erhalten. Heute geht der Trend allerdings dahin, die Komplexität der Bibliotheken wieder zu reduzieren, da die Identifizierung von aktiven Substanzen in diesen Mischungen aus Tausenden von Einzelsubstanzen sehr schwierig und zeitaufwendig ist. Während man zu Anfang nur Mischungen von gleichzeitig hergestellten Substanzen in Lösung als Bibliothek bezeichnete, wird dieser Begriff heute auch für festphasengebundene, räumlich getrennte Substanzarrays gebraucht, wie sie unter anderem in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Grundsteine zur Synthese solcher Substanz-Arrays wurden 1991 von Fodor durch Synthesen auf Siliziumwavern gelegt (Fodor *et al.* 1991).

2.3 Sensoroberflächen

Werden Biomolekulare Wechselwirkungen mit Hilfe eines Biosensors bzw. über die Wechselwirkung eines Bindungspartners mit der Oberfläche eines Biosensors nachgewiesen, so stellt diese Oberfläche einen zentralen Punkt der Forschung dar. Dies gilt unabhängig davon, ob mit dem Sensor HTS-Studien, die meist nur eine geringe Aussagekraft über die Natur der Bindung liefern, oder sehr spezielle Untersuchungen, wie etwa die von Bindungskinetiken, untersucht werden sollen. Überall gilt es, Oberflächen zu schaffen, die geeignet sind, möglichst selektiv eine spezifische Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche zu detektieren. Dazu müssen die Biosensoroberflächen in der Regel mit einem der Bindungspartner belegt werden. In Abhängigkeit vom Sensormaterial, den Bindungspartner und von den gewünschten Anwendung steht dazu eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, auf die im Folgenden eingegangen wird.

2.3.1 MODIFIZIERUNG VON OBERFLÄCHEN

Biosensoroberflächen beruhen in der Regel auf metallischen oder oxidischen Oberflächen. Als Metalle werden häufig Edelmetalle wie Gold, Silber, Platin oder Palladium verwendet. Bei den oxidischen Oberflächen spielt das Siliziumdioxid eine übergeordnete Rolle. Um solche Oberflächen mit funktionellen Gruppen auszustatten und gleichzeitig die für die Messung biologischer Proben nötige Biokompatibilität zu erhalten, können unterschiedliche Methoden angewendet werden. Bei den Metallschichten wird dabei der Effekt ausgenutzt, dass sich auf ihnen z.B. mit funktionellen Thiolen spontan stabile Selbstanordnungen (SAM)

ausbilden (Nuzzo *et al.* 1983, Rickert *et al.* 1996, Duschl *et al.* 1996, Segal *et al.* 1996). Metalloxidschichten werden in der Regel über eine Silanisierung für weitere Modifikationen zugänglich gemacht. Oftmals werden sowohl Thiole als auch Silane mit funktionellen Polymeren weitermodifiziert. Diese sollen eine hohe Flexibilität und geringe unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen bewirken. Polymere, die auf Biosensoren Verwendung finden, stammen in der Regel aus der Affinitätschromatographie (Hermanson *et al.* 1992). Häufig werden Polyacrylamide (Bruck 1973), Polysaccharide (Agarose, Zellulose, Dextran, Chitosan; Elam *et al.* 1984, Mauzac *et al.* 1982, Löfas *et al.* 1990, Buckle *et al.* 1993, Piehler *et al.* 1999), Methacrylate (Polyhydroxyethylmethacrylat; Ratner *et al.* 1976, Pedley 1980) und in jüngster Zeit verstärkt auch Polyethylenglykole als Biosensorbeschichtungen eingesetzt (Bergström *et al.* 1991, Merrill *et al.* 1992, Sigal *et al.* 1996, Piehler *et al.* 2000).

2.3.2 SPEZIFISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON TRANSDUCEROBERFLÄCHEN

Zur Messung einer spezifischen Wechselwirkung müssen die Polymerschichten auf den Transducern mit einem der Bindungspartner funktionalisiert werden. Allgemeine Immobilisierungsverfahren lassen sich in fünf Hauptgruppen gliedern:

2.3.2.1 Rückhaltung hinter einer inerten Membran

Diese Methode wurde bereits bei den ersten Biosensoren benutzt (Clark *et al.* 1962). Dabei werden Proteine hinter einer Membran aus Zelluloseacetat, Polycarbonat oder Teflon in der Nähe der Transduceroberfläche festgehalten.

2.3.2.2 Adsorption

Eine Adsorption an der Oberfläche kann spezifisch oder unspezifisch erfolgen.

Spezifische Adsorption

Bei der spezifischen Adsorption werden Immobilisierungen mit Hilfe einer Affinitätsreaktion erreicht. Dazu muss eine Oberfläche vorhanden sein, die eine spezifische Erkennungsstruktur trägt. Damit lassen sich solche Methoden nur in Kombination mit anderen Verfahren einsetzen. Häufig wird die hochaffine Wechselwirkung von Avidin und Biotin zur nahezu irreversiblen Immobilisierung von biotinylierten Komponenten oder Avidinkonjugaten eingesetzt (Bayer *et al.* 1990). Auch Rezeptoren, die an definierte Bereiche der zu immobilisierenden Komponente binden, sind geeignet, z.B. Protein A (Langone 1982, Lu *et al.* 1996) oder anti-Fc-Antikörper zur Immobilisierung von IgG. Für rekombinante Moleküle

kann die Komplexbildung von His-Tag (vgl. Kap. 2.6) mit Übergangsmetallen (Ni, Zn) (Gershon 1995) oder die von Streptag zu Streptavidin (Skerra *et al.* 2000, Caparon *et al.* 1996) für eine orientierte Immobilisierung genutzt werden.

Unspezifische Adsorption

Die unspezifische Adsorption ist praktisch nur zur Immobilisierung von Proteinen oder DNA geeignet. Dazu werden lediglich eine wässrige Lösung der betreffenden Biomoleküle mit aktivem Material in Kontakt gebracht und danach nicht adsorbierte Moleküle abgewaschen (Hall 1995). Neben anorganischen Oberflächen wie Aktivkohle oder Aluminiumoxid sind auch organische Oberflächen wie Nitrocellulose (Denhardt 1966) oder Polylysin (Decher *et al.* 1994) als Träger geeignet.

2.3.2.3 Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien

Diese Methode ist vor allem zur Proteinimmobilisierung geeignet. Hierbei werden bifunktionelle Agenzien verwendet, mit denen Vernetzungen von Protein zu Protein und Träger erzielt werden. Insbesondere Glutaraldehyd wird häufig als vernetzendes Agenz eingesetzt. Es reagiert mit Aminogruppen des Lysins im Protein.

2.3.2.4 Einschluss in Matrices

Ein (Bio-)Molekül lässt sich in eine dreidimensionale Matrix einschließen, die mit einer Reihe verschiedener Polymerisationsmethoden hergestellt werden und unterschiedliche Eigenschaften aufweisen kann. Das Polymer kann ein inerter Träger sein oder auch selbst essentiell an der Transduktion des vom Analyten ausgehenden Signals beteiligt sein. Typischerweise werden als Gele Alginat, Carageenan, Kollagen, Gelatine, Agar oder Polyvinylalkohol genutzt (Scheller 1989).

Diesem Prinzip können auch die molekular geprägten Polymere (MIP) zugeordnet werden. Hierbei bilden die Polymere selbst die Erkennungsstruktur auf der Oberfläche. Dies wird erreicht, indem durch Zugabe von Templatmolekülen während der Polymerisation definierte Hohlräume erzeugt werden. (Wulff 1995, Hishiya *et al.* 1999). Werden solche Hohlräume auf monolagendicken Schichten erzeugt, so spricht man von „foot-printed-polymers“ (Mirsky *et al.* 1999).

Auch Systeme, bei denen ein Membranproteinen in eine Doppelschicht aus Phospholipiden eingelagert wird, kann dem Prinzip des Matrixeinschlusses zugeordnet werden (Ramsden *et al.* 1996, Pu *et al.* 1995).

2.3.2.5 Kovalente Bindung

Die kovalenten Methoden bieten durch eine große Anzahl von Kupplungsreaktionen vielfältige Möglichkeiten zur Immobilisierung von großen Biomolekülen und kleinen Liganden (Johnsson *et al.* 1991). Da hierbei hohe Stabilitäten und maßgeschneiderte funktionale Eigenschaften erreicht werden können, wird bei der Realisierung von Biosensoren bevorzugt auf eine chemische Modifikation der Transduceroberflächen zurückgegriffen (z.B. Löfas *et al.* 1990, Ahluwalia *et al.* 1992, Polzius *et al.* 1996, Bartlett *et al.* 1993).

Im folgenden soll auf die Möglichkeiten zur kovalenten Immobilisierung an Glasoberflächen näher eingegangen werden.

Aminogruppen

Die Möglichkeiten zur kovalenten Kupplung von Liganden mit einer Aminofunktion gehören zu den am besten untersuchten. Standardmethoden sind in Fig. 4 beschrieben. Vor allem die Immobilisierung über einen N-Hydroxysuccinimid-Aktivester findet breite Anwendung.

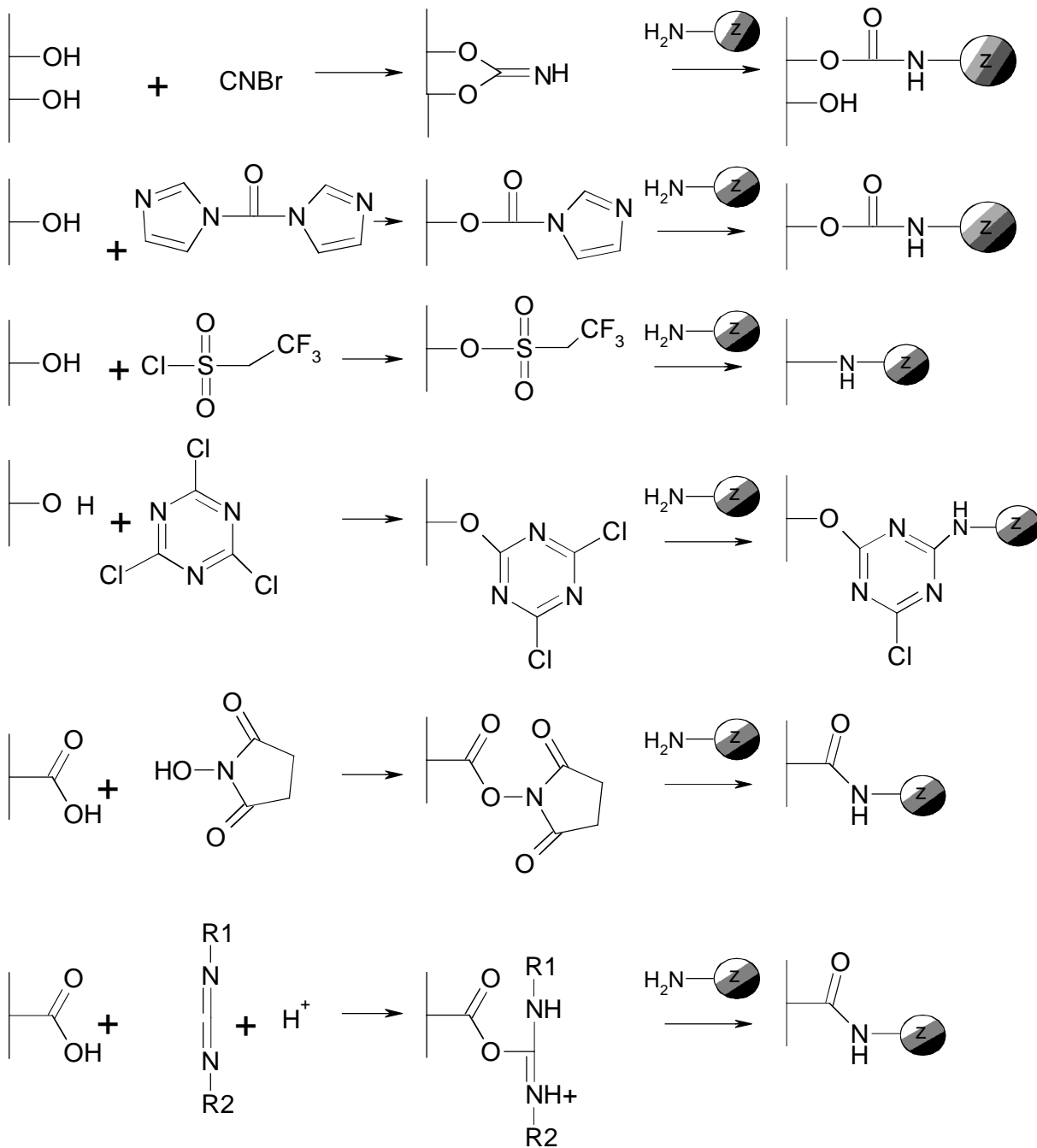
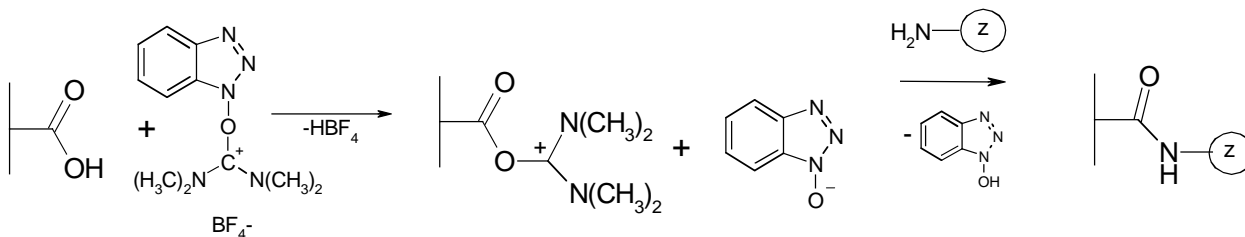


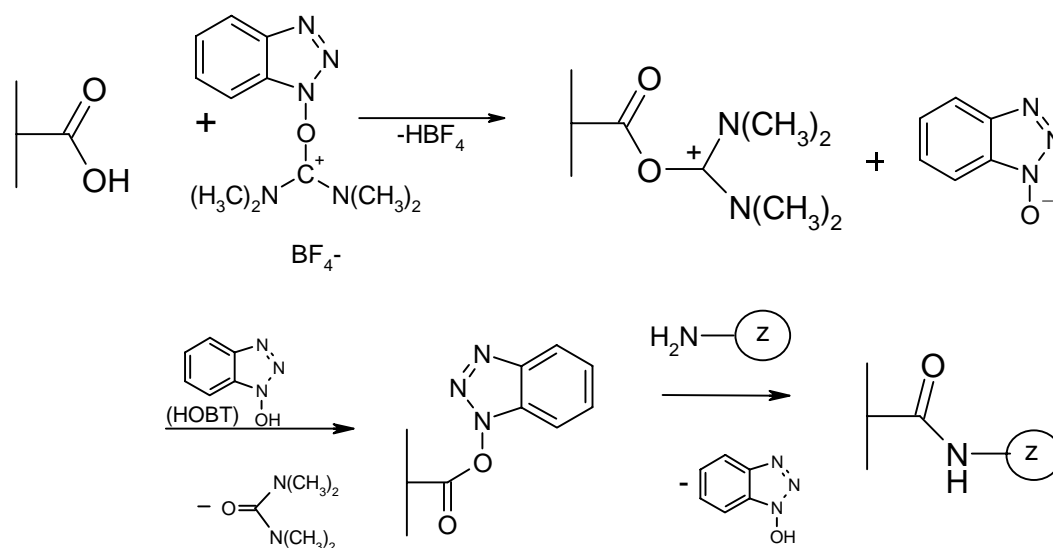
Fig. 4: Gängige Möglichkeiten zur Immobilisierung von Liganden mit Aminfunktion: Kupplung über CNBr; Aktivierung mit Carbodiimidazol; Aktivierung über Trifluoethansulfonsäurechlorid (Tresylchlorid); Kupplung über einen Triazinlinker; Aktivierung über N-Hydroxysuccinimid; Aktivierung über ein Carbodiimid (z.B. Diisopropylcarbodiimid, Dicyclohexylcarbodiimid, Ethyl-N,N-dimethylaminopropylcarbodiimidhydrochlorid).

Die Aktivierungsreagenzien lassen sich in 2 Gruppen einteilen: Solche, die nach der Kupplung ganz oder teilweise als Bestandteil bzw. Linker im System verbleiben wie z.B. die Triazingruppe (Arnostova *et al.* 2001) und solche, die nur intermediär an die Oberfläche gebunden werden. Erstere erfüllen neben der Kupplungsaufgabe zusätzlich die Funktion eines Spacers, um den Abstand zwischen Oberfläche und immobilisierter Komponente zu erhöhen.

Aktivester können auch durch Umsetzen mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) hergestellt werden (Birkert *et al.* 2000):



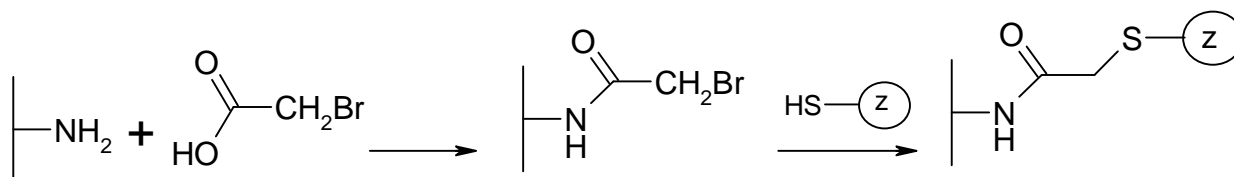
Setzt man neben TBTU noch zusätzliches HOBT (Hydroxybenzotriazol) ein, so ergibt sich ein neuer Reaktionsmechanismus, der dazu führt, dass die Reaktion deutlich weniger heftig abläuft:



Ein Vorteil dieser 2. Variante besteht vor allem beim Arbeiten mit Aminosäuren (Proteinen), denn dort wird dann eine Racemisierung am α -C-Atom weitgehend verhindert, indem die Reaktivität des H-Atoms am α -C-Atom vermindert wird.

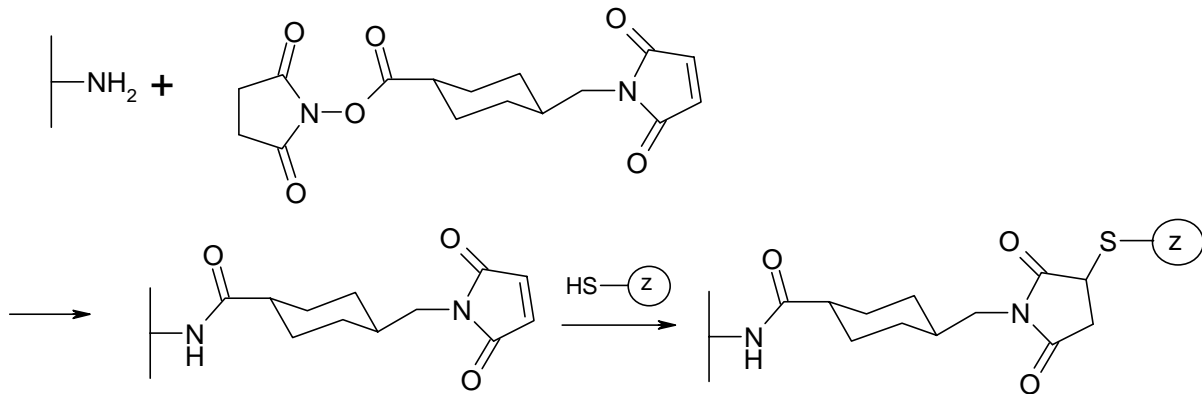
Thiolgruppen

Auf Grund der hohen Polarisierbarkeit eignen sich Thiolgruppen recht gut für nukleophile Substitutionen und lassen sich sehr selektiv kuppeln. Eine gebräuchliche Methode ist die Aktivierung von Aminogruppen mit Bromessigsäure (oder auch Iodessigsäure) und die anschließende Substitution mit dem Liganden:

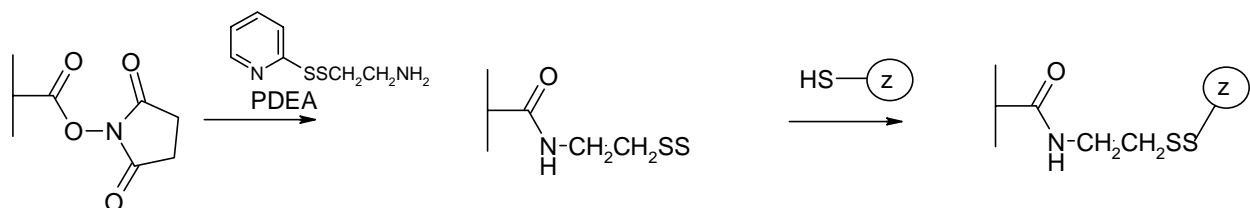


Sehr oft werden thioltragende Liganden auch über eine Maleinimidgruppe gekuppelt. (Imagawa *et al.* 1982, Yoshitake *et al.* 1982, Brown *et al.* 1988) Für gewöhnlich ist die

Maleinimidgruppe an einem Ende des heterobifunktionellen Kupplungsreagenz (Crosslinker) lokalisiert und die Ligandenbindung erfolgt in 2 Schritten, dem kovalenten Immobilisieren des Crosslinkers und der Bindung des Liganden. Als Standardcrosslinker wird wegen seiner hohen Stabilität und der langsamen Hydrolyse SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) verwendet (Hermanson *et al.* 1992):



Wenn alle Komponenten in wässriger Lösung verwendet werden können und die Reaktion innerhalb von wenigen Minuten abläuft, wie dies mit dem Kupplungsreagenz PDEA (2-(2-pyridinyldithio)ethanamin-Hydrochlorid) der Fall ist, können die Kupplungsreaktionen sogar mit zeitaufösenden Detektionsmethoden online verfolgt werden (Löfas *et al.* 1995):



Carboxylgruppen

Während Proteine nur selten über ihre Carboxylgruppen an die Oberfläche gebunden werden, besitzt diese funktionelle Gruppe vor allem bei der Immobilisierung von niedermolekularen Analytderivaten große Bedeutung, da bei der Immunisierung zur Gewinnung von Antikörpern die Analytderivate in der Regel über eine freie Carboxylgruppe an ein Trägerprotein gekuppelt werden (Liddell *et al.* 1996). Aus diesem Grund ist die Carboxylgruppe solcher Derivate meist nur wenig für die spezifische Erkennung verantwortlich und bildet die ideale Verankerungsposition zur Immobilisierung auf Biosensoren. Die Kupplung an aminofunktionalisierte Oberflächen erfolgt wie oben beschrieben z.B. über die Aktivierung mit einem Carbodiimid, wobei allerdings der Ligand zuvor aktiviert werden muss (z.B. über NHS oder TBTU).

Weitere Kupplungsreaktionen

Neben diesen gebräuchlichen Immobilisierungsstrategien steht noch eine Vielzahl von weiteren Methoden zur Verfügung. So können z.B. Alkohole an Epoxy-modifizierte Oberflächen gebunden werden und umgekehrt. Die Reaktion erfolgt dabei auf Grund der hohen Reaktivität spontan unter Öffnung des Dreirings (Mateo *et al.* 2000). Hydroxylgruppen können auch unter Verwendung von Divinylsulfon als Aktivierungsreagenz an Oberflächen mit Hydroxylgruppen gebunden werden (Lihme *et al.* 1986).

Carbonylgruppen, die z.B. bei der selektiven Oxidation der Zuckerreste in Glycoproteinen entstehen, lassen sich mit Hilfe von Hydraziden oder über eine reduktive Aminierung kuppeln.

Eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten eröffnet sich durch die Verwendung von Photolinkern (Collioud *et al.* 1993, Yan *et al.* 1994, Gao *et al.* 1995, Elender *et al.* 1996).

2.4 Biochemische Grundlagen der verwendeten Rezeptor-Ligand-Systeme

Im Folgenden werden die wichtigsten biochemischen Grundlagen der zur Oberflächenmodifizierung und im Screening eingesetzten Systeme kurz beschrieben. Für eine ausführliche Diskussion sei auf die angegebenen Literaturzitate verwiesen.

2.5 Avidin, Streptavidin und poly-Streptavidin

Ratten, die mit Hühnereiweiß als einziger Proteinquelle gefüttert wurden, zeigten einen Biotin Mangel (Boas 1927). Dies führte zur Entdeckung des Biotin-bindenden Glycoproteins Avidin (Eakin *et al.* 1941), das mit einem Anteil von 0,05 % im Hühnereiweiß vorkommt, und gleichzeitig zur Entdeckung der enorm starken Bindung zwischen diesen beiden Molekülen.

Avidin ist ein basisches Glycoprotein (68 kD) mit einem isoelektrischen Punkt von pI 10 (Green 1975). Es ist sehr gut löslich in Wasser und Salzlösungen und über große Bereiche pH- und temperaturstabil. Es setzt sich aus vier identischen Aminosäureketten mit jeweils 128 Aminosäuren und jeweils einem Kohlenhydratrest pro Aminosäurekette zusammen. Diese Reste sind über Asparaginseitenketten gebunden.

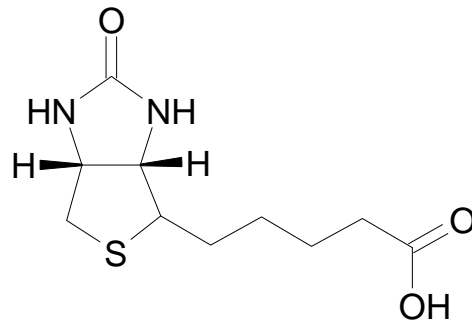


Fig. 5: Vitamin H (= Biotin).

Jedes Avidin hat vier Bindungstaschen für Biotinmoleküle, wobei jeweils zwei auf gegenüberliegenden Seiten des Glycoproteins liegen. Die Bindungskonstante des Avidin-Biotins-Komplexes liegt mit $K=10^{15} \text{ M}^{-1}$ deutlich über der von Antikörpern (ca. $K= 10^8 \text{ M}^{-1}$), so dass es sich dabei um eine der stärksten Affinitätsbindungen in der Biochemie handelt. Die Biotinbindungsaffinität wird auch durch extreme pH-Werte (pH 2-13) oder durch chaotrope Reagenzien (z.B. Guanidiniumchlorid) nicht gestört. Selbst bei 130°C bleibt der Biotin-Avidin-Komplex noch erhalten. Neben Avidin wurden noch andere biotinbindende Substanzen gefunden. Die wichtigste ist das Streptavidin, ein Protein, das von dem Bakterienstamm *Streptomyces avidinii* produziert wird. Struktur und Aminosäuresequenz ähneln derjenigen des Avidins. Streptavidin ist jedoch kein Glycoprotein, hat also keinen Kohlenhydratrest. Allerdings spielt auch im Avidin der Kohlenhydratrest bei der Biotinbindung keine Rolle (Hiller *et al.* 1987). Das Molekulargewicht von Streptavidin liegt mit $60\,000 \text{ g/mol}$ etwas unter dem des Avidins, der isoelektrische Punkt liegt im Gegensatz zum Avidin mit pI 5-6 im Sauren. Streptavidin kann ebenfalls 4 Biotineinheiten pro Molekül binden. Die Bindungskonstante liegt mit $K = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ in der Größenordnung von der des Avidins. Auch seine Größe ($4,5 \times 4,5 \times 5,8 \text{ nm}$, Spinke *et al.* 1993) ähnelt der des Avidins. Poly-Streptavidin, das ähnliche Bindungseigenschaften wie Streptavidin aufweist, wird durch Quervernetzen aus Streptavidin gewonnen.

Fig. 6 zeigt die Struktur des Streptavidin-Biotin-Komplexes und die Bindungsverhältnisse in einer Bindungstasche. Dabei sind die für die Bindung hauptsächlich verantwortlichen Tryptophanseitenketten und das Biotinmolekül als Strukturformel eingezeichnet.

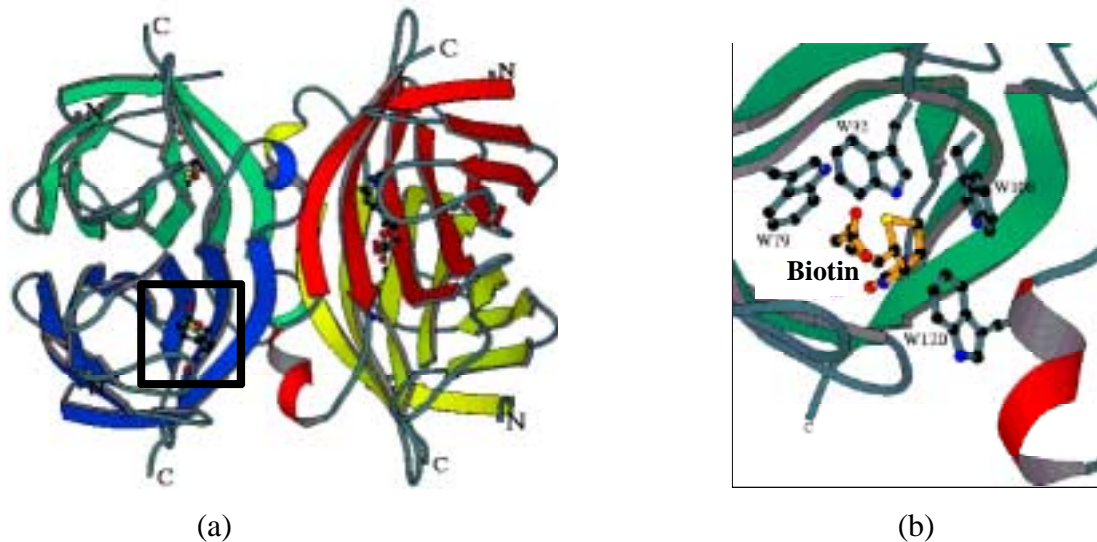


Fig. 6: (a) Struktur des tetrameren Streptavidins mit vier gebundenen Biotin-Molekülen. (b) Ausschnitt aus (a): Struktur und Bindungsverhältnisse in einer der 4 Bindungstaschen. Tryptophanseitenketten sind mit W79, W92, W108 und W120 bezeichnet (freundlicherweise von Dr. S. Freitag, Washington, zur Verfügung gestellt).

Das Biotin wird ideal von Streptavidin und Avidin umklammert, wobei lediglich das carboxyterminale Ende nicht zur Bindung beiträgt und somit zur Konjugierung von Biotin mit anderen (Bio-)Molekülen zur Verfügung steht. Um die Affinität nicht zu beeinflussen, sind lineare Spacermoleküle nötig. Diese ermöglichen es dem Biotin, entsprechend tief in das Streptavidin- oder Avidinmolekül einzudringen und das konjugierte Molekül an der Proteinaußenseite zu präsentieren. Die vielfältigen Möglichkeiten zur Modifizierung der Carboxylgruppe des Biotins führten zu der enormen Anwendungsbreite, die das System Biotin/Avidin heute im biochemischen, biologischen und klinischen Bereich besitzt (Wilchek *et al.* 1984). Heute werden Antikörper, Proteine, Oligo- und Polynucleotidstränge standardmäßig mit Biotin markiert (Guesdon 1992, Bayer 1980, Pfannschmidt *et al.* 1998). Dabei sind auch Biotinylierungen *in vivo* möglich (Smith *et al.* 1998). Auch für kleinere organische Moleküle gibt es Möglichkeiten zur Biotinylierung. Somit stehen für Nachweisverfahren, die auf dem Avidin-Biotin-System beruhen, eine große Anzahl von Testsystemen zur Verfügung.

2.6 His-Tag

Der Histidin-Tag (His-Tag) wurde von der Firma Hoffmann-LaRoche patentiert und dient in der Molekularbiologie vor allem zur Aufreinigung von Proteinen mittels Metallaffinitätschromatographie (engl.: Immobilized Metal Affinity Chromatography; IMAC) (Hochuli *et al.* 1987, Minning 1999, Enzelberger 1999). Beim His-Tag handelt es sich um

eine Aneinanderreihung von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen (Porath *et al.* 1975), die auf molekularbiologischem Weg an das zu reinigende Protein angefügt wird. Er ist der derzeit am häufigsten verwendete Tag zur Proteinreinigung und wird oftmals schon in kommerzielle Expressionsvektoren integriert. Mit dem His-Tag wurden bereits eine Reihe industriell sehr wichtiger Proteine aufgereinigt, z.B. die Reverse Transkriptase von HIV-1 (Lee Grice *et al.* 1990) oder Onkostatine M (Sporeno *et al.* 1994). Die Funktionsweise der His-Tag-IMAC ist in Fig. 7 gezeigt. Auf der Säule wird NN-Bis-(carboxymethyl)-L-lysin Hydrat (Nitrilotriacetic acid, NTA) oder ein NTA-Derivat gebunden und dieses mit Ni^{2+} -Ionen komplexiert. Die Bindung einer Histidinkette an diesen Komplex ist spezifisch und recht stabil. Damit wird erreicht, dass sich nur das mit dem Tag exprimierte Protein auf der Säule anreichert. Durch Verdrängung mit Imidazol kann das gebundene Protein anschließend schonend eluiert werden. Mit einer Ethylendiamin-tetraessigsäure-(EDTA)-Lösung, die als Komplexbildner für das Nickelion fungiert, lässt sich die Säule wieder komplett regenerieren.

Die Strategie, His-Tag Proteine über Nickelchelatkomplexe zu immobilisieren, wird mittlerweile auch zur gerichteten Proteinnanbindung auf Biosensoren genutzt. Dabei entspricht das Immobilisierungsprotokoll prinzipiell dem einer Affinitätsreinigung. Erfolgreiche Untersuchungen auf Goldoberflächen (Gershon *et al.* 1995, Sigal *et al.* 1996a) führten zur kommerziellen Einführung eines NTA-Chips durch die Firma BIACORE (BIACORE 2001, Nieba *et al.* 1997) und damit auch zu einer intensiveren Untersuchung dieses Systems mit anderen Methoden wie z.B. AFM. (Conti *et al.* 2000, Kienberger *et al.* 2000).

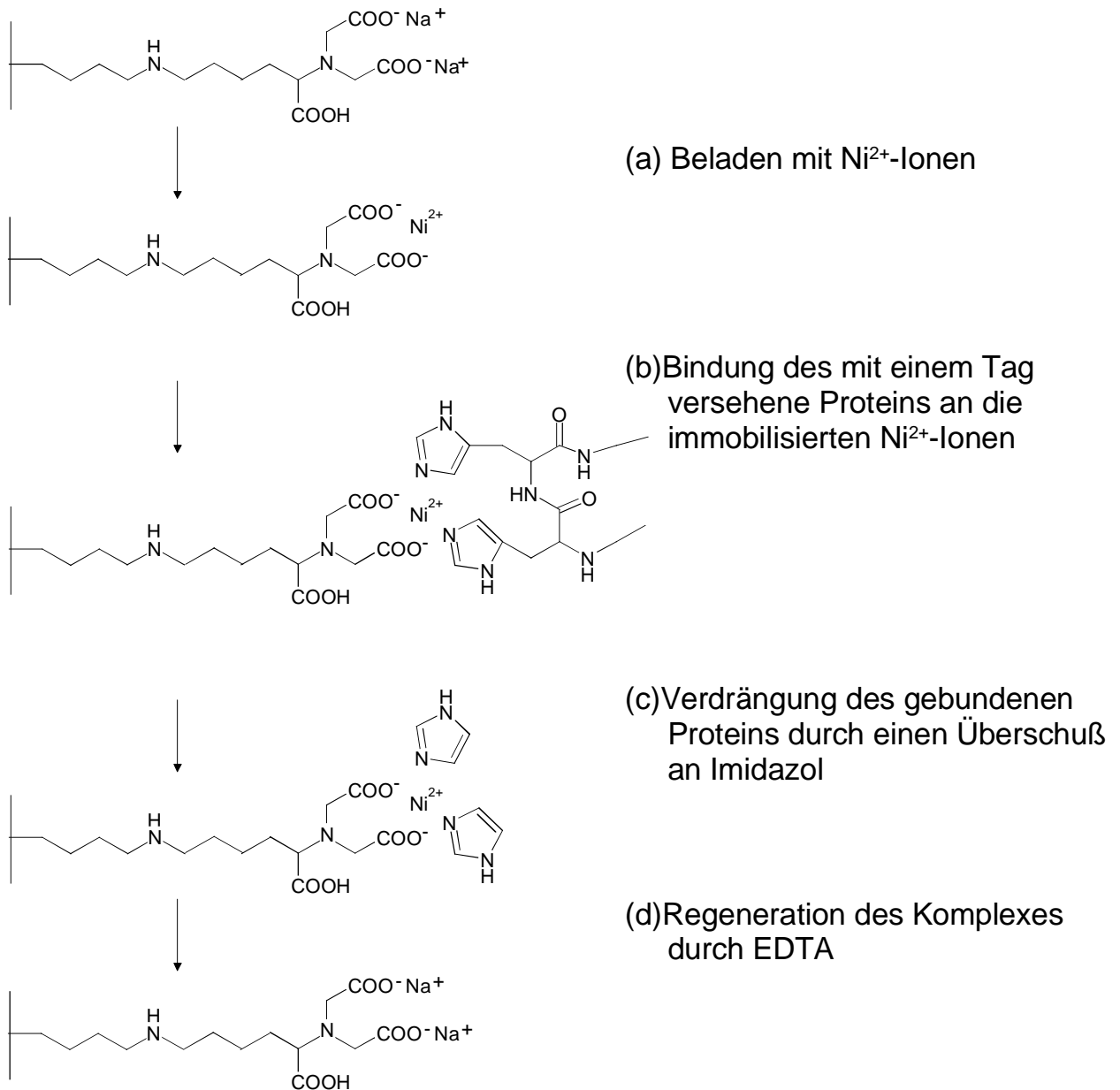


Fig. 7: Schematischer Ablauf einer IMAC über die Wechselwirkung des His-Tag mit dem oberflächengebundenen Ni^{2+} -Komplex: Nach Beladen mit dem Metallion wird nicht gebundenes Nickel ausgewaschen und anschließend Proteinprobe aufgetragen. Nur Proteine, die eine hohe Affinität zum Metall aufweisen, beispielsweise solche mit einem His-Tag, werden gebunden und anschließend durch Imidazol oder durch Absenken des pH-Wertes eluiert. Anschließend wird die Säule durch Komplexierung des Metallions durch EDTA wieder regeneriert.

2.7 Thrombin

Eines der in dieser Arbeit untersuchten „Targets“ war die Serinprotease Thrombin, ein 34 kDa (beim Rind 40 kDa) großes Protein, bestehend aus zwei Untereinheiten (Fig. 8a), von denen eine dem Pankreasenzym Trypsin ähnelt. Thrombin katalysiert die Spaltung von Fibrinogen in das aktive Fibrin und stellt damit den letzten Schritt in der Blutgerinnungskaskade dar.

Es besitzt ein aktives Zentrum sowie eine weitere exo-site. Letztere ist positiv geladen. Sie bindet das Fibrinogen und präsentiert es dem aktiven Zentrum, das dann spezifisch Arginin-Glycin-Bindungen spaltet (Dodt 1995). Das auch als Faktor II der Blutgerinnung bekannte Enzym 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.

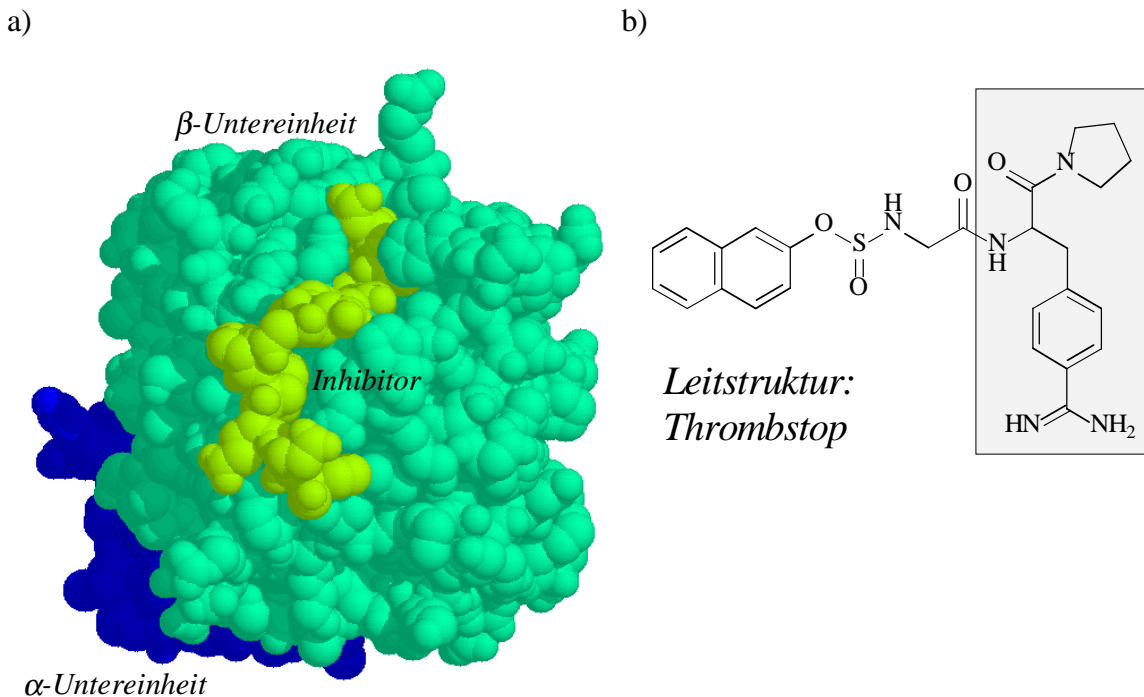


Fig. 8: a) Kalottenmodell von Thrombin und einem Inhibitor (Quelle Tulinsky A. und KrishnanR. 1996 PDB-Datenbank), b) Struktur eines Thrombininhibitors, der als Leitstruktur für die untersuchten Inhibitoren diente.

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).

Fig. 8b zeigt die Struktur eines im Gegensatz zum Antithrombin III niedermolekularen Inhibitors, das Thrombstop, das als Leitstruktur für die Untersuchungen in dieser Arbeit fungierte (Klingler *et al.* 1996). Der graumarkierte Teil des Moleküls bindet dabei in die positiv geladenen Bindungstasche des Thrombins. Der aromatische Rest übernimmt dabei den Part, den der Guanidinrest des sonst im Substrat enthaltenen Arginins einnimmt.

2.8 1,3,5-Triazine

1,3,5-Triazine wurden in der vorliegenden Arbeit in Hinblick auf eine anzustrebende Kopplung von kombinatorischer Festphasensynthese und markierungsfreier Detektion hin untersucht. Dabei handelte es sich bei diesem System vorwiegend um ein Modellsystem, mit dem die Machbarkeit einer solchen Kopplung gezeigt werden sollte. Da Triazine in der Pharmakologie und in der Umweltanalytik auch im Hinblick auf Screeningmethoden sehr intensiv bearbeitet werden, soll hier trotzdem ein kurzer Abriss ihrer Bedeutung gegeben werden.

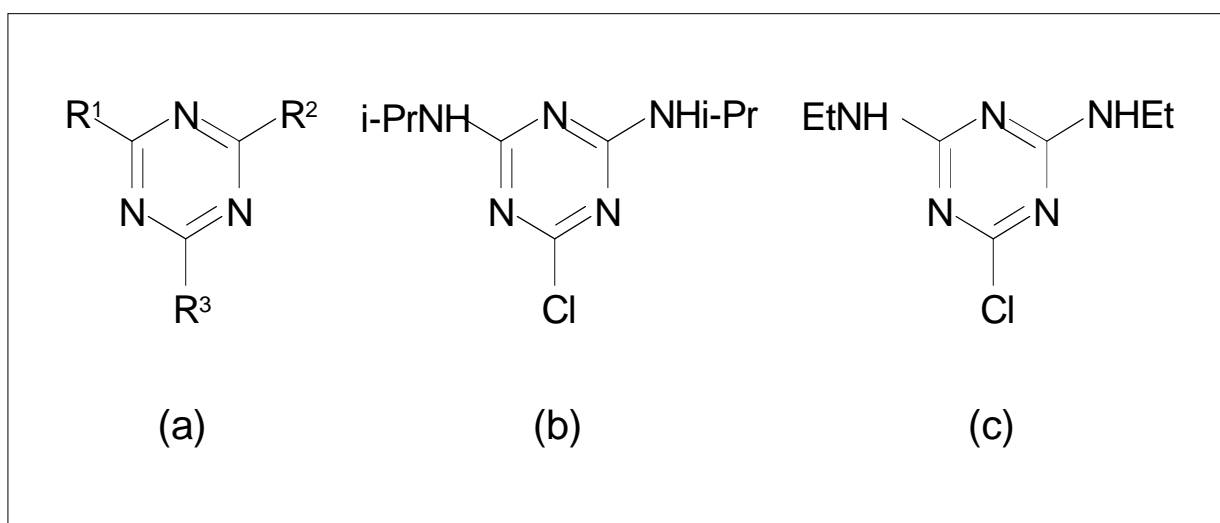


Fig. 9: Allgemeines Schema eines 1,3,5-Triazines (a) sowie zwei wichtige Vertreter aus der Gruppe der Herbizide: Atrazin (b) und Simazin (c).

Verschiedene Pharmaka besitzen eine 1,3,5-Triazin-Struktur in ihrem Grundgerüst. Sie dienen z.B. als Medikament gegen Sauerstoffmangel im Blut (Payen *et al.* 1996) oder als Krebstherapeutikum (Jarman *et al.* 1993). Auch Anwendungen zur Behandlung von HIV Infektionen wurden bereits untersucht (Kukla *et al.* 1999).

Daneben werden Triazine weltweit in großem Umfang als Herbizide eingesetzt und spielen deshalb in der Agrochemie und auf Grund ihrer Toxizität und langen Haltbarkeit auch im Bereich der Umweltanalytik eine wichtige Rolle. Zwei der wichtigsten Verbindungen sind dabei Atrazin und Simazin. Atrazin ist das in den USA und Europa am weitesten verbreitete

Herbizid. Allein in Europa beträgt der jährliche Verbrauch über 2000 Tonnen (Fielding *et al.*, 1992). Auf Grund der Stabilität dieser Substanzen und deren hoher Löslichkeit (für Atrazin 33 mg/l) und Mobilität in Oberflächen- und Grundwasser sind sie die am häufigsten nachgewiesenen Pestizide im Trinkwasser (Barceló *et al.* 1997).

Die Funktionsweise dieser Herbizide beruht auf der Störung der Photosynthese von Pflanzen, indem sie den lichtinduzierten Elektronentransfer von Wasser zu NADP unterbrechen.

Triazine werden mittlerweile auch als Kupplungsreagenzien für Aminosäuren (Kaminski 1985, Mansala *et al.* 1999), als Reaktivfarbstoffe (Tappe *et al.* 1993), optische Aufheller (Siegrist *et al.* 1993), Sonnenschutzmitteln (Haase *et al.* 1998) sowie als trifunktionelle Scaffolds für die Synthese von konformativ stabilisierten Proteinen aus synthetischen Peptiden (Thamasebbi *et al.* 1998) benutzt.

Als Folge der genannten Anwendungen besteht ein großes Interesse in der kombinatorischen Synthese von Triazinen. Methoden einer Bibliothekssynthese in Lösung wurden z.B. von Falorni (Falorni *et al.* 1998) und Gustafson (Gustafson *et al.* 1998) vorgestellt. Stankova (Stankova *et al.* 1996) erstellte eine Triazin Bibliothek durch sukzessive Substitution der Chloratome an fester Phase, wobei die Kupplung an die Oberfläche über aminosäuremodifizierte Cyanurchloride durchgeführt wurde. Mit 20 Aminosäuren und 50 Aminen als Bausteine wurde dabei eine Bibliothek von 12.000 Substanzen erstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese von Stankova auf Glasoberflächen übertragen.

2.9 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor

Protein Kinasen repräsentieren 2% des menschlichen Genoms, was einer geschätzten Menge von 200 unterschiedlichen Proteinen entspricht (Stryer 1990). Sie sind in unterschiedliche Signalkaskaden involviert, die unter anderem das Zellwachstum, die Metabolisierung und die Apoptose regulieren.

Der Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-Rezeptor) ist eine einzelne Polypeptidkette, die die Plasmamembran durchspannt. Der cytosolische Teil enthält eine Tyrosin-Kinase-Domäne und Tyrosinreste, die autophosphoryliert werden. Der aminoterminal Bereich enthält die Bindungsstelle für den Epidermalen Wachstumsfaktor EGF. Durch das Binden von EGF an den Rezeptor wird eine Signalkaskade initiiert und die Zelle zum Wachstum angeregt (Heimbrook *et al.* 1997). Dabei wirkt der EGF-Rezeptor als Enzym, das die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Zielproteinen katalysiert. Zusätzlich phosphoryliert sich der EGF-Rezeptor selbst. Die Autophosphorylierung steigert die

Fähigkeit, Tyrosinreste in Zielproteinen zu phosphorylieren und lässt den EGF-Rezeptor selbst dann angeschaltet, wenn keine Aktivierung mehr erfolgt. Desaktiviert wird er durch Proteinkinasen A und C. Diese phosphorylieren Serin- und Threoninreste des Rezeptors.

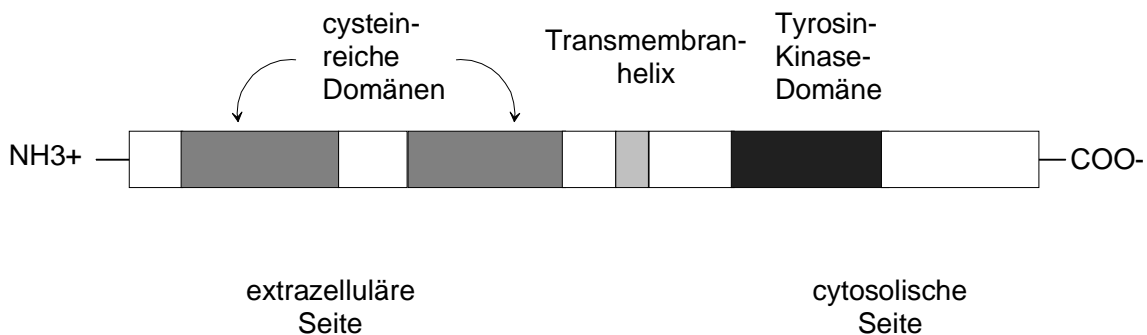


Fig. 10: Der Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-Rezeptor) ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Hormonbindungsstelle und einer cytosolischen Tyrosin-Kinase-Domäne.

Der EGF-Rezeptor ist in verschiedenen bösartigen Tumoren überexprimiert oder hochreguliert (Salomon *et al.* 1995). Seine Blockade wurde deshalb als Krebs-Therapie vorgeschlagen (Ciardiello *et al.* 1999) und macht ihn zu einem wichtigen Target in der Krebsforschung. Verschiedene EGF-Rezeptor Inhibitoren wurden bereits gefunden (z.B. von Fan *et al.* 1998 und Buchdunger *et al.* 1995). Durch gezieltes Screening von großen Substanzbibliotheken hofft man derzeit, neue Leitstrukturen zu finden und damit spezifische, hochwirksame Pharmaka zur Krebstherapie entwickeln zu können.

2.10 Grundlagen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie und deren Parallelisierung

2.10.1 REFLEXION UND TRANSMISSION DES LICHTES

Das Phänomen der Ausbreitung von Energie in Form von Wellen mit einem elektrischen und einem magnetischen Feldvektor wird als elektromagnetische Strahlung bezeichnet. Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie wird in der Spektroskopie zur Untersuchung von Molekül- und Festkörpereigenschaften genutzt. Im Vakuum breitet sich die elektromagnetische Welle mit Lichtgeschwindigkeit aus.

$$c = v \cdot \lambda$$

Formel 8

Für die Beschreibung der Wechselwirkung von Licht mit Materie, speziell für die Vorgänge an planaren Grenzfläche, sind, unter Vernachlässigung der Absorption, die Reflexion und die Transmission von Interesse. Dabei sind drei Gesetze aus der geometrischen Optik von Bedeutung:

1. Der Einfallswinkel entspricht dem Ausfallswinkel des reflektierten Teilstrahls.

$$\theta_i = \theta_r \quad \text{Formel 9}$$

2. Für die Winkel von einfallendem und transmittiertem Strahl zur Flächennormalen gilt mit dem Brechungsindex n :

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t \quad \text{Formel 10}$$

3. Die Wellenvektoren der Teilstrahlen liegen in einer Ebenen, die von der Flächennormalen und dem einfallenden Strahl aufgespannt wird (Einfallsebene). Schematisch sind die Gegebenheiten in Fig. 11 gezeigt.

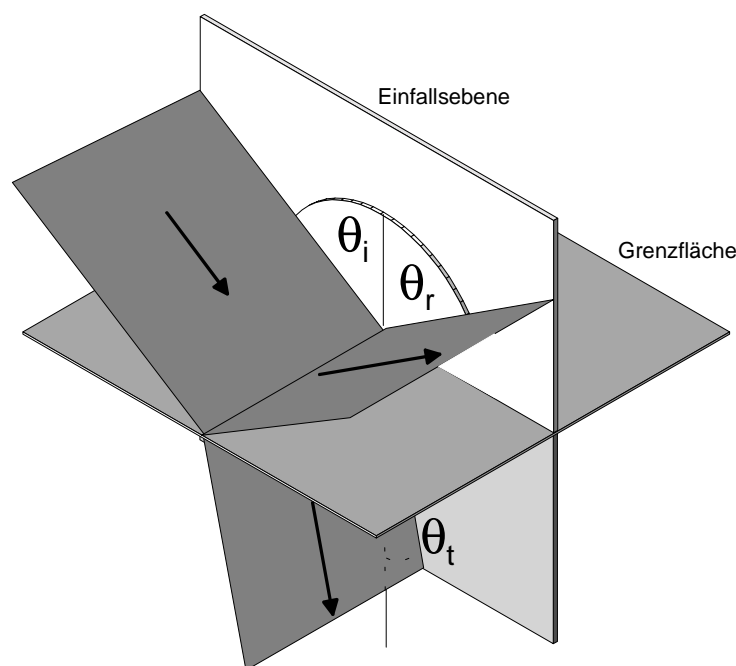


Fig. 11: Reflexion und Transmission von Licht an einer Grenzfläche

Grundlage zur Beschreibung der Reflexion sind die Maxwell'schen Gleichungen (Hecht 1989, Bergmann und Schaefer 1993). Der Anteil der reflektierten Strahlung ergibt sich in Abhängigkeit von Einfallswinkel und Brechungsindizes. Bezogen auf die Amplitude der einfallenden Welle mit einem Reflektivitätskoeffizienten r ergibt sich die relative Amplitude in Abhängigkeit vom Schwingungszustand des elektrischen Feldes relativ zur Einfallsebene aus den Fresnelschen Gleichungen. Für einen senkrecht zur Einfallsebene polarisierte Strahl gilt für nicht-absorbierende Medien

$$r_{\perp} = \frac{E_{\perp r}}{E_{\perp i}} = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_0 \cos \theta_0}{n_1 \cos \theta_1 + n_0 \cos \theta_0} \quad \text{Formel 11}$$

und für einen parallel polarisierten Strahl gilt

$$r_{\perp} = \frac{E_{=r}}{E_{=i}} = \frac{n_0 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_0}{n_0 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_0}$$

Formel 12.

2.10.2 REFLEXION AN DÜNNEN SCHICHTEN

Bei Mehrschichtsystemen können unter Berücksichtigung der Fresnelkoeffizienten der einzelnen Phasengrenzen die Gesamtrefektivitäten über eine vektorielle Addition berechnet werden. Randbedingungen für die Vektoraddition sind ein paralleler Strahlengang, ideal transparente Schichten und die vollständige Kohärenz des reflektierten Lichtes. Bei Schichtdicken, die kleiner sind als die Kohärenzlänge, ergeben sich Interferenzeffekte (Fig. 12).

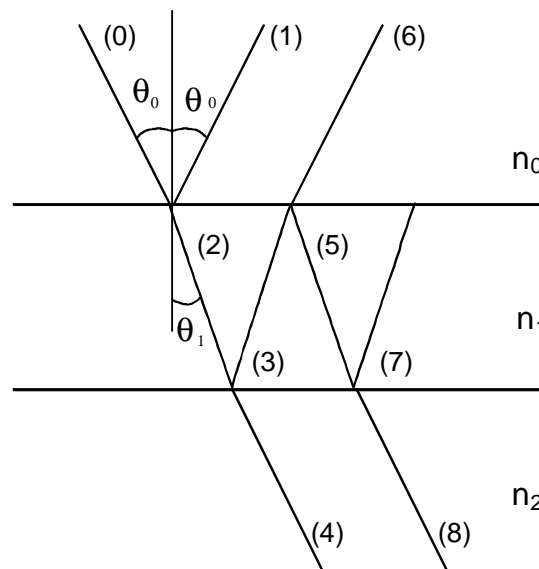


Fig. 12: Mehrfachreflexion an einer planparallelen Schicht.

Bei geringen Reflektivitäten müssen 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 (Reflexion an der Grenzfläche n_0/n_1) und r_2 (Reflexion an der Grenzfläche n_1/n_2) ergibt sich unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung δ des zweiten Teilstrahls der Gesamtreflexionskoeffizient R :

$$R = \frac{r_1 + r_2 e^{-2i\delta}}{1 + r_1 r_2 e^{-2i\delta}}$$

Formel 13

Für kleine Reflexionskoeffizienten kann der zweite Summand im Nenner vernachlässigt werden. Bei senkrechtem Einfall und geringen Reflektivitäten ergibt sich für eine Schicht der Dicke d_1 und des Brechungsindex n_1 unter Berücksichtigung eines Phasensprungs ϕ beim Übergang vom optisch dünneren ins dichtere Medium für die Phasenverschiebung δ

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}, \quad \text{Formel 14}$$

da der zusätzliche Lichtweg des zweiten Teilstrahls der zweifachen optischen Schichtdicke $n_1 d_1$ entspricht. Damit erhält man für die reflektierte Intensität bei Interferenz der reflektierten Teilstrahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2 abhängig von der Wellenlänge λ :

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_1 d_1 + \phi}{\lambda}\right) \quad \text{Formel 15}$$

D. h. man erhält ein spektrales Interferenzmuster in Abhängigkeit von der *optischen Schichtdicke* $n_1 d_1$, die sich für den Fall einer einzelnen Schicht eindeutig aus der Position der Extrema bestimmen lässt. In Fig. 13 sind die Interferenzspektren für zwei unterschiedliche optische Schichtdicken schematisch gezeigt.

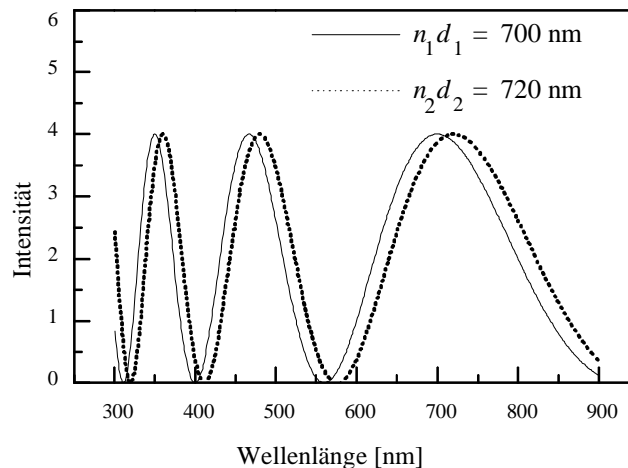


Fig. 13: Interferenzspektren bei Reflexion an dünnen Schichten.

2.10.3 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS)

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie beruht auf der zeitaufgelösten Detektion der spektralen Veränderungen im reflektierten Licht. Hierdurch kann z. B. das Quellen von Polymerfilmen bei Sorption von organischen Stoffen (Gauglitz *et al.*; 1993, Kraus 1993) und die Wechselwirkung von Biomolekülen mit an einer Oberfläche immobilisierten Interaktionspartnern in Submonolagen untersucht werden (z. B. Brecht *et al.*, 1992, Piehler *et al.* 1999).

Dabei wird in der Praxis die Lage eines Extremums des Interferenzspektrums aus Fig. 13 zeitaufgelöst verfolgt.

Aus Formel 15 folgt dabei für den vereinfachten Fall des senkrechten Lichteinfalls ($\phi=0$) als Bedingung für ein Maximum:

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Max} \quad m_{Max} = 1, 2, 3, \dots \quad \text{Formel 16}$$

und für ein Minimum:

$$\frac{2nd}{\lambda} = m_{Min} \quad m_{Max} = 1/2, 3/2, 5/2, \dots \quad \text{Formel 17.}$$

Damit lässt sich aus der zeitlichen Verfolgung der Position eines Extremums direkt der zeitliche Verlauf der optischen Schichtdicke ermitteln. Analog kann unter Berücksichtigung des Einfallswinkels ϕ in Formel 15 auch bei einem schrägen Lichteinfall die optische Schichtdicke verfolgt werden.

Bei Systemen wie der Anlagerung von Proteinen an entsprechend modifizierte Oberflächen wird durch den Anlagerungseffekt selbst eine Schicht erzeugt, die deutlich dünner ist als die Wellenlänge des zur Detektion verwendeten Weißlichts (1-50 nm) (Brecht *et al.* 1994). Mit Weißlicht können solche Schichten nicht direkt detektiert werden. Deshalb werden als Interferenzschichten Schichtsysteme aus 330 nm SiO₂ mit einer zusätzlichen reflexionsverstärkenden Schicht aus 10 nm Ta₂O₅ verwendet, auf der die Adsorption und Desorption von Proteinschichten nachweisbar ist. Schematisch ist ein solches System aus Trägerplattform (zur Stabilisierung des Transducers), anorganischer Interferenzschicht und Proteinschicht in Fig. 14 gezeigt.

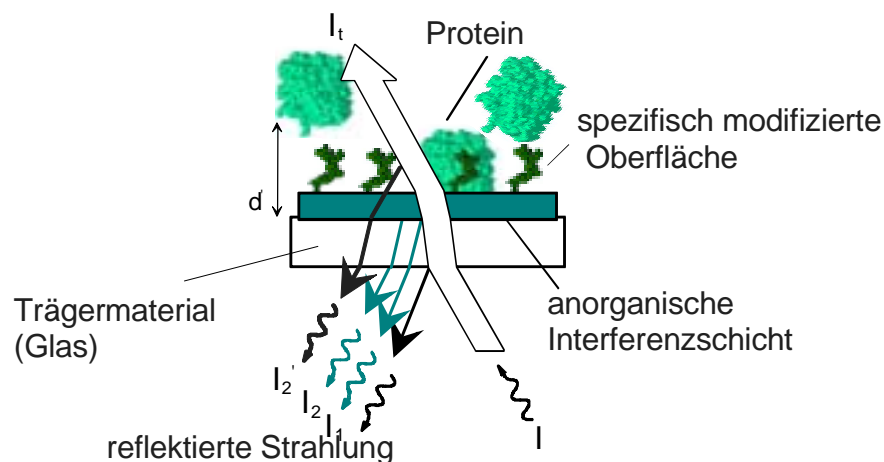


Fig. 14: Messprinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie.

2.10.4 PARALLELISIERUNG VON RIFS

Um einen für das HTS ausreichenden Durchsatz zu erzielen, muss die RIFS massiv parallelisiert werden. Für ein hochparalleles System sind Ansätze wie die Verwendung eines gegabelten Lichtleiters (Schmitt *et al.* 1997) wenig geeignet.

Mit einem bilderfassenden System, wie es in Fig. 15 gezeigt ist, sind hingegen hochparallele Messungen mit 96, 384 oder mehr Einzelkanälen möglich.

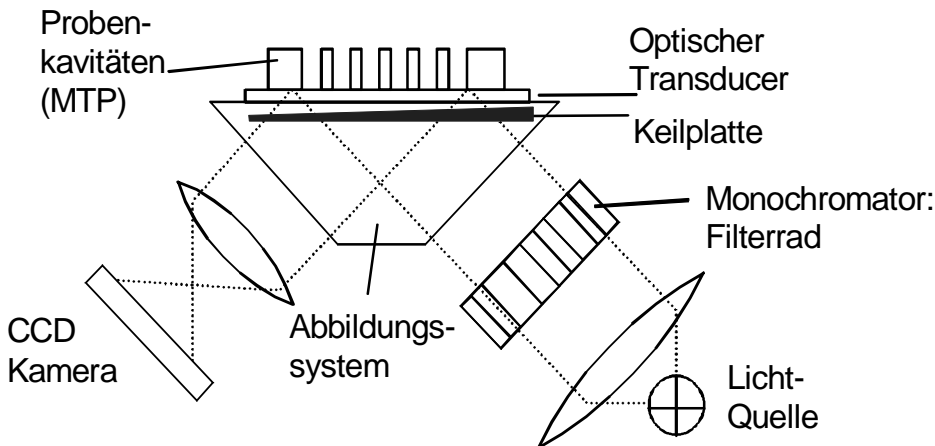


Fig. 15: Schematischer Aufbau des parallelisierten RI/S-Detektionsmoduls.

Die Datenaufnahme erfolgt über eine CCD-Kamera auf der kompletten Transducerfläche für alle Kavitäten simultan. Die CCD-Kamera-Technik ermöglicht es dabei, orts aufgelöst zu detektieren. Damit kann über eine geeignete Kavitätendichte, z.B. in Form und Dimension von Standard-Mikrotiterplatten, die Parallelisierung erreicht werden. Die Interferenzspektren werden dabei so erzeugt, dass über einen Monochromator nacheinander die einzelnen Wellenlängen angesteuert und die entsprechenden Signale detektiert werden. Aus diesen Daten wird das Interferenzspektrum und daraus die optische Schichtdicke bestimmt. Von technischer Bedeutung sind bei der Realisierung eines solchen Aufbaus die parallele Aufweitung des Lichtstrahls sowie die Erzeugung eines Referenzstrahls mit Hilfe einer in das Abbildungssystem integrierten Keilplatte. Für Details sei auf Gräfe *et al.* 2001 sowie auf Rothmund 1999 und Rothmund *et al.* 1997 verwiesen.

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 EGF-Rezeptor wurden von SIGMA, Deisenhofen geordert.
- Thrombin-Inhibitoren wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Friedrich, BASF Ludwigshafen und Dr. Peter Eckard, Knoll AG, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt.
- Polyklonale Antikörper (Anti-Estron-, Anit-Isoproturon-, Anti-Simazin, Anti-Atrazin-Antikörper) wurden freundlicherweise von Dr. Ram Abuknesha, HRC London, zur Verfügung gestellt.
- Monoklonale Antikörper (K4E7, K1F4) wurden freundlicherweise von Prof. Bertold Hock, TU München, zur Verfügung gestellt.
- Funktionalisierte Polyethylenglykole stammten von der Firma Rapp Polymere, Tübingen.

3.1.2 LÖSUNGEN

Piranha-Lösung

57,5 % (v/v) H₂SO₄

12 % (v/v) H₂O₂

(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.

Regenerationslösung I

0,01 M HCl

Regenerationslösung II

900.000 units (8 mg) Pepsin gelöst in 100 ml Wasser und auf pH 1,9 titriert.

Pufferlösung für die Versuche mit EGF-Rezeptor

7,569 g TRIS und 5,083 g MgCl_2 in wenigen ml bidestilliertem Wasser aufnehmen und mit verdünnter Salzsäure einen pH-Wert von 7,60 einstellen.

46 mg Natriumorthovanadat in wenig Wasser lösen und dann zugeben. Anschließend unter dem Abzug 350 μl Mercaptoethanol zupipettieren, den pH-Wert der Pufferlösung auf 7,50 einstellen und mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

Der Puffer wurde im Kühlschrank aufbewahrt, vor dem Gebrauch mit 0,01% des Detergenzes Brij 35 versetzt und im Verhältnis 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

3.1.3 GERÄTE

3.1.3.1 *RfS Transducer*

Die *RfS*-Transducer stammten von Schott (Mainz) als Sonderanfertigung und zeigten folgende Spezifikationen: Als Substrat diente Glas vom Typ D263 mit einer Dicke von 1 mm. Die Transducer hatten eine Beschichtung mit 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2 .

3.1.3.2 *RfS-Mikrotiterplatten*

Die *RfS*-Transducer für Mikrotiterplatten besaßen die Dimensionen $80 \times 108 \text{ mm}^2$ bei gleichem Schichtaufbau wie die Einkanaltransducer wobei auf der Transducerunterseite zusätzlich eine Antireflexschicht aufgebracht war. Dies war nötig, da im Gegensatz zum Einkanalssystem ein Matching der Transducerunterseite mit Glycerin zur Reduktion der Reflektivität nicht durchführbar war. Nach der Silanisierung (vgl. 3.2.1.2) sowie die Kupplung der Polymere AMD und PEG (vgl. 3.2.1.3) wurden die Transducer mit einem Silikonkleber auf Plastikspritzeinsteile geklebt. Diese Spritzeinsteile besaßen die Form von Standardmikrotiterplatten im 96- und 384-Well Format, mit der Ausnahme, dass keine Bodenfläche vorhanden war. Spritzeinsteile aus Polystyrol und Polypropylen standen zur

Verfügung. Bis auf die Platten, die für die Synthese der Triazinbibliothek benutzt wurden, waren alle Platten schwarz gefärbt. Da Polystyrol gegen fast alle verwendeten Lösungsmittel nicht beständig ist, mussten für Polystyrolplatten Immobilisierungsprotokolle in wässrigem Medium erarbeitet werden. Die Verklebung der Platten wurde von der Firma Zeiss (Jena) durchgeführt.

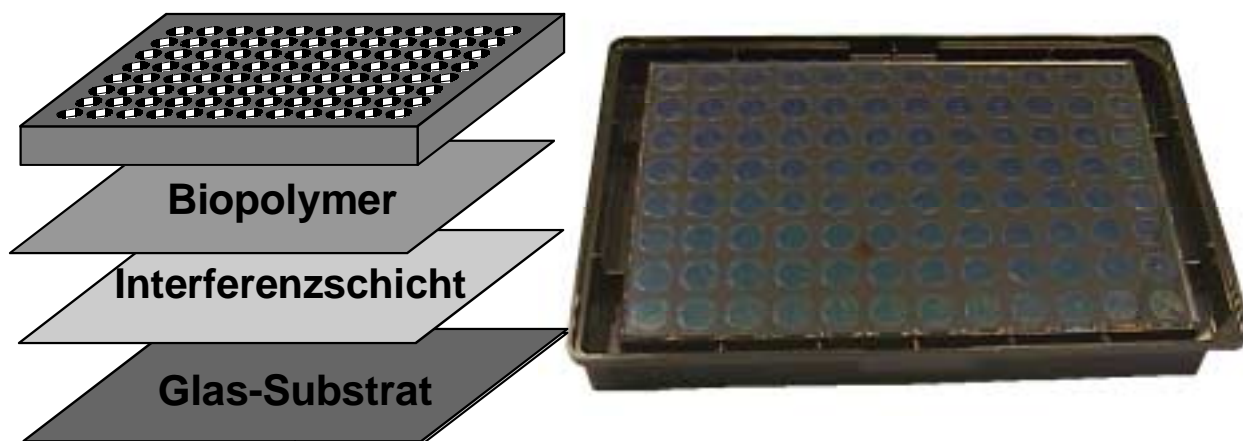


Fig. 16: Explosionsbild und Rückseitenansicht der speziellen RfS-MTPs. Untersucht wurden Platten im 96er und 384er Format mit einem Kunststoffkörper aus PS oder PP.

3.1.3.3 Einkanal RfS-System

Zur Bestimmung der Schichtdickenänderung mittels RfS wurden unterschiedliche Aufbauten verwendet. Ein Einkanalsystem wurde in Kombination mit einer Fließinjektionsanlage (FIA) betrieben. (Fig. 17). Der optische Aufbau bestand aus einem Simultanspektralphotometer SPEKOL 1100, Zeiss, Jena, modifiziert nach Schmitt *et al.* 1997.

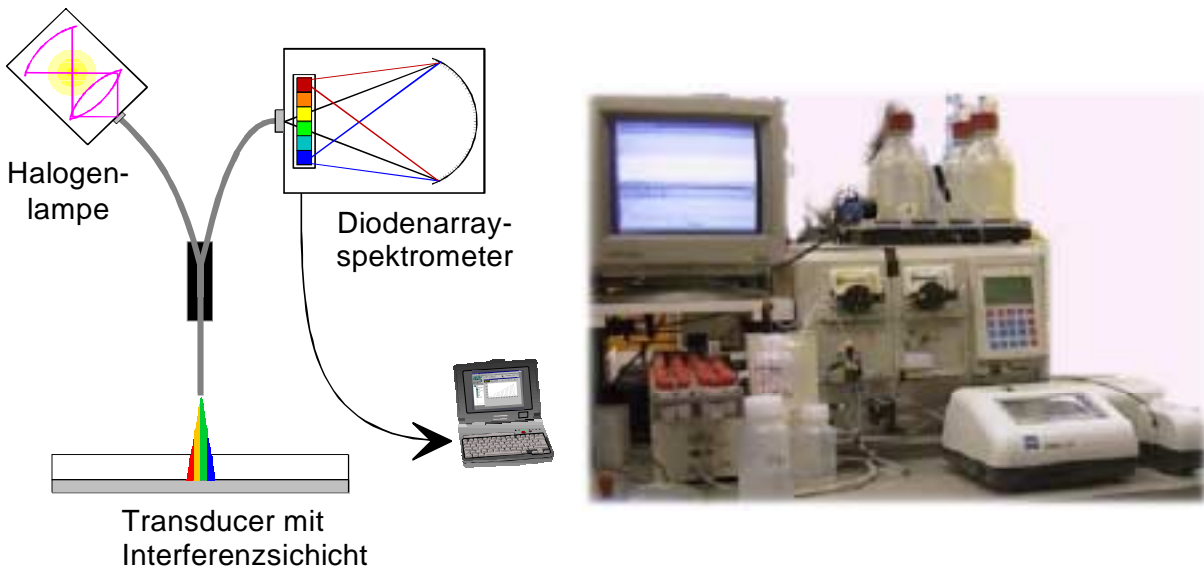


Fig. 17: Schema und Messaufbau eines Einkanal-RIFS-Systems mit Durchflusszelle.

Die FIA-Anlage war eine ASIA-FIA, Ismatec, Wertheim, mit einer Fixpumpe (20 Umdrehungen pro Minute; Förderrate: $0,82 \text{ ml min}^{-1}$) und einer Variopumpe (maximal 50 Umdrehungen pro Minute), mit variabler Drehzahl von 0-99 Schritten einstellbar. Dies entspricht je nach eingestellter Drehzahl n einer Förderate $F = n \cdot 3,5 \mu\text{l min}^{-1}$.

Das Fluidiksystem ist in Fig. 18 schematisch wiedergegeben. Der zur Messzelle gehende Pufferstrom stand zur Vermeidung von Luftblasen unter Argondruck. Die Probe wurde in einer Probenschleife mit einem Fassungsvermögen von $500 \mu\text{l}$ retrograd aufgenommen, wobei das Probenvolumen 1 ml betrug, und anschließend über den Transducer gegeben.

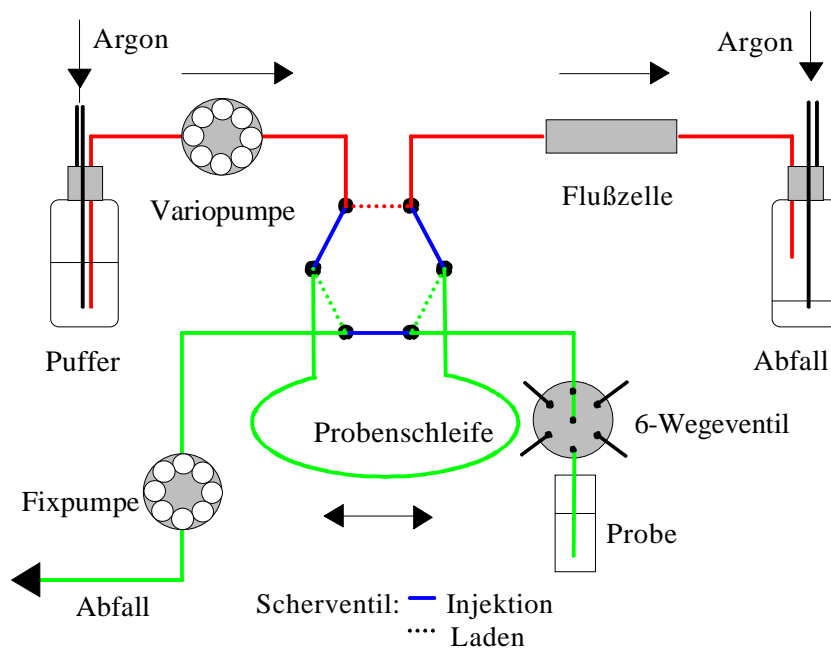


Fig. 18: Schematischer Aufbau der Probenhandhabung mit FIA und Autosampler. Die Probe wurde in einer Probenschleife aufgenommen und retrograd über den Transducer gegeben.

3.1.3.4 Mehrkanal RIfS-System

Im Verlauf der Entwicklung eines parallelen *RIfS*-Detektionssystems zum Einsatz im HTS wurde ein Demonstrator 1 entwickelt (Fig. 19).

Im einzelnen wurden für den Aufbau folgende Bauteile verwendet:

- Eine CCD-Kamera Typ CCD05-20 (von EEV) mit einer Chipfläche von $17,3 \times 26 \text{ mm}^2$, einer Pixelfläche von $22,5 \text{ }\mu\text{m}^2$, einer Pixelzahl von 770×1152 und einer full-well-Kapazität von $5 \cdot 10^5$ Elektronen.
- Lichtquelle und Stromversorgung sowie der optische Aufbau von Carl Zeiss Jena unter der Bezeichnung BIOSPEC.
- Das Liquid-Handling-System LIBRARIAN-LH stammte von der Firma CyBio, Jena. Es beruht auf dem System des IGEL 250/96 mit dem Unterschied, dass der Dosierkopf vertikal beweglich und durch den Einbau einer xy-Positionierung das Befüllen von 384er Platten in vier Schritten möglich war. Der Dosierkopf war für einen Volumenbereich von 1 bis $250 \text{ }\mu\text{l}$ ausgelegt und zeigte folgende Spezifikationen auf:

Anzahl der Kolben: 96

Pipettenspitzen: MATRIX $250 \text{ }\mu\text{l}$ Tip for PlateMate

Volumina: 1 bis $250 \text{ }\mu\text{l}$ in Schritten von $1 \text{ }\mu\text{l}$ frei wählbar

Unpräzision: 10 bis $25 \text{ }\mu\text{l}$ \Rightarrow $\text{VK} \leq 2\%$ im Pipettiermode

25 bis $250 \text{ }\mu\text{l}$ \Rightarrow $\text{VK} \leq 1\%$ im Pipettiermode

MTP-Wagen: vier Plätze für Wannen oder Mikrotiterplatten

- Ein Absetzer ermöglichte den Transfer von *RIfS*-Mikrotiterplatten zwischen Messposition und MTP-Wagen.
- Die Probenplatten bestanden aus einem MTP-Grid im 96er und 384er Format (Greiner, Frickenhausen) aus Polystyrol oder Polypropylen, die ohne Boden produziert wurden. Auf diesen Boden wurde ein *RIfS*-Transducer mit einer Dimension von $80 \times 108 \text{ mm}^2$ aufgeklebt, der im Gegensatz zu anderen *RIfS*-Transducern auf der Unterseite eine Antireflexschicht trug. Die Beschichtung mit einem Polymer auf der Oberseite wurde vor dem Verkleben durchgeführt.

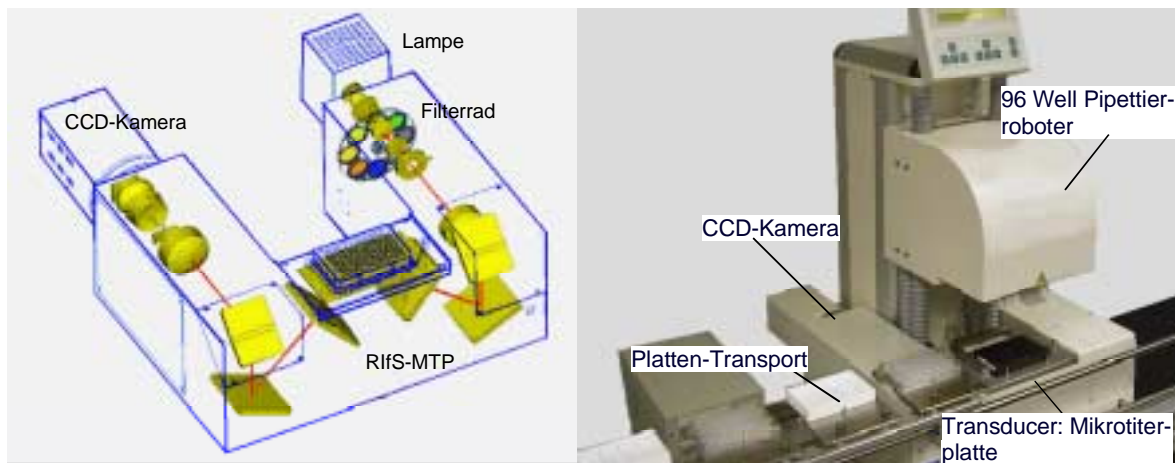


Fig. 19: Schema und Messaufbau des Demonstrator 1.

3.1.3.5 Mikrodosiersystem

Zur orts aufgelösten Immobilisierung von Proteinen wurde ein xyz-Positioniersystem F9S (Uhl, Aßlar) benutzt. Es besaß Verfahrwege von 28 mm bei einer Auflösung von $0.1 \mu\text{m}$ und 3 mm/s Geschwindigkeit. Zur Ansteuerung von Tisch (RS232-Schnittstelle) und Mikrodosierung (parallele Schnittstelle) wurde ein flexibles Programm unter Testpoint nach (Stemmler 1999) benutzt. Als Ansteuerungseinheit für das piezobasierte Dosiersystem diente das manuelle System MF-E-201 (Microdrop), an welchem die Parameter Pulslänge und Pulshöhe sowie die Tropfenfrequenz und -zahl pro Auslösung manuell voreingestellt werden können. Für den Halteindruck bzw. die Befüllung und Entleerung der Pipette sorgte eine manuell bedienbare pneumatische Druckregelungseinheit (AD-E-130). Zur Kontrolle wurde das Betropfen der Oberfläche mit einer Kamera (Conrad Elektronik, Hirschau) verfolgt.

3.2 Methoden

3.2.1 MODIFIKATION DER TRANSDUCEROBERFLÄCHEN

3.2.1.1 Reinigen der Glastransducer

- Einkanaltransducer: Die RIFS-Transducer wurden 3 min im Ultraschallbad mit einer 10%igen Extran[®]-Lösung und anschließend 20 min lang mit Piranha-Lösung gereinigt, mit bidest. Wasser gründlich abgespült und an der Luft getrocknet.
- BioSpec Transducer: Da die Antireflexschicht nicht säurestabil ist, wurden die Transducer 3min in 6M KOH-Lösung im Ultraschallbad gereinigt, abgespült und an der Luft getrocknet.

3.2.1.2 Silanisierung

Zur Silanisierung wurden 1-5 μl (Einkanal-Transducer) bzw. 400 μl (BioSpec-Transducer) 3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) auf die gereinigten Transducer gegeben und eine Stunde inkubiert. Die behandelten Plättchen wurden zum Schutz der Epoxygruppe mit trockenem Aceton gespült und im Stickstoffstrom sofort getrocknet und weiterbehandelt.

3.2.1.3 Belegung mit Polymer

Belegung mit Aminodextran

Es wurden direkt 7 μl (Einkanal) bzw. 1 ml (BioSpec) einer 0,1 mg/ μl Aminodextran-Lösung in bidest. Wasser auf den mit Epoxysilan aktivierten Transducer pipettiert und ein zweiter Transducer im Sandwich oben aufgelegt. Die Inkubation geschah 14 h in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Transducer gründlich mit bidest. Wasser abspült und an der Luft getrocknet.

Belegung mit Polyethylenglycol

Es wurde Diamino- und Dicarboxypolyethylenglycol verwendet. Dazu wurden die mit Epoxysilan aktivierten Transducer mit einer Polyethylenglycol-Lösung (0,2 mg in 50 μl DMF für Einkanaltransducer bzw. 2 mg in 5 ml DMF für Biospec-Transducer) inkubiert und anschließend 14 h bei 70°C im Ofen geheizt. Anschließend wurde überschüssiges Polymer mit Wasser abgespült und die Transducer an der Luft getrocknet.

3.2.1.4 Immobilisierung von Thrombininhibitor

Einkanalsystem: Der Inhibitor besitzt eine freie Aminogruppe. Deshalb wurden die funktionellen Aminogruppen des Polymers zuerst mit 5 μl einer Glutarsäureanhydrid-Lösung (10 mg/5 μl Dimethylformamid) umfunktionalisiert. Die eigentliche Kupplung fand wie folgt statt: Inkubation einer Lösung aus 1 mg Thrombininhibitor und 1 μl N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in 10 μl DMF 14 h in einer DMF-gesättigten Kammer. Dabei wurden - wie bereits beschrieben - zwei Transducer übereinandergelegt.

BioSpec: Da in der Regel Mikrotiterplatten aus Polystyrol verwendet wurden, musste auf organische Lösungsmittel verzichtet werden:

Die Wells der Mikrotiterplatte wurden mit festem Glutarsäureanhydrid gefüllt. Anschließend wurden die Wells mit Wasser aufgefüllt, die Platte abgedeckt und für 150 min vorsichtig geschüttelt. Danach wurden alle Wells mehrmals gründlich mit Wasser ausgespült. In die Wells wurde anschließend eine frisch hergestellte wässrigen Lösung aus EDC (9,6 mg/ml,

0,05 M) und NHS (5,9 mg/ml; 0,05 M) gefüllt (70 μ l/Well bei 96er Platten, 30 μ l/Well bei 384er Platten) und die Platte für 20 min vorsichtig geschüttelt. Danach wurden die Platten erneut gewaschen und eine wässrige Inhibitorlösung (1,5 mg/ml; 70 μ l/Well bei 96er Platten, 30 μ l/Well bei 384er Platten) in die Wells gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 14 h wurden die Platten nochmals gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.2.1.5 Immobilisierung von Phosphotyrosin

Eine Lösung von TBTU (0,38 g/ml) und Fmoc-Phosphotyrosin (0,38 g/ml) wurde hergestellt. Zu 4 ml dieser Lösung wurde 1,5 ml DIPEA gegeben und die Mischung intensiv geschüttelt, bis alles gelöst war. Dabei trat eine leichte Gelb- bis Braunfärbung der Reaktionslösung auf. Von dieser Lösung wurden dann 10 μ l auf einen Einkanaltransducer bzw. 60 μ l in jedes Well einer RfS-MTP (PP-Typ) pipettiert und 8 h inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit DMF sowie drei Mal mit Wasser gespült und die Transducer an der Luft trocknen lassen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurden die Transducer mehrfach für 5 min mit einer Piperidinlösung (20 % in DMF) behandelt und danach mit DMF und Wasser abgewaschen. Sowohl die Konzentrationen an TBTU und Fmoc-Phosphotyrosin als auch die Anzahl der Piperidinbehandlungen wurde durch Versuchsreihen optimiert.

3.2.1.6 Triazinsynthese

Die Triazin-Bibliotheken sowie die damit durchgeführten Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rolf Tünnemann aus der Arbeitsgruppe von Prof. G. Jung durchgeführt. Das Syntheschema ist in Fig. 20 zu sehen.

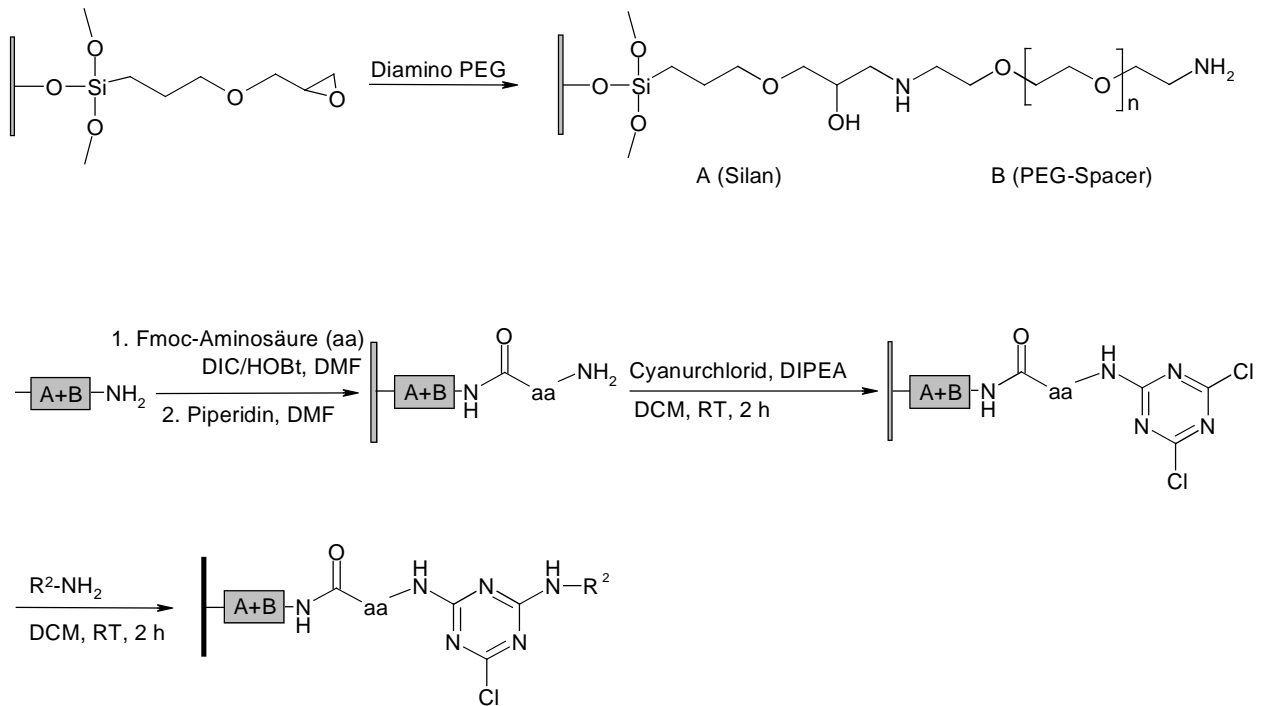


Fig. 20: Schema der Triazinsynthese in den Wells einer 96-RIFS-MTP aus PP.

Zunächst wurden die Aminosäuren in den Wells kovalent an das Diamino-PEG gekuppelt. Mit Cyanurchlorid wurde danach das Stickstoffheteroringsystem aufgebaut und anschließend ein Chloratom durch ein Amin ersetzt. Mit drei Aminosäuren und 12 Aminen stand somit eine Bibliothek von 36 Substanzen zur Verfügung. Jede Substanz wurde in jeweils 2 Wells der Mikrotiterplatte synthetisiert. In den 24 verbleibenden Wells wurden Referenzsubstanzen ohne einen Heterozyklus im Gerüst synthetisiert. Für Details zur Synthese wird auf Tünnemann 1999 und Birkert et. al. 2000 verwiesen.

In Tabelle 2 sind die für die Synthese verwendeten Bausteine und die zugehörige Position auf der Mikrotiterplatte gegeben.

Tabelle 2: Für die kombinatorische Synthese benutze Aminosäuren und Amine. In der dritten Spalte ist die Position jeder einzelnen Substanz auf der Synthese-RIS-MTP angegeben. Die selben Triazinderivate wurden jeweils in 2 benachbarten Wells synthetisiert.

Aminosäure (aa) Rest R1	Amin Rest R2	Position auf der MTP*		
		aa=1	aa=2	aa=3
1 Fmoc-Glu(OtBu)-OH	A Phenylalanin-methylester	A4/B4	A7/B7	A10/B10
2 Fmoc-Ahx-OH	b Adamantylmethylamin	A5/B5	A8/B8	A11/B11
3 Fmoc-Phe-OH	c Pentylamin	A6/B6	A9/B9	A12/B12
	d Trimethoxybenzylamin	C4/D4	C7/D7	C10/D10
	e Isopropylamin	C5/D5	C8/D8	C11/D11
	f 2-(2-Aminoethyl)Pyridin	C6/D6	C9/D9	C12/D12
	g Tryptamin	E4/F4	E7/F7	E10/F10
	h Ethylamin x HCl	E5/F5	E8/F8	E11/F11
	i N-Hexylmethylamin	E6/F6	E9/F9	E12/F12
	j 2-Aminopyrimidin	G4/H4	G7/H7	G10/H10
	k 1-Phenyl-Ethylamin	G5/H5	G8/H8	G11/H11
	l p-Anisidin	G6/H6	G9/H9	G12/H12

* Jede Substanz wurde in zwei benachbarten Wells synthetisiert.

3.2.1.7 Immobilisierung von Biotin

Eine Lösung aus 8 mg (0,025 mMol) TBTU und 8,5 µl DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) in 50 µl DMF wurde mit einer Lösung von 3,8 mg (0,025 mMol) HOBt und 6,1 mg (0,025 mMol) Biotin vereinigt und gerührt. 5 µl dieses Reagenz gab man auf einen Einzelplatztransducer bzw. 60 µl in die Wells einer 96er RfS-MTP. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurden die Transducer mit bidestilliertem Wasser abgewaschen und an der Luft getrocknet.

3.2.1.8 Kovalente Immobilisierung von (Strept-)Avidin

Um die kovalente Bindung von Avidin, Streptavidin und p-Streptavidin zu verfolgen, wurden die Kupplungen im Flusskanal bei gleichzeitiger Detektion des Schichtdickenverlaufes vorgenommen. Dazu wurde ein carboxy-modifizierter Transducer in die Einkanalflusszelle eingebaut und nacheinander eine wässrige NHS/EDC Lösung (0,05 mM EDC; 0,05 mM NHS), die Proteinlösung (je nach Experiment 10 bis 50 µg/ml) in 50 mM HEPES Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und eine wässrige 1M Ethanolaminlösung über die Transduceroberfläche gepumpt.

Mit der EDC/NHS-Lösung bildet sich ein Aktivester auf der Carboxyoberfläche, der einigermaßen stabil ist (Hermanson 1996). Das Aktivierungsreagenz wurde jeweils frisch zubereitet und die Lösung nur kurze Zeit (90 Sekunden) über die Oberfläche geleitet.

Der Aktivester kann mit den freien Aminogruppen der Proteine unter Bildung einer Amidbindung reagieren.

Ethanolamin dient zur Desaktivierung nicht umgesetzten Aktivesters.

3.2.1.9 kovalente Immobilisierung von (Strept-)Avidin mittels Mikrodosiersystem

Bei der Immobilisierung mit einem Mikrodosiersystem (vgl. Kap. 3.1.3.5) kam es durch das schnelle Verdampfen des Lösungsmittels Wasser zu einer Aufkonzentrierung der Proteinlösung, was eine erhöhte Kupplungseffizienz zur Folge hatte. Durch den geringen Volumenverbrauch beim Betropfen konnte darüber hinaus die Konzentration der Proteinlösung bei vertretbaren Materialkosten sehr hoch gehalten werden.

Vor der Kupplung mussten carboxymodifizierte Transducer über einen NHS-Aktivester aktiviert werden. Dazu wurde ein Transducer mit 10 µl einer Lösung von NHS (1 M) und DIC (1,5 M) in DMF 14 h lang inkubiert. Danach wurde sorgfältig mit wasserfreiem Aceton gespült und sofort mit dem Betropfen der Oberfläche begonnen. Dazu wurden Proteinlösungen in filtriertem, destilliertem Wasser benutzt (Avidin: 1,5 mg /ml, Streptavidin: 1,5 mg/ml, p-Streptavidin: 4 mg/ml). Die Proteinlösungen wurden zweifach in einem

überlappenden Muster mit kreisförmiger Gesamtform ($d = 2 \text{ mm}$) auf die Transduceroberfläche pipettiert.

3.2.2 BINDUNGSCHEMMTEST

Zur Durchführung eines Bindungshemmtests wurden der Rezeptor und der Ligand 5 min in einem getrennten Gefäß inkubiert und danach über die Sensoroberfläche geleitet. Dies geschah zum einen mittels FIA und zum anderen durch Pipettieren in die Kavitäten der RIfS-MTP.

3.2.3 PROGRAMMIERTE MESSUNGEN AM BIOSPEC

3.2.3.1 Messung von Brechungsindexsprüngen

Der Einfluss des Wechsels vom Brechungsindex $n=1,333$ (Wasser) auf $n=1,345$ (10% Glycerin in Wasser) wurde durch automatisches, abwechselndes Befüllen und Entleeren im Abstand von 600 s untersucht. Zwischen den Befüllungen wurde die RIfS-MTP drei mal mit dem jeweils zu messenden Medium gespült.

3.2.3.2 Messung von spezifischer und unspezifischer Absorption

Die Messungen zur Bestimmung von Schichtdickenänderungen bei der Anlagerung von Proteinen und biotinylierten Substanzen wurden für 96er und 384er MTP mit demselben Programm durchgeführt. Lediglich die Pipettiervolumen wurden variiert. Im Folgenden werden Pipettiervolumen für 96er MTP gegeben; die Werte für 384er Platten sind in Klammern angegeben.

Vor der eigentlichen Messung wurden die trockenen Platten mindestens 10 min lang mit Puffer befüllt, um störende Quelleffekte der Polymere auszuschließen. Danach wurden die Platten geleert, auf der Messposition platziert und dann die Detektionssoftware und die Software zur Ansteuerung des Pipettierroboters gleichzeitig gestartet.

Zuerst wurden die Platten dabei mit 70 μl (60 μl) Puffer befüllt und das Basisliniensignal 300 s detektiert. Danach wurde der Puffer entfernt und in die Abfallwanne ausgestoßen. Anschließend wurde 70 μl (40 μl) Probe von der Vorrats-MTP aufgenommen und in die RIfS-MTP transferiert. Nach einer Bindungsdauer von 900 s wurde auch die Probe entfernt und in die Abfallwanne abgegeben. Falls die Probe ein weiteres Mal gemessen werden sollte, wurde sie in die Vorrats-MTP und nicht in die Abfallwanne pipettiert. Nun wurde die RIfS-MTP einige Minuten mit Regenerationslösung befüllt. Auch diese wurde anschließend

in die Abfallwanne pipettiert und die RIFs-MTP nochmals mit Puffer befüllt, um das Basisliniensignal nach dem Messzyklus zu erhalten.

In Tabelle 3 sind die Probenkonzentrationen, Regenerationslösungen und Puffer für die untersuchten Systeme angegeben.

Tabelle 3 Messparameter für die einzelnen am BioSpec vermessenen Proben.

Probe	Konzentration	Puffer	Regenerations- lösung
Ovalbumin	1 mg/ml	PBS	HCl oder Pepsin
Rinderserum Albumin	1 mg/ml	PBS	HCl oder Pepsin
Kälberserum	1:10 verdünnt	PBS	HCl oder Pepsin
Thrombin	0-40 µg/ml; 400 µg/ml	PBS	HCl
	Ovalbumin als Hintergrundprotein		
Anti-PT + alle Assaykomponenten	16 µg/ml	EGFR-Puffer	Pepsin
Anti-PT	20 µg/ml	PBS	Pepsin
Avidin/Streptavidin/ p-Streptavidin	50 µg/ml	PBS	Pepsin
Biotinyliertes E1-3CMO	15-30 µg/ml	PBS	Pepsin
Estron-Antikörper	250 ng/ml; 500 ng/ml; 50 µg/ml; 400 mg/ml	PBS	Pepsin
	Ovalbumin als Hintergrundprotein bei kleinen Konzentrationen		
Triazin-Antikörper	20 µg/ml; 400 µg/ml	PBS	Pepsin
	Ovalbumin als Hintergrundprotein		

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Oberflächen zur Immobilisierung mit Hilfe einer Affinitätsreaktion

Zwei Ansätze zur Immobilisierung mit Hilfe von Affinitätsreaktionen wurden in dieser Arbeit verfolgt. Zum einen war dies die Immobilisierung von biotinylierten Substanzen über das (Strept-)Avidin-Biotin Hilfssystem und zum anderen die Immobilisierung von His-Tag-Fusionsproteinen an einer Nickel-NTA Oberfläche.

4.1.1 IMMOBILISIERUNG VON AVIDIN- UND STREPTAVIDINSCHICHTEN AUF SiO_2 -TRANSDUCERN

Um biotinylierte Liganden oder Targets in großer Menge spezifisch auf Biosensoren zu immobilisieren, müssen Oberflächen vorhanden sein, die möglichst viele, sterisch nicht gehinderte Avidin- oder Streptavidinmoleküle besitzen. Um solche biotinaktiven Oberflächen zu erhalten, wurde untersucht, inwieweit sich Avidin und Streptavidin über eine Biotin-Affinitätsbindung oder alternativ kovalent an modifizierte SiO_2 -Oberflächen binden lassen. Am Beispiel eines biotinylierten Estronderivates (Biotin-E13CME) und eines polyklonalen Antikörpers (αE1) gegen Estron wurde anschließend die Möglichkeit gezeigt, auf solchen Oberflächen die Immobilisierung und anschließende Wechselwirkung von biotinylierten Substanzen zu untersuchen.

4.1.1.1 Immobilisierung von Streptavidin und Avidin über eine Affinitätsbindung zur Oberfläche

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Schichtsystem entwickelt, mit dessen Hilfe Streptavidin- und Avidinschichten von ca. einer Monolage über einen biotinmodifizierten PEG-Spacer und ein Epoxysilan an SiO_2 immobilisiert werden kann (Birkert 1998). Dort wurde PEG verwendet, da dieses beim Verhindern von unspezifischer Proteinadsorption sehr gute Eigenschaften zeigte. Der Umstand, dass auf Grund der geordneten PEG-Struktur

(*Polymer Brush*) maximal eine Monolage Protein immobilisiert werden konnte, wurde dabei in Kauf genommen.

Basierend auf den Protokollen zur kovalenten Kupplung von Biotin auf Diamino-PEG wurden analoge Aminodextran-Biotin-Oberflächen hergestellt. Schematisch sind die beiden Oberflächentypen in Fig. 22 gezeigt.

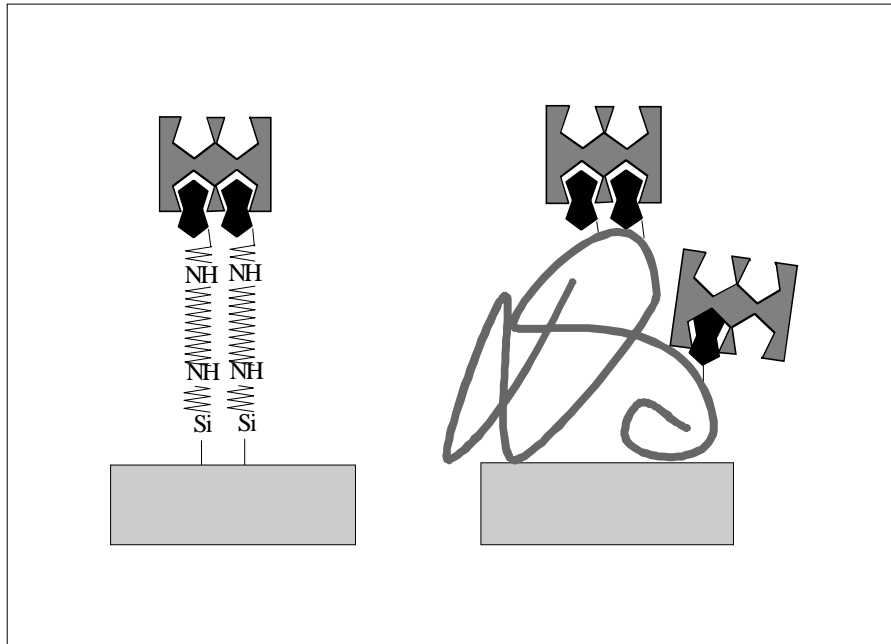


Fig. 22: Avidin und Streptavidin können über Biotin an der Transduceroberfläche immobilisiert werden. Mit einem PEG-Spacer (links) kann dabei maximal eine Monolage an Protein gebunden werden, wohingegen die AMD-Matrix (rechts) eine höhere Beladung erlaubt.

Auf Grund des Matrixeffekts von AMD konnte dabei eine deutlich höhere Proteinbeladung der Oberfläche erreicht werden. Während auf PEG-Biotin-Schichten 4.8 ± 0.6 nm Avidin, 5.1 ± 0.5 nm Streptavidin und 7.1 ± 1.0 nm p-Streptavidin immobilisiert werden konnten, wurden auf AMD-Biotin-Schichten für alle drei Proteine Schichtdicken zwischen 12 und 18 nm, also deutlich höhere Werte, erhalten. Bindungskurven, die bei Inkubation von AMD-Biotin-Schichten im Fluss mit $50 \mu\text{g/ml}$ Protein erhalten wurden, sind in Fig. 23 gezeigt.

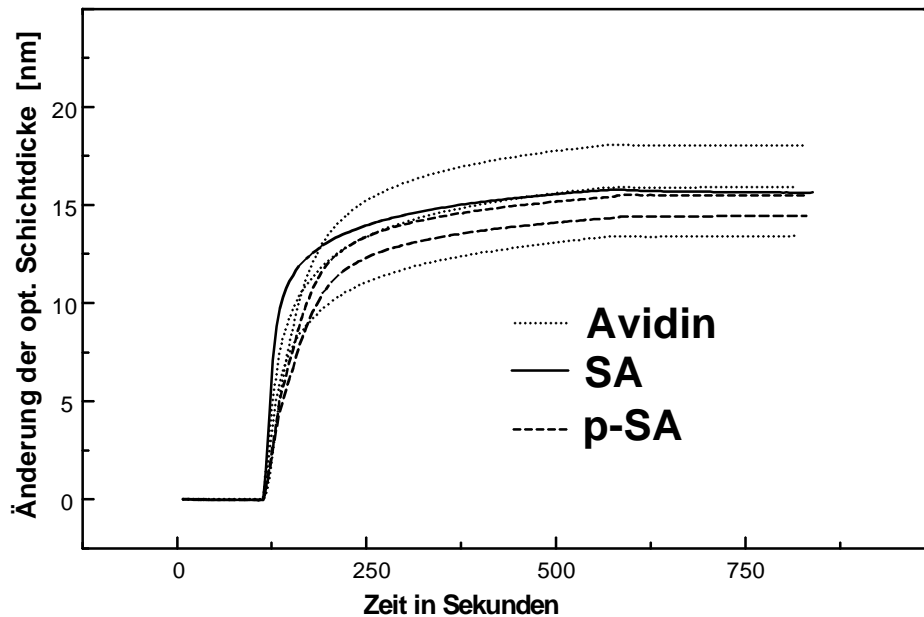


Fig. 23: Bindungssignale von Avidin, Streptavidin und p-Streptavidin (50 $\mu\text{g/ml}$) auf Biotin-Dextranschichten im Fluß.

Beim Test der unspezifischen Bindungen von Protein (Ovalbumin, BSA) auf solchen Oberflächen zeigte sich, dass diese nicht vom verwendeten Polymer, sondern von den Proteineigenschaften abhängig waren. Während auf Avidin eine etwas erhöhte unspezifische Bindung festzustellen war (max. 200 pm), zeigte Streptavidin keine unspezifische Bindung. Grund hierfür ist sicherlich die Ladung der Proteine. Während Avidin in PBS-Pufferlösung auf Grund des pI von 10-11 positiv geladen ist, trägt Streptavidin in PBS einen negativen Ladungsüberschuss.

Obwohl auf den AMD-Schichten deutlich mehr an Avidin und Streptavidin immobilisiert werden konnte, zeigten diese Schichten gegenüber PEG-Schichtsystemen nach der Immobilisierung einer biotinylierten Substanz (biotinyliertes Estronderivat) keine erhöhten Bindungskapazitäten für den zugehörigen Rezeptor (polyklonaler α -Estron-Antikörper). Wie bei PEG-Schichten auch, wurden mit 1,5 – 2 nm optischer Schichtdickenänderung für Avidin und 5 – 7 nm optischer Schichtdickenänderung für Streptavidin nur Sub-Monolagenschichten an Antikörper gebunden. Damit sind die beiden Schichtsysteme, basierend auf AMD oder PEG, zur Untersuchung der Wechselwirkung von biotinylierten Substanzen mit dem zugehörigen Rezeptor oder Target gleichwertig. Zusätzlich ermöglichen die AMD-basierten Schichten auf Grund der hohen Bindungskapazität für Avidin und Streptavidin eine neue Anwendung, mit der die Aktivität der Biotinkomponente einer biotinylierten oder biotinähnlichen Substanz untersucht werden kann. Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

4.1.1.2 *Aktivitätsbestimmung mit Hilfe von Avidinoberflächen*

Obwohl die Bestimmung von Affinitätskonstanten mittlerweile zu einer der Routineeinsatzgebiete der RIfS geworden ist, sind doch einige Randbedingungen nötig, um diese durchzuführen. Unter anderem ist es notwendig, ein geeignetes Regenerationsprotokoll zu erstellen, mit dem die Rezeptor-Ligand Bindung gelöst werden kann, ohne die Transduceroberfläche anzugreifen. Da auf Grund der hohen Affinität zwischen Biotin und Avidin oder Streptavidin kein solches Protokoll vorhanden ist, muss eine Affinitätsbestimmung ohne Regeneration auskommen. Auf Grund der hohen Bindungskapazität von AMD-Biotin Schichten sind diese geeignet, einen kompletten Bindungsinhibitionstest mit über 30 Einzelproben ohne zwischengeschaltete Regenerationsschritte auf einem Transducer durchzuführen. Bei der Auswertung ist dabei zu beachten, dass es sich sowohl bei Avidin als auch bei Streptavidin um tetramere Moleküle mit vier Bindungsstellen handelt. Deshalb wird im Folgenden zunächst eine theoretische Beschreibung solcher tetrameren Moleküle gegeben. Anschließend werden die Vorhersagen mit den Messergebnissen verglichen.

4.1.1.3 *Theoretische Betrachtung der Affinitätsreaktion tetramerer Rezeptoren mit monomeren Liganden.*

Avidin und Streptavidin haben vier Bindungstaschen für Biotin. Dies muss bei der Berechnung von Titrationskurven, bei denen der Prozentsatz an noch bindungsfähigem Avidin oder Streptavidin in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Biotin berechnet wird, berücksichtigt werden. Weiterhin wurden folgende Näherungen gemacht:

Die Affinität von Avidin und Streptavidin zu Biotin ist unabhängig davon, ob schon ein oder mehrere Biotinmoleküle an das Protein gebunden haben. Dies bedeutet auch, dass alle Avidinmoleküle, die noch mindestens eine freie Bindungsstelle aufweisen, mit Oberflächen-Biotinmolekülen wechselwirken können.

Diese Näherung ist vor allem deshalb kritisch zu beurteilen, als dass bekannt ist, dass sich je zwei Bindungsstellen auf gegenüberliegenden Seiten des Proteins befinden und diese sich somit räumlich recht nahe stehen. Mit dieser Näherung ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Avidinmolekül kein, ein, zwei, drei oder vier Biotinmoleküle trägt, über folgende Binomialverteilung gegeben:

$$(p + q)^4 = \sum_{k=0}^4 \binom{4}{k} p^k q^{4-k} \quad \text{Formel 18}$$

bzw.

$$(p + q)^4 = p^4 + 4p^3q + 6p^2q^2 + 4pq^3 + q^4 \quad \text{Formel 19}$$

wobei p die Wahrscheinlichkeit für eine beliebige Bindungsstelle ist, dass sie besetzt ist und q, dass sie unbesetzt ist. Die Wahrscheinlichkeit für ein komplett besetztes Avidinmolekül ist demnach p^4 , für ein Avidin mit nur einer freien Bindungsstelle p^3q etc.

Gleichzeitig gilt für p:

$$p = \frac{C_{\text{Bindungsstellenkomplexe}}}{C_{0\text{Bindungsstellen}}} \quad \text{Formel 20}$$

wobei c die Zahl bzw. Konzentration der besetzten Bindungsstellen und c_0 die Anzahl bzw. Konzentration der ursprünglich vorhandenen besetzbaren Bindungsstellen ist.

Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Avidinmolekül vier Biotinmoleküle gebunden hat, beträgt p^4 und die Konzentration an vollständig besetzten Avidinmolekülen beträgt

$$C_{4\text{besetzt}} = p^4 C_{0(\text{Avidinmoleküle})} \quad \text{Formel 21}$$

oder

$$C_{4\text{besetzt}} = \frac{C_{\text{Bindungsstellenkomplexe}}^4}{C_{0\text{Bindungsstellen}}^4} * C_{0(\text{Avidinmoleküle})} \quad \text{Formel 22}$$

$$C_{4\text{besetzt}} = \frac{C_{\text{Bindungsstellenkomplexe}}^4}{C_{0\text{Bindungsstellen}}^4} * \frac{C_{0\text{Bindungsstellen}}}{4} \quad \text{Formel 23}$$

Für die noch bindungsfähigen Avidinmoleküle erhält man die Konzentration

$$\begin{aligned} C_{\text{freie_Bindungsstellen}} &= C_{0\text{Avidinmoleküle}} - C_{4\text{besetzt}} \\ &= \frac{C_{0\text{Bindungsstellen}}}{4} - \frac{C_{\text{Bindungsstellenkomplexe}}^4}{4 * C_{0\text{Bindungsstellen}}^3} \end{aligned} \quad \text{Formel 24}$$

Die Konzentration an Bindungsstellenkomplexen ist über das Massenwirkungsgesetz

$$K = \frac{c_{\text{Bindungsstellenkomplexe}}}{c_{\text{freie_Bindungsstellen}} * c_{\text{Biotin}}} \quad \text{Formel 25}$$

gegeben, wobei durch c_{Biotin} die Konzentration an freiem Biotin beschrieben wird. Über eine quadratische Gleichung ergibt sich als einzig physikalisch sinnvolle Lösung für die Konzentration der Bindungsstellenkomplexe

$$c_{\text{Bindungsstellenkomplexe}} = \frac{c_{0\text{Bindungsstellen}} + c_{0\text{Biotin}} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0\text{Bindungsstellen}} + c_{0\text{Biotin}} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0\text{Bindungsstellen}} * c_{0\text{Biotin}}} \quad \text{Formel 26}$$

wobei $c_{0\text{Analyt}}$ die Ausgangskonzentration an biotin bzw. biotinylierter Substanz und K die Affinitätskonstante darstellt. Damit erhält man mit Formel 24 für die Anzahl der noch bindungsfähigen Avidinmoleküle

$$c_{\text{freie_Bindungsstellen}} = \frac{c_{0\text{Bindungsstellen}}}{4} - \frac{\left[\frac{c_{0\text{Bindungsstellen}} + c_{0\text{Biotin}} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0\text{Bindungsstellen}} + c_{0\text{Biotin}} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0\text{Bindungsstellen}} * c_{0\text{Biotin}}} \right]^4}{4c_{0\text{Bindungsstellen}}^3} \quad \text{Formel 27}$$

Diese Funktion beschreibt die Titration der freien Bindungsstellen des Avidins mit Biotin. Sie ist in Fig. 24 für unterschiedliche Bindungskonstanten gezeigt.

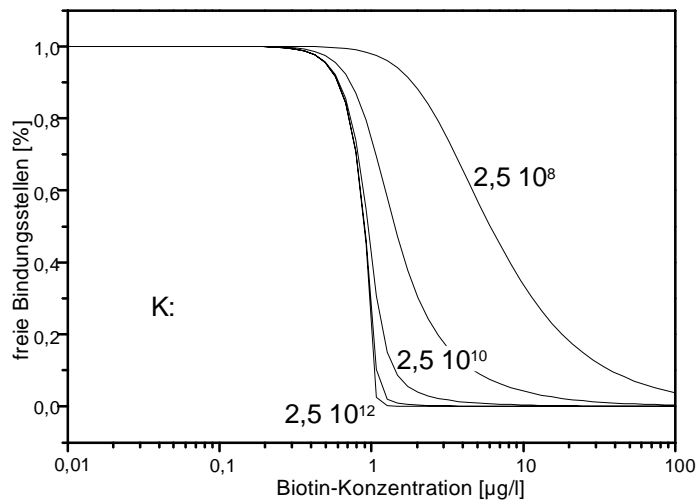


Fig. 24: Freie Bindungsstellen des Avidins in Abhängigkeit der Konzentration an Biotin bei verschiedenen theoretischen Bindungskonstanten ($c_{0\text{Bindungsstellen}} = 4,4 \text{ nM}$)

Bei einer Bindungskonstanten von ca. $K = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ für das ungestörte Avidin-Biotin-System wird deutlich, dass sinnvolle Aussagen über die Affinitätskonstante bei typischen Versuchsbedingungen nicht gemacht werden können, da sich die erhaltenen Titrationskurven für Affinitätskonstanten von $K > 10^{10} \text{ M}^{-1}$ für tetramere Moleküle kaum noch unterscheiden.

Für Systeme, bei denen die Affinität z.B. durch sterische Hinderung um mehrere Zehnerpotenzen abnimmt, kann dies allerdings detektiert und dann auch die Affinitätskonstante bestimmt werden. Weiterhin behält Formel 27 natürlich auch für sämtliche anderen tetrameren Moleküle wie z.B. homodimere Antikörper oder tetramere Enzyme mit Bindungskonstanten kleiner 10^8 M^{-1} ihre Gültigkeit.

In Fig. 25 sind die Titrationskurven für ein tetrameres Molekül bei gleicher Aktivität und Bindungsstellenkonzentration denen von dimeren und monomeren Molekülen gegenübergestellt. Mit der Anzahl der Bindungsstellen wird die Titrationskurve steiler und damit der Informationsgehalt über die Affinitätskonstante geringer bis sie für unendlich viele Bindungsstellen zur Stufenfunktion entartet.

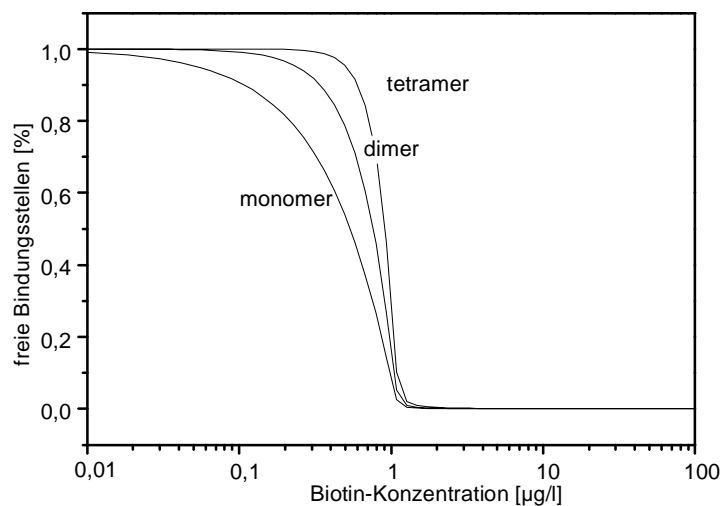


Fig. 25: Vergleich der Titrationskurven von einwertigen, zweiwertigen und vierwertigen Rezeptoren für $c_{0\text{Bindungsstellen}}=4,4 \text{ nM}$ und $K=2,5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$.

4.1.1.4 Messung der Titrationskurve mit verschiedenen Biotinderivaten

Titrationskurven zur Bestimmung von Affinitätskonstanten oder zur Erzeugung einer Kalibrierkurve werden normalerweise dadurch erhalten, dass die detektierte Bindung an die Oberfläche nach jeder Probe durch ein geeignetes Regenerationsmittel wieder gelöst und damit die Oberfläche wieder vom Rezeptor befreit wird. Die hohe Kapazität der Avidinschichten erlaubt es, auf den Regenerationsschritt zu verzichten, da selbst nach Bindung von 30 Proben noch genügend Bindungsstellen an der Oberfläche unbesetzt sind, um die erforderliche Diffusionslimitierung der Bindung und damit den linearen Anstieg des Signals zu erhalten. Der Verzicht auf den Regenerationsschritt erspart nicht nur die Suche nach einem systemkompatiblen Regenerationsmedium - das bei der Stärke der Biotin-Avidin-Bindung bisher noch nicht gefunden wurde - sondern verkürzt die Messzeit auch erheblich. In Fig. 26 sind die Bindungskurven, die zur Erzeugung der Titrationskurven

gemessen wurden, für das System Avidin-Biotin auf einer AMD-Biotin-Oberfläche dem System Antikörper(α E1)-Analyt(E13CME-Biotin) auf einer AMD-Oberfläche gegenübergestellt. Insgesamt wurden 11 bzw. 10 Analytkonzentrationen bei Dreifachbestimmung gemessen. Aufgetragen sind 3 Zyklen mit aufsteigender Analytkonzentration, die zeitlich hintereinander gemessen wurden. Um die Stabilität der Oberflächenperformance zu belegen, wurden die ersten Messwerte der Zyklen auf 0 Prozent und die Maximalsignale auf 100 Prozent normiert. Dabei ist der erste Messpunkt eines Zyklus jeweils identisch mit dem letzten Messpunkt des vorangegangenen Zyklus.

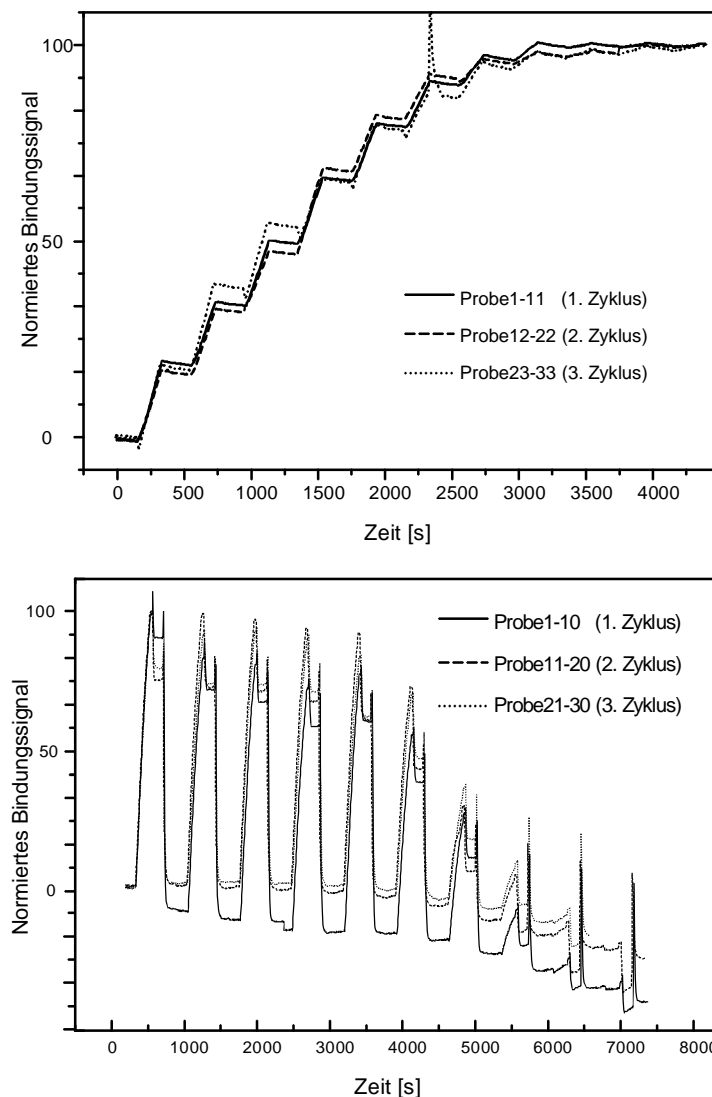


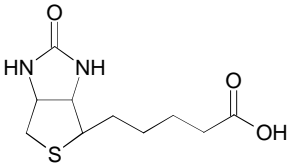
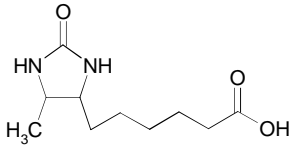
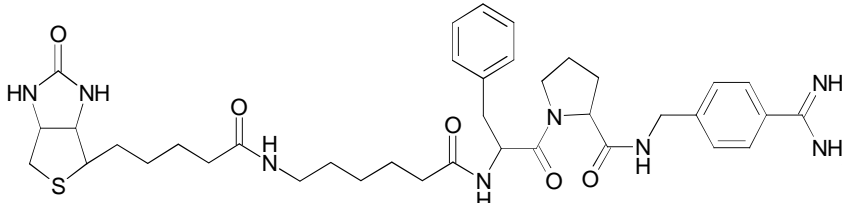
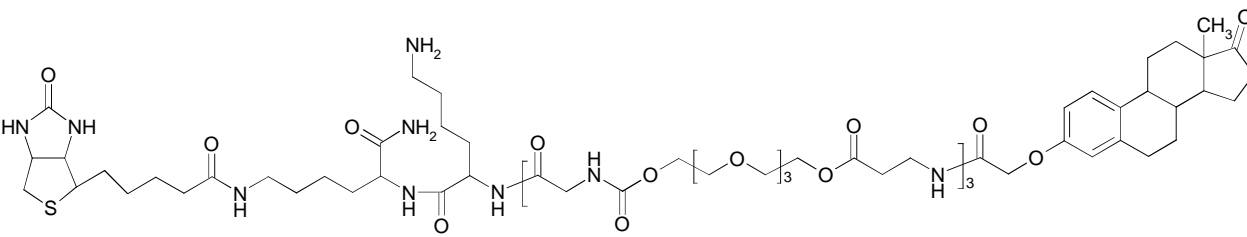
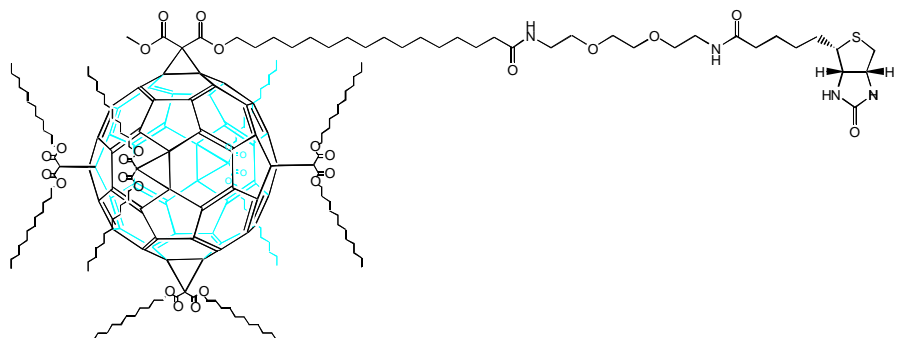
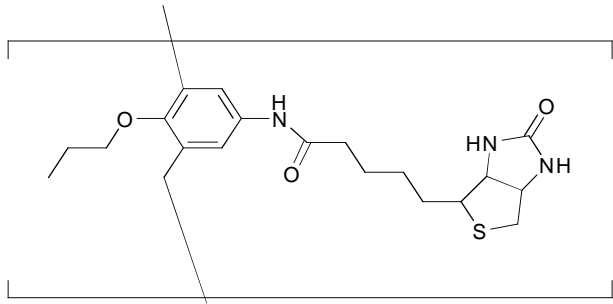
Fig. 26: Vergleich der Messprotokolle und der Bindungssignale beim Messen von Titrationskurven ohne Regeneration (oben; 500 ng/ml Avidin mit Biotin) und mit Regeneration der Oberfläche nach jeder gemessenen Probe (unten; 500 ng/ml α E1 mit Biotin-E13CME).

In beiden Fällen kann der lineare Anstieg noch nach 30 Proben reproduzierbar ausgewertet werden. Der Verzicht auf eine Regeneration führt bei 30 Proben zu einer Verkürzung der Gesamtmesszeit von 6h 15 min auf 3h 20 min. Während die nicht regenerierbare Oberfläche

nicht für weitere Messungen verwendet werden kann, können auf der regenerierbaren Oberfläche mehrere Titrationskurven in Folge gemessen werden.

Mit Hilfe der AMD-Biotin-Oberfläche wurde Avidin mit unterschiedlichen Biotinderivaten titriert und die erhaltenen Titrationskurven verglichen. Die untersuchten Biotinderivate sind in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4 Unterschiedliche Biotinderivate, mit denen Avidin titriert wurde.

 <p>Biotin</p>	 <p>Desthiobiotin</p>
 <p>Biotinylierter Thrombininhibitor¹</p>	
 <p>Biotinyliertes Estronderivat (Estroncarboxymethylether)¹</p>	
 <p>Biotinyliertes Fullerenderivat²</p>	
 <p>Biotinyliertes Calixaren³</p>	

¹ Freundlicherweise von Dr. Jürgen Mack zur Verfügung gestellt (Birkert 1998).

² Freundlicherweise von Martin Braun zur Verfügung gestellt (Braun *et al.* 2000).

³ Freundlicherweise von Dr. Antonio Soi zur Verfügung gestellt.

Wie in Fig. 27 zu sehen ist, unterschieden sich die Titrationskurven mit Ausnahme des Calixarens nur marginal, d.h. eine eventuell auftretende Veränderung der Aktivität ist zu gering, als dass sie mit dieser Methode gemessen werden kann (vgl. 4.1.1.3). Die hohe Affinität aller Derivate machte es darüber hinaus unmöglich, sie mittels Anpassung der entwickelten Funktion zu ermitteln. Es zeigte sich allerdings, dass sich die Kurven auch sehr gut mit einem Modell für ein System mit 2 Bindungsstellen anpassen ließ, wenngleich auch hier die hohen Affinitätskonstanten ihre Quantifizierung verhinderten. Dieser Umstand lässt die Überlegung zu, dass sich die Bindungsstellen zum Teil sterisch beeinträchtigen, was schon in 4.1.1.2 vermutet wurde. Einen eindeutigen Beweis für eine solche Hinderung konnte allerdings mit der RfS nicht erbracht werden.

Das Calixarendervat besitzt eine deutlich reduzierte Affinität zu Avidin (u.a. an der geringeren Steilheit der Kurve zu sehen). Der Verzicht auf einen Spacer zwischen Biotin- und Calixarenkomponente führt dazu, dass das Biotin nicht mehr optimal mit der tief im Protein sitzenden Bindungstasche wechselwirken kann. Dies wird auch aus Arbeiten von Wilchek (Wilchek *et al.* 1984, Wilchek *et al.* 1988) ersichtlich, wo eine Gesamtspacerlänge von 1,5 nm propagiert wird. Auf Grund der sehr schlechten Löslichkeit dieser Substanz sind die Messwerte für das Calixarendervat mit einem höheren Fehler behaftet als die übrigen Verbindungen, was keine Kurvenanpassung zuließ.

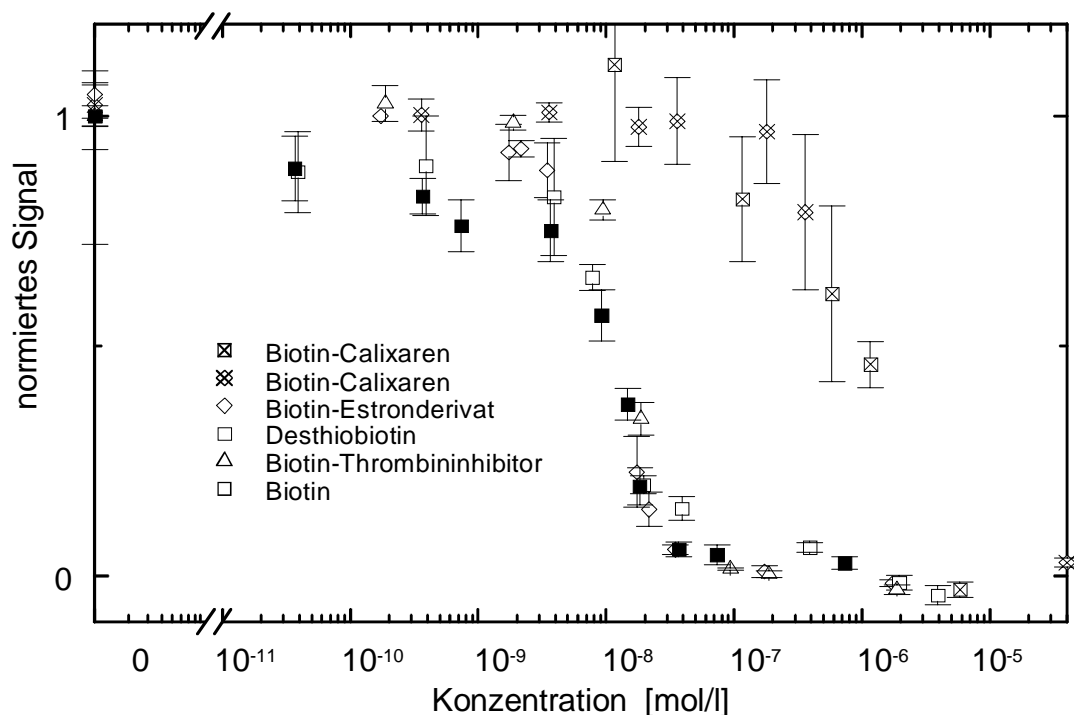


Fig. 27: Titrationskurven für verschiedene Biotinderivate auf einer AMD-Biotin-Oberfläche mit Avidin (500 ng/ml)

Mit den vorhandenen Messwerten konnte somit gezeigt werden, dass sich die Affinität eines der Derivate deutlich von der des Biotin unterscheidet. Eine Bestimmung der Affinitätskonstanten mit Hilfe der entwickelten Anpassungsfunktion scheiterte allerdings an den zu hohen Affinitätskonstanten.

4.1.1.5 Kovalente Immobilisierung von Avidin und Streptavidin

Avidin und Streptavidin können wie alle Proteine, prinzipiell über freie Amino-, Carboxy- oder Thiolgruppen auf den Sensoroberflächen immobilisiert werden. Avidin kann darüber hinaus noch über die vorhandenen Zuckerreste gebunden werden. Die weitverbreitetste Methode ist dabei, Proteine über freie Aminogruppen mit zuvor aktivierten Carboxylgruppen der Oberfläche zur Reaktion zu bringen. Werden zur Aktivierung der Carboxylgruppen Systeme verwendet, die für einen Umsatz im wässrigen Milieu geeignet sind, so kann die Aktivierung und die anschließende Kupplung des Proteins zeitaufgelöst mit der RfS verfolgt werden, wie es im Folgenden gezeigt ist.

4.1.1.6 Kovalente Immobilisierung in der Flusszelle

Das zeitaufgelöste Verfolgen der kovalenten Avidinbindung ist auf Grund des relativ hohen Probenverbrauches von 50 µg Protein sicher nicht für Systeme geeignet, in denen das Avidin-Biotin Hilfssystem bei Routinemessungen eingesetzt wird. Von großem Wert ist dieses Vorgehen aber dann, wenn Reaktionsbedingungen gesucht werden, die zu einer maximalen Beladung der Oberfläche führen. Eine Carboxylgruppen tragende Transduceroberfläche wird dabei zuerst mit einer wässrigen Lösung aus EDC und NHS behandelt, was zur Bildung eines NHS-Aktivesters auf der Oberfläche führt. Dieser kann mit Aminogruppen von Proteinen spontan unter Bildung einer Amidbindung reagieren. Es ist entscheidend, nach der Aktivierung der Oberfläche für eine möglichst hohe Konzentration an Aminogruppen in Oberflächennähe zu sorgen, da in Konkurrenz zur Proteinkupplung die Hydrolyse des Aktivesters durch das Lösungsmittel Wasser erfolgt. Um dies zu erreichen, müssen die Ladungsverhältnisse von Oberfläche und Protein in der Gestalt berücksichtigt werden, dass ein Milieu geschaffen wird, in dem Oberfläche und Protein unterschiedliche Gesamtladungen aufweisen und es so zu einer attraktiven Wechselwirkung und damit zu einer hohen Proteinkonzentration in Oberflächennähe kommt. Die geringe Ionenstärke von HEPES-Pufferlösung unterstützt dabei die elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche. Die Carboxylgruppen erzeugen an den Oberflächen praktisch über den ganzen pH-Bereich eine negative Gesamtladung. Der pH-Wert der Proteinlösung muss deshalb in der Weise angepasst werden, dass das Protein eine positive Gesamtladung trägt, was bedeutet,

dass man einen pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes pI des Proteins wählen muss. Allerdings ist zu beachten, dass im sauren Milieu eine beschleunigte Hydrolyse des Aktivesters einsetzt. Außerdem liegen die Aminogruppen im Sauren in einer inaktiven protonierten Form vor. Damit ist der pH-Bereich einer effektiven Immobilisierung je nach pI des Proteins u. U. stark eingegrenzt. In Fig. 28 sind die Bindungskurven für die Immobilisierung von Avidin und Streptavidin aus einer HEPES-Pufferlösung (50 mM) bei pH 5 gezeigt. Während für Avidin (pI 10-11) eine Immobilisierung möglich ist, sind für Streptavidin (pI 5-6) die oben genannten Bedingungen nicht erfüllt.

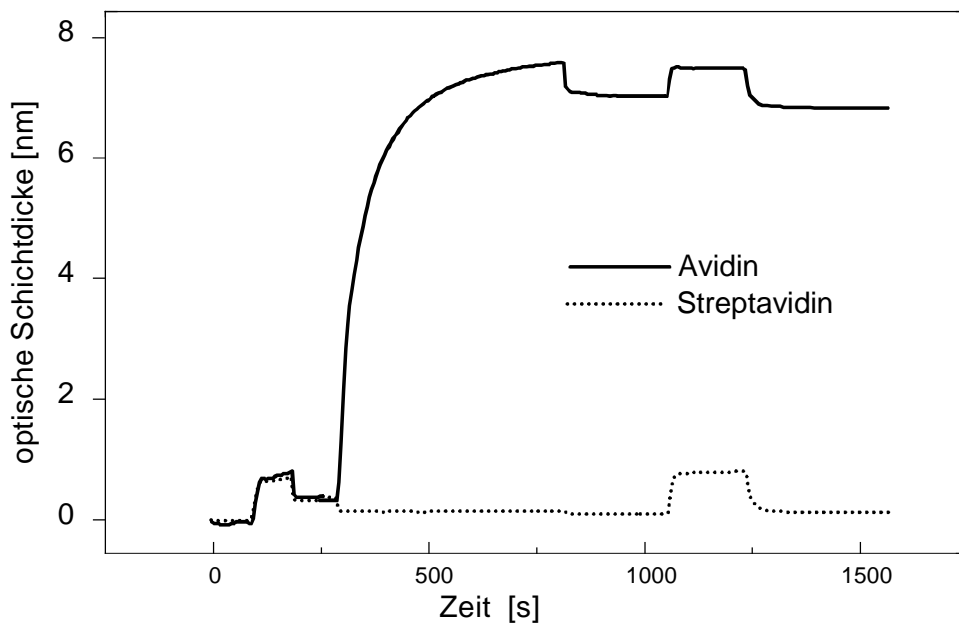


Fig. 28: Während sich Avidin problemlos kovalent immobilisieren ließ, waren die gewählten Bedingungen für eine Immobilisierung von Streptavidin nicht geeignet. Gezeigt ist die Aktivierung mit NHS/EDC, die kovalente Immobilisierung des Proteins und anschließend die Desaktivierung durch Ethanolaminlösung.

Um für beide Proteine ideale Bedingungen zu ermitteln, wurde die kovalente Immobilisierung bei unterschiedlichen pH-Werten auf carboxylierten AMD- und auf Dicarboxy-PEG Oberflächen durchgeführt. Daneben wurde auch p-Streptavidin untersucht, das einen ähnlichen pI wie Streptavidin besitzen sollte. Die Ergebnisse sind in Fig. 29 zu sehen.

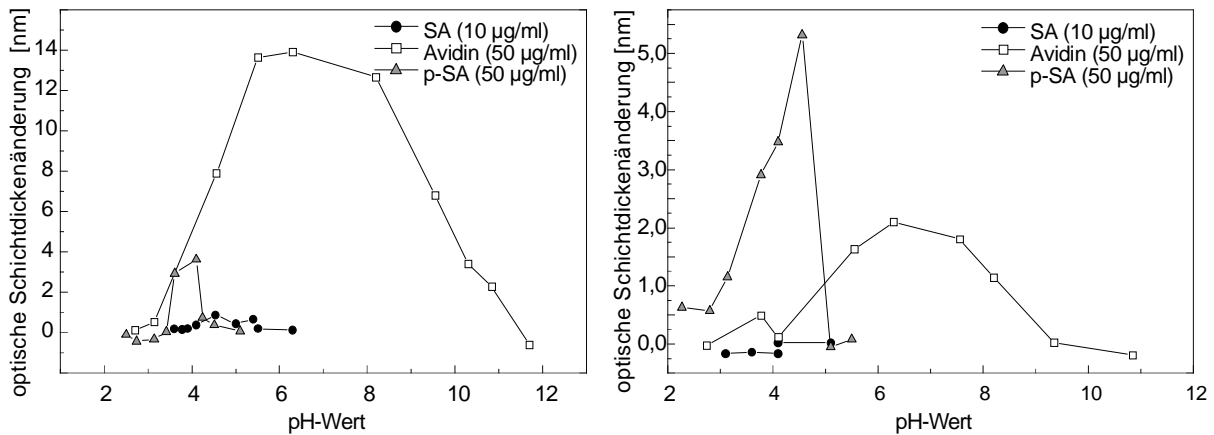


Fig. 29: Signaländerung bei der kovalenten Immobilisierung von Avidin, Streptavidin und p-Streptavidin auf carboxymodifizierten Oberflächen in Abhängigkeit des pH-Wertes der verwendeten HEPES-Pufferlösung (50 mM). Links: carboxyliertes AMD, rechts Carboxy-PEG.

Die untere pH-Grenze für eine Immobilisierung wird vom hydrolysierenden Aktivester bestimmt und liegt unabhängig vom verwendeten Protein bei $\text{pH} < 4$. Dies gilt für beide carboxylierten Oberflächen. Avidin konnte in einem weiten Bereich von $\text{pH} 4 - 10$ immobilisiert werden, maximale Belegung wurde zwischen $\text{pH} 6$ und $\text{pH} 8$ erreicht. Demgegenüber war es nicht möglich, Streptavidin in befriedigender Menge zu immobilisieren. Etwas besser waren die Ergebnisse mit dem polymeren p-Streptavidin, das bei $\text{pH} 4 - 5$ in Submonolagen immobilisiert werden konnte.

Somit konnte im Fluss nur das wegen der erhöhten unspezifischen Bindung für Biosensoren problematische Avidin in ausreichender Menge immobilisiert werden. Für Streptavidin musste das Protokoll weiter modifiziert werden.

4.1.1.7 Kovalente Immobilisierung von Streptavidin mit Hilfe eines Mikrodosiersystems

Um die für Streptavidin ungünstigen elektrostatischen Verhältnisse zu umgehen, wurde die Proteinlösung mit Hilfe eines Mikrodosiersystems aufgebracht. Dabei kommt es zum Verdampfen des Lösungsmittels und somit zu einer enormen Aufkonzentration der Proteinlösung an der Oberfläche. Allerdings entzieht sich damit die Bindung von Streptavidin an die Oberfläche einer direkten Beobachtung mittels RfS.

Während bei der Immobilisierung im Flusssystem nur wässrige Reaktandlösungen verwendet werden können, konnte die Aktivierung der Carboxylgruppen hier in DMF mittels NHS/DIC-Chemie durchgeführt werden. Damit wird eine Hydrolyse des Aktivesters vor der Proteinzugabe verhindert. Getropft wird bei einer Temperatur von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dabei verdampft das Lösungsmittel Wasser innerhalb von wenigen Sekunden, die Proteinlösung wird

aufkonzentriert und die Ausbeute der Amidbildung erhöht sich. Die hohen Stabilitäten von Avidin und Streptavidin garantieren, dass die Aktivität zu Biotin bei dieser Prozedur nicht beeinträchtigt wird. Die Effektivität dieses Protokolls wurde überprüft, indem im Fluss biotinyliertes Estronderivat (Biotin-E13CME) auf den Schichten immobilisiert und anschließend die Bindungskapazität des α E1-Antikörpers bestimmt wurde. Dazu wurden die Oberflächen vor den Messungen 5 mal im Fluss mit HCl und Acetonitrillösung behandelt, um nicht kovalent gebundenes Protein von der Oberfläche zu entfernen. Typische Bindungswerte sind in Tabelle 5 gezeigt. Mit dieser Methode konnten alle Proteine problemlos immobilisiert werden.

Tabelle 5 Eigenschaften von Schichten, bei denen die Proteinlösung mit einem Mikrodosiersystem auf die Aktivesteroberfläche einer carboxylierten AMD-Schicht getropft wurde. Die optische Schichtdickenänderungen sind in nm angegeben.

	Biotin-E13CME	α E1 (50 μ g/ml)	Unspezifisch	Stabilität
Avidin	0,15	2,7	Hoch	-
Streptavidin	0,30	3,0	Gering	++
p-Streptavidin	0,65	7,2	Gering	++

Die Stabilität der Schichten wurde daran gemessen, ob bei wiederholtem Messen unter diffusionslimitierenden Bedingungen lineare Bindungskurven erhalten wurden. Dies war gegeben und ist in Fig. 30 am Beispiel der erfolgreichen Titration von α E1 mit E13CME gezeigt.

Im Gegensatz zu Streptavidinschichten, bei denen das Protein über eine Biotinbindung an der Oberfläche verankert ist, waren die kovalenten Streptavidinschichten über mehrere Jahre hinweg stabil. In Fig. 30 sind Titrationskurven mit gleichzeitig hergestellten Oberflächen gezeigt, wobei eine sofort verwendet und die zweite 27 Monate bei +4°C gelagert wurde. Die Bindungskapazität reichte auch nach 27 Monaten Lagerung noch aus, auf solchen Transducern Titrationsexperimente durchzuführen. Im Rahmen der Messgenauigkeit wurden praktisch identische Kurven erhalten.

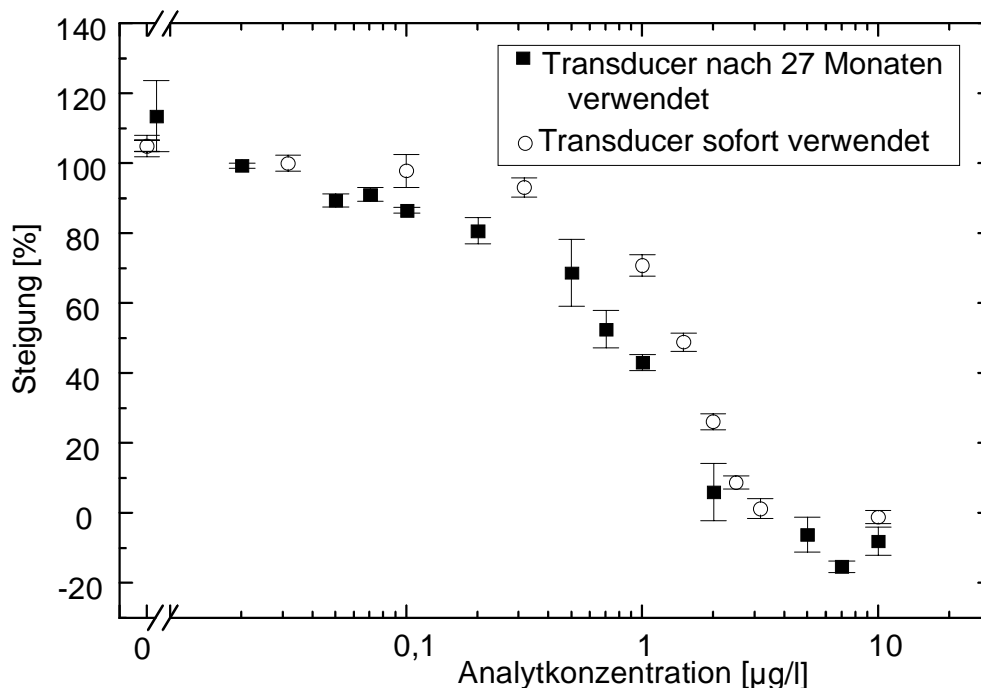


Fig. 30: Titrationskurven auf getropften Streptavidinschichten die mit biotinyliertem Estronderivat weitermodifiziert wurden. Untersucht wurde die Wechselwirkung des α E1 Antikörpers (259 ng/ml) mit dem Estronderivat E13CME in Lösung.

4.1.2 IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN ÜBER EINEN POLY-HISTIDIN-ABSCHNITT IN DER PROTEINSEQUENZ

Auf molekularbiologischem Weg werden zur Proteinaufreinigung häufig poly-Histidinketten an Proteine angehängt. Dieser His-Tag kann auch zur Immobilisierung auf Sensoroberflächen verwendet werden. Dazu muss, wie bei der Metallaffinitätschromatographie auch, ein Nitrilotriessigsäuremolekül (NTA) auf dem Trägermaterial (hier dem RfS-Transducer) immobilisiert werden. Nach einer Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte NTA aus einer Lösung von 7,2 mg/ml (50 mM HEPES pH 5,0) immobilisiert werden. Die Bindungssignale der Oberflächenaktivierung durch NHS/EDC-Lösung, die Kupplung von NTA und die anschließende Desaktivierung nicht umgesetzten Aktivesters sind in Fig. 31 gezeigt.

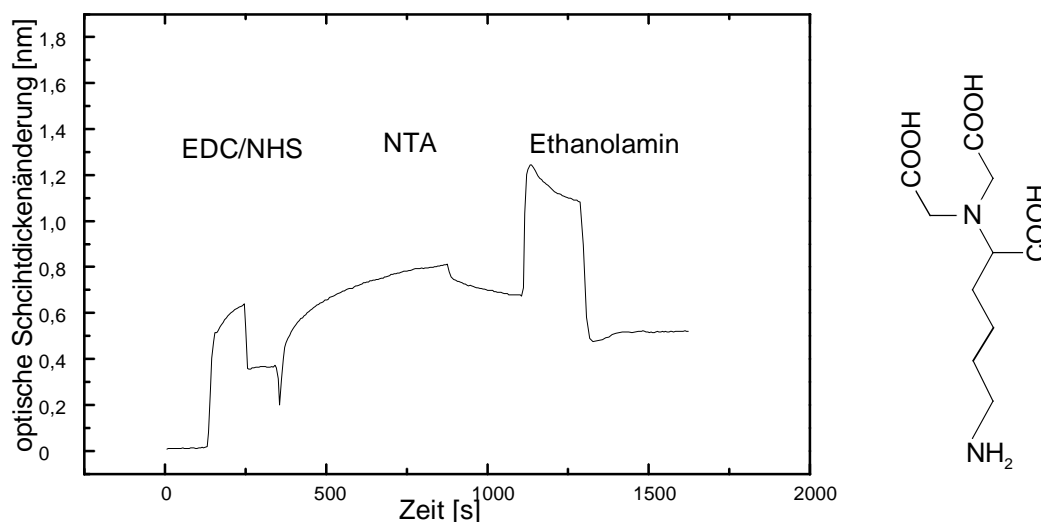


Fig. 31: Kovalente Immobilisierung von NTA mit der endständigen Aminogruppe auf einer carboxylierten AMD-Oberfläche über einen NHS-Aktivester im Fluss. Rechts ist die Strukturformel des NTA gezeigt.

Nach der Inkubation von NTA war bei ca. 800 s eine Abnahme der optischen Schichtdicke zu beobachten. Hier wurde adsorbtiv gebundenes NTA von der Oberfläche weggespült. Nach der Desaktivierung von überschüssigem Aktivester durch Ethanolamin wurde nach 1500 s ein stabiles NTA Signal von 0,5 nm opt. Schichtdicke erhalten. Die Menge an gebundenem NTA hing dabei von der Konzentration der NTA-Lösung ab. Dies zeigte sich u.a. beim Versuch, His-Tag-Proteine an die NTA-Oberfläche zu binden. Bei NTA-Konzentrationen von 7,2 mg/ml konnten Monolagen an His-Tag-Fusionsproteinen immobilisiert werden, während bei NTA-Konzentrationen von < 1 mg deutlich weniger His-Tag-Fusionsprotein immobilisiert werden konnte. Niedrig beladene Oberflächen eignen sich zur Bestimmung der Bindungskinetik an die NTA-Oberfläche. Ein Beispiel für eine hochbeladene Oberfläche ist in Fig. 32 zu sehen.

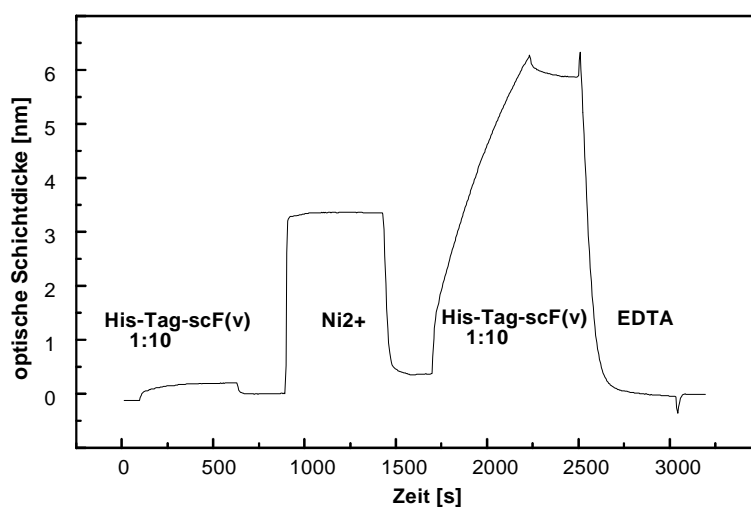


Fig. 32: Unspezifische und spezifische Bindung eines His-Tag-scF(v) auf einer NTA Oberfläche vor und nach Beladung mit Ni²⁺.

Beim verwendeten His-Tag Fusionsprotein handelte es sich dabei um ein single-chain-Antikörperfragment scF(v)⁴. Da die Konzentration der Proteinlösung nicht bekannt war, sind bei diesem Protein im Folgenden relative Konzentrationen bei Verdünnung mit PBS angegeben. Eine 1:10 verdünnte Proteinlösung zeigte nur sehr geringe unspezifische Wechselwirkung mit der NTA-Oberfläche (100-600 s). Beim Beladen der NTA-Moleküle mit Ni²⁺-Lösung (0,1 M NiSO₄; 0,3M TRIS; pH 7,6; 900-1450s) bildete sich ein Chelatkomplex. Die Signaländerung war dabei nicht auf das Binden der kleinen Ni²⁺-Ionen, sondern auf das Wechseln der Pufferlösung zurückzuführen. An diesen Chelatkomplex konnte das His-Tag-Fusionsprotein spezifisch binden (1750-2200 s). Bei der Regeneration mit EDTA (2500-3000s) wurde wieder eine freie NTA-Oberfläche erhalten. Danach konnte die Oberfläche erneut mit Ni²⁺ und anschließend mit His-Tag-Protein beladen werden. Da es sich bei EDTA aus der Sicht der Sensoroberfläche um ein sehr schonendes Regenerationsmedium handelt, zeigen solche Schichten nur sehr geringe Alterungserscheinungen durch das Regenerieren. In Fig. 33 ist die wiederholte, reproduzierbare Beladung einer NTA-Oberfläche mit scF(v) gezeigt.

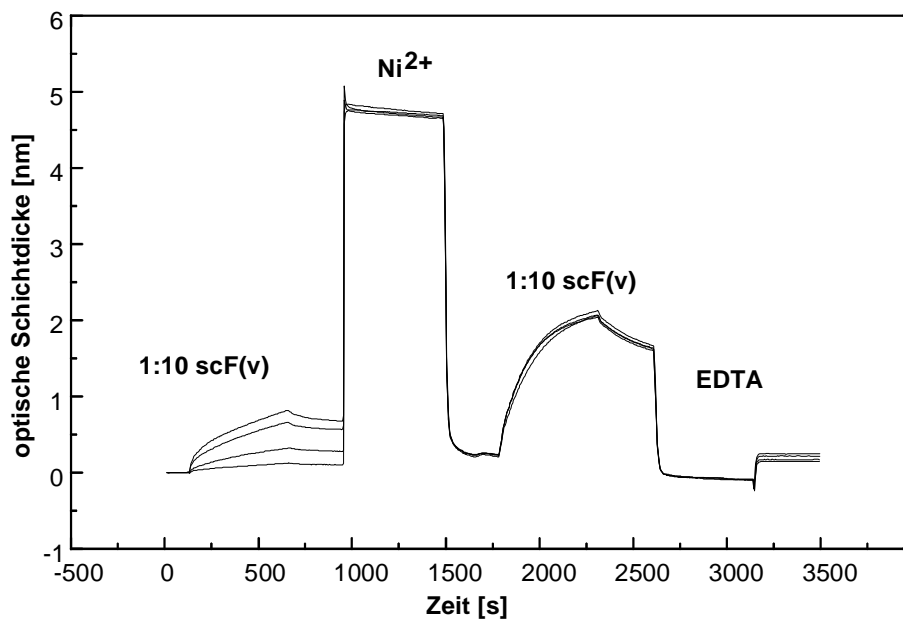


Fig. 33: Stabilität von NTA-Schichten. Die Signale sind auch nach mehrfacher Belegung und Regeneration unverändert. Die scheinbar erhöhte unspezifische Bindung vor Ni²⁺-Beladung erklärt sich durch eine unvollständige Regeneration der Ni²⁺-Oberflächen im vorangegangenen Zyklus.

Durch eine geringere Beladung mit NTA (0,7 mg/ml, HEPES 50 mM, pH 5,0) kam es bei gleicher Proteinkonzentration zu einer deutlich geringeren Gleichgewichtsbeladung als in Fig.

⁴ His-Tag Fusionsproteine wurden freundlicherweise von Dr. Markus Enzelberg, Dr. Stefan Minning und Dr. Stefan Lange zur Verfügung gestellt.

32. Sie blieb über viele Messungen konstant. Diese beiden Faktoren erlauben es prinzipiell, auf einer solchen Oberfläche die Bindungskinetik des His-Tag-Proteins an die Oberfläche zu verfolgen. Die scheinbare Erhöhung der unspezifischen Bindung in Fig. 33 (100-700 s) rührt daher, dass durch einmaliges Injizieren von Regenerationslösung nicht sämtliche Oberflächen-Nickelkomplexe gelöst wurden, so dass bei erneuter Probenzugabe noch spezifische Bindung möglich war. Deshalb wurde bei den Messungen zur Abschätzung der kinetischen Parameter mehrfach regeneriert. Dabei trat dieser Effekt nicht mehr auf.

Bei kinetisch kontrollierter Bindung an die Oberfläche kann mit Formel 3 eine observable Assoziationskonstante k_{obs} ermittelt werden, bei deren Auftragung gegen die Zeit sich ein linearer Zusammenhang ergibt, über den mit Formel 4 auf k_a und k_d geschlossen werden kann, wenn die Proteinkonzentrationen bekannt sind.

Neben dem bereits erwähnten scF(v)-His-Tag wurde mit dem Green Fluorescence Protein (GFP) ein weiteres His-Tag-Fusionsprotein untersucht. In Fig. 34 sind für beide Systeme die Bindungskurven gezeigt. Auf Grund der geringen Probenmenge, die zur Verfügung stand, wurde z.T. auf Mehrfachmessungen verzichtet. Die durch Kurvenanpassung erhaltenen Werte für k_{obs} sind ebenfalls in Fig. 34 zu sehen.

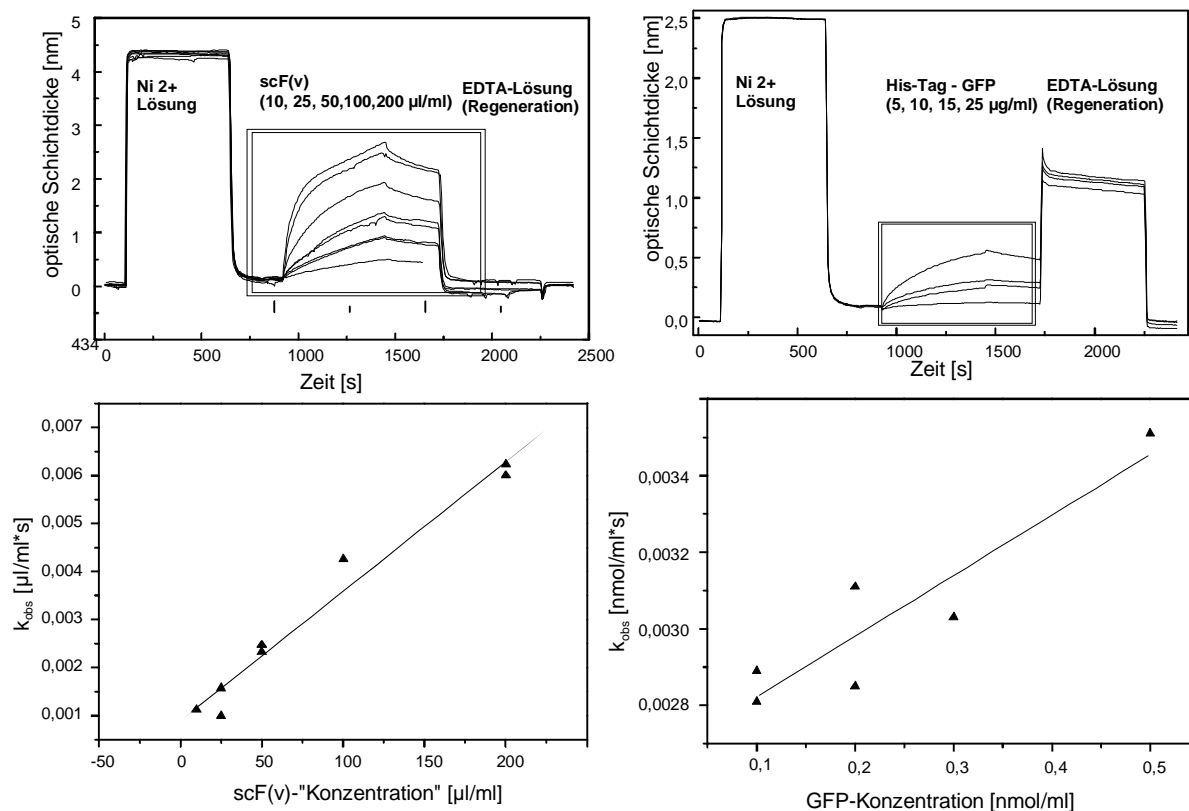


Fig. 34: Messkurven und Auswertung zur Bestimmung der kinetischen Parameter von His-Tag-Proteinen auf den entwickelten NTA-Oberflächen. Auf Grund der geringen vorhandenen Probenmenge und somit Probenzahl war lediglich eine Abschätzung der Parameter möglich.

Für beide Systeme ergibt sich für k_{obs} die aus der Theorie geforderte lineare Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Für das scF(v)-His-Tag waren die Absolutkonzentrationen nicht bekannt, deshalb können die kinetischen Parameter nicht bestimmt werden. Für das GFP-His-Tag ergeben sich die in Tabelle 6 zusammengestellten Werte.

Tabelle 6 Kinetische Parameter für die Wechselwirkung von GFP-His-Tag mit der Nickel-NTA-Oberfläche.

	k_a	k_d	K	K Literatur *)
GFP-His-Tag	$1,58 \cdot 10^4 \pm$ $0,34 \cdot 10^4 \text{ 1/M*s}$	$2,66 \cdot 10^{-3} \pm$ $0,09 \cdot 10^{-3} \text{ 1/s}$	$5,96 \cdot 10^6 \pm$ $1,3 \cdot 10^6 \text{ 1/M}$	$1,4 \cdot 10^6 \text{ 1/M}$

*) Nieba *et al.* 1997: Untersuchung eines His-Tag-scF(v) mit SPR.

Obwohl diese Ergebnisse auf Grund mangelnder Probenmenge nur als Abschätzung angesehen werden sollten, zeigen sie eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NTA erfolgreich auf der Sensoroberfläche immobilisiert wurde. Durch Variation der NTA-Konzentration kann die Bindungsstellendichte an der Oberfläche der jeweiligen Problemstellung angepasst werden. Insbesondere sind solche Oberflächen auch dazu geeignet, die kinetischen Daten für die Tag-Bindung an der Oberfläche zu bestimmen.

4.2 Parallele RfS-Messungen

4.2.1 GRUNDLEGENDE CHARAKTERISIERUNGEN DES PARALLELEN RfS-AUFBAUS

Neben dem sequenziellen Auslesen weniger Stützwellenlängen und dem veränderten Einstrahlwinkel lag der Hauptunterschied zum Einkanalssystem in der Größe der auszuleuchtenden Transducerfläche des BioSpec. Während die ausgewertete Fläche beim Einkanalssystem ca. $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$ betrug, mussten auf dem BioSpec $80 \times 108 \text{ mm}^2$ ausgeleuchtet werden. Damit wurden aber sowohl an die Mikrotiterplatten als auch an den optischen Aufbau hohe Anforderungen in Bezug auf die für eine Signalhomogenität verantwortlichen Parameter gestellt. In vielen Fällen wurden jedoch bei Untersuchungen, bei denen in sämtlichen Wells einer Mikrotiterplatte das gleiche Experiment durchgeführt wurde, unterschiedliche Signale gefunden. Da sich aus den RfS-Signalen nicht direkt ableiten lässt, ob diese Signalinhomogenitäten von den optischen Komponenten, also der Homogenität der Ausleuchtung, von äußeren Einflüssen wie Temperaturgradienten auf der Platte oder von einer der Schichten des Transducers abhing, wurden hierzu zuerst vergleichende

Untersuchungen durchgeführt. Weiterhin musste die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit des BioSpec mit der des Einkanalsystems verglichen werden.

4.2.1.1 Homogenität der Platten und der Bindungssignale

Typischerweise zeigten die absolut gemessenen Schichtdicken einer RfS-MTP unabhängig von einer Belegung mit Protein Inhomogenitäten, die sich in einem Schichtdickenverlauf über die Platte hinweg erstreckten, wie es in Fig. 35 zu sehen ist. Die Schwankungen auf den RfS-MTPs betragen bis zu 15 nm (Messung gegen Luft) bzw. bis zu 30 nm (Messung gegen Wasser). Der Unterschied beim Messen dieser unterschiedlichen Medien rührte dabei hauptsächlich von den unterschiedlichen Reflektivitäten an den Grenzschichten SiO_2 -Luft und SiO_2 -Wasser her. Der Effekt war dabei von Platte zu Platte unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies machte bereits deutlich, dass Inhomogenitätseffekte im wesentlichen auf die RfS-Mikrotiterplatten und weniger auf die Ausleuchtung der Auswerteeinheit zurückgeführt werden konnten. Bestätigt werden konnte dies weiterhin, indem man solche Platten um 180° gedreht auf der Ausleseinheit positionierte und dabei weitestgehend ein zu Fig. 35 um 180° gedrehtes Intensitätsmuster erhielt.

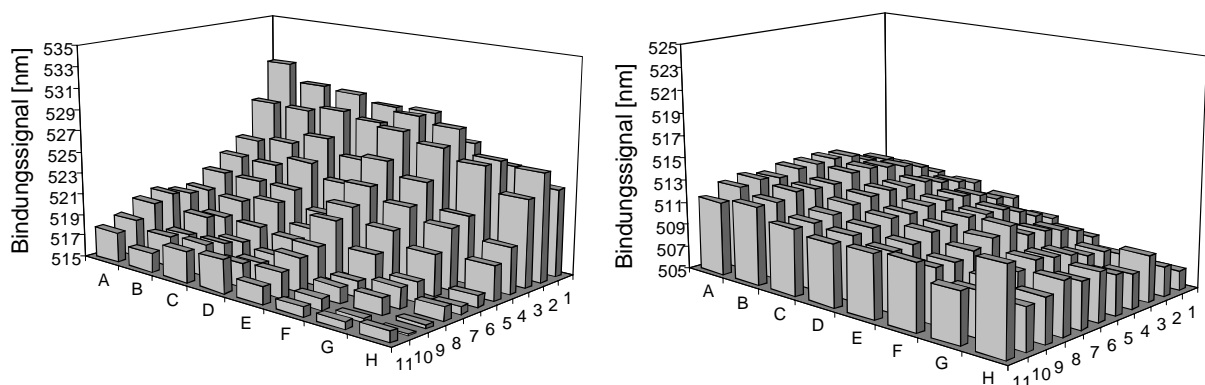


Fig. 35: Gegen Luft gemessene Absolutsignale zweier unterschiedlicher mit AMD belegter Platten.

Damit war allerdings noch nicht klar, welche Schicht des Transducers für die Signalschwankungen verantwortlich war. Möglich sind:

- (a) der Plastik-Kavitätenkörper bzw. die Verklebung mit dem Transducer (Verspannungen)
- (b) ein ungleichmäßiges Aufbringen der Dextranschichten
- (c) Unterschiedliche Dicken der Interferenzschichten
- (d) Inhomogenitäten in der Antireflexschicht

Dazu wurden Untersuchungen mit verklebten und unverklebten Transducern sowie mit Transducern mit und ohne Dextranschicht durchgeführt. Bei allen Messungen zeigte sich sowohl gegen Luft als auch gegen Wasser oder Pufferlösung, dass weder der Vorgang des Verklebens noch das organische Schichtsystem für die Inhomogenitäten verantwortlich gemacht werden können. Damit konnte die Ursache auf Inhomogenitäten im anorganischen Schichtsystem reduziert werden. Allerdings konnte bei einer Messung weder auf die Interferenzschicht noch auf die Antireflexschicht verzichtet werden, was zur Folge hatte, dass diese Schichten mit der RfS nicht getrennt charakterisiert werden konnten. Die Vermutung, dass die Antireflexschicht als Ursache für die Inhomogenitäten gesehen werden musste, lag allerdings nahe, wenn man die Ergebnisse mit denen von Schütz (Schütz 2000) vergleicht, der dort in einem ähnlichen Aufbau ohne Antireflexschicht mit einer Varianz von maximal 5 nm (Messung gegen Pufferlösung) von deutlich geringeren Platteninhomogenitäten berichtet. Da auf die Qualität der anorganischen Schichten kein direkter Einfluss genommen werden konnte, wurden zur Messung von Proteinwechselwirkungen Platten mit möglichst hoher Homogenität ausgesucht.

4.2.1.2 Abhängigkeit des Bindungssignals vom absoluten Schichtdickensignal

Eine Inhomogenität der Absolutsignale auf den MTP ist unproblematisch, wenn sich diese nicht auf die Bindungssignale, also nicht auf die Signaldifferenzen, auswirkt. Das einfachste Experiment zur Klärung dieses Sachverhaltes war die Untersuchung des Einflusses eines reinen Brechungsindexeffektes, der in den einzelnen Wells beim Wechsel von reinem Wasser ($n=1,333$) zu einer 10 %igen Glycerinlösung ($n=1,345$) als Probe auftrat. Da es sich um einen reinen Brechungsindexeffekt und nicht um eine Bindung an die Oberfläche handelte, war eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuell zusätzlich vorhandene Differenzen in der Bindungskapazität der Oberfläche ausgeschlossen. Die Bezeichnung „Bindungssignal“ war damit bei diesen Experimenten nicht korrekt, wurde aber zum Zweck der einheitlichen Bezeichnungsweisen trotzdem verwendet. In Fig. 36 ist der Signalverlauf während eines solchen Experiments exemplarisch für ein Well einer 96er RfS-MTP (AMD) gezeigt. Da das gemessene Bindungssignal nur vom Brechungsindex der Lösung abhing, erhielt man im Gegensatz zu typischen Bindungsexperimenten beim Wechsel der Proben eine Stufenfunktion, deren Höhe bei konstanten Randbedingungen nur von der Brechungsindexdifferenz der Proben abhängig war.

Die Abhängigkeit des Bindungssignals von der absolut gemessenen Schichtdicke kann aus Fig. 37 entnommen werden. Hier sind die Bindungssignale, die auf zwei Platten gleicher Belegung und unterschiedlicher Homogenität erhalten wurden, gezeigt.

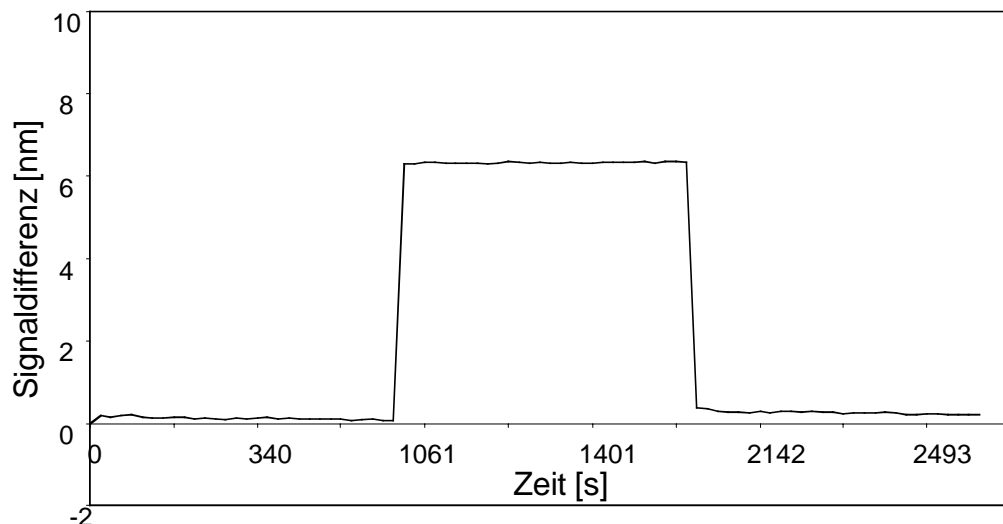


Fig. 36: Beispielkurve für die Signaländerung in einem Well einer 96 er RfS-MTP (AMD) beim Wechsel Wasser-Glycerinlösung-Wasser.

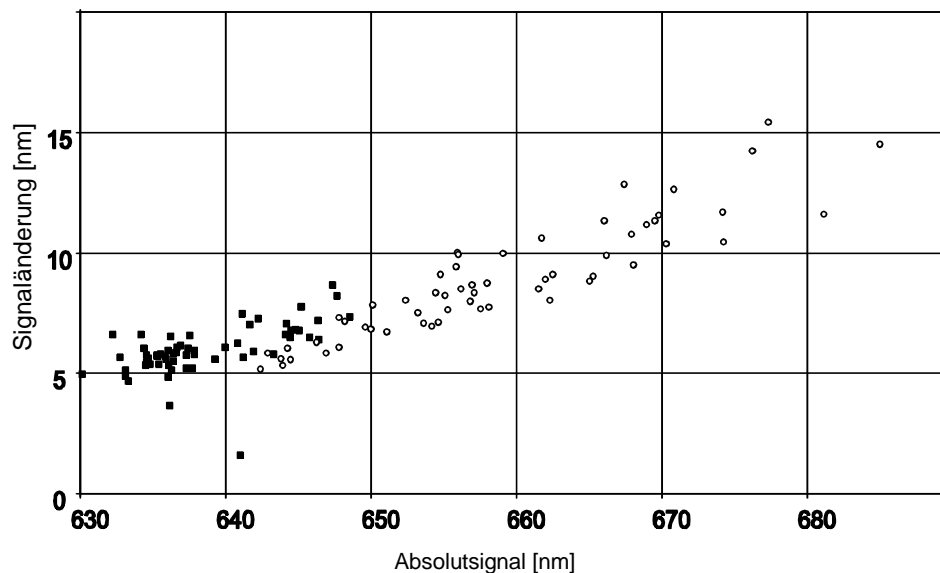


Fig. 37: Abhängigkeit des Differenzsignals vom absoluten Schichtdickensignal beim Wechsel zwischen Wasser und Glycerinlösung. Gezeigt sind die Signale einer einheitlichen (■) und einer sehr inhomogenen (○) RfS-MTP.

Deutlich war die Korrelation zwischen absolutem Schichtdicken- und Bindungssignal zu erkennen. Damit wurde gezeigt, dass die Platteninhomogenitäten unmittelbaren Einfluss auf die detektierten Bindungssignale nahmen. Diese Inhomogenität könnte mit Hilfe einer linearen Kalibrierkurve theoretisch berücksichtigt werden. In der Praxis zeigte sich jedoch vor allem bei der Untersuchung von Proteinbindung, dass die Streuung der Signale für eine sinnvolle Kalibrierung auf das Absolutsignal zu groß war. Damit war deutlich gezeigt, wie wichtig die Auswahl möglichst homogener Platten zur Untersuchung von Proteinbindungen war.

Um trotzdem auch auf inhomogeneren Platten zuverlässige Messergebnisse zu erzeugen, wurde – ebenfalls mit Hilfe des Systems Glycerinlösung/Wasser – eine weitere Kalibriermethode erarbeitet, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

4.2.1.3 Kalibrierung der Bindungssignale

Die bereits diskutierten Platteninhomogenitäten haben zwar nicht das Ausmaß, das eine Kalibrierung zwingend erforderlich machte, sobald allerdings Aussagen über eine qualitative Ja/Nein-Entscheidung hinaus getroffen werden sollten, waren unkalibrierte Datensätze nur begrenzt geeignet. Deshalb wurden verschiedene Ansätze für eine Kalibrierung verfolgt. Von Seiten der Gerätehardware konnte eine zusätzliche Kamerareferenzierung verwendet werden, über die das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen Kamerapixel erfasst wurde. Die Gerätesoftware ermöglichte es, die Interferenzspektren eines Wells auf jeweils ein Referenzspektrum zu normieren. Weiterhin wurde versucht, auf benachbarte Wells oder auf die Transducerfläche zwischen den Wells zu normieren. Alle diese Untersuchungen brachten jedoch kaum Verbesserungen und sollen hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Die sehr gute Reproduzierbarkeit von Einzelexperimenten konnte jedoch zur Kalibrierung der Bindungssignale benutzt werden. Diese Methode zeigte sich auch unter den realen Bedingungen eines Screeningexperiments als brauchbar.

In Fig. 38 ist das Signalverhalten beim wiederholten Wechsel zwischen Glycerinlösung und Wasser wie in 4.2.1.2 beschreiben gezeigt. Dabei wiesen sowohl die Signaldifferenzen als auch die absoluten Signale in einem Well eine sehr hohe Reproduzierbarkeit auf, eine Well-zu-Well-Reproduzierbarkeit hingegen wurde nicht erhalten. Die Well-zu-Well-Reproduzierbarkeit wurde dabei als das Verhalten benachbarter Wells bei gleicher Probe definiert. Im Balkendiagramm sind die mittleren Bindungssignale mit Standardabweichung für eine 96er RfS-MTP (AMD) angegeben. Mit der einmaligen Kalibriermessung einer Platte vor einer Messreihe konnte ein Datensatz erzeugt werden, auf den die Folgemessungen bezogen wurden, und somit konnten auch Well-zu-Well-Reproduzierbarkeiten erhalten werden.

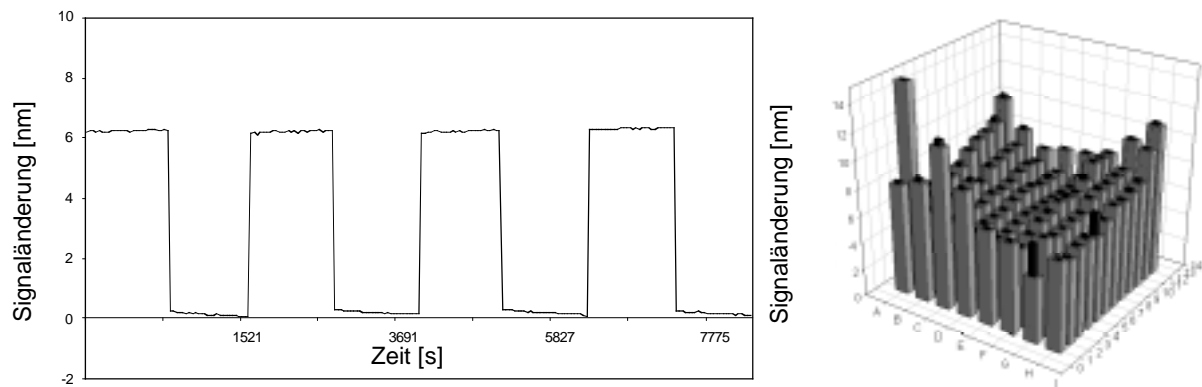


Fig. 38: Bindungssignale beim Wechsel zwischen Wasser und Glycerin (10% in Wasser). Links ist exemplarisch eine Messung in einem Well gezeigt. Rechts sind die Signaldifferenzen für eine 96er Platte mit Standardabweichungen gezeigt.

In Fig. 39 sind die absoluten Messwerte der Bindungssignale neben den referenzierten Bindungssignalen gezeigt. Bei einer Signalvarianz von über 50 % in den Rohdaten konnten die Werte mit Hilfe der Kalibrierung auf einen Signalbereich von 93 - 105 % normiert werden. Dass sich diese Kalibrieremethode auch auf die Untersuchung von Proteinbindungen anwenden ließ und dass damit auch eine Quantifizierung von Screeningdaten möglich wurde, ist in den jeweiligen Kapiteln zur Assayentwicklung dokumentiert.

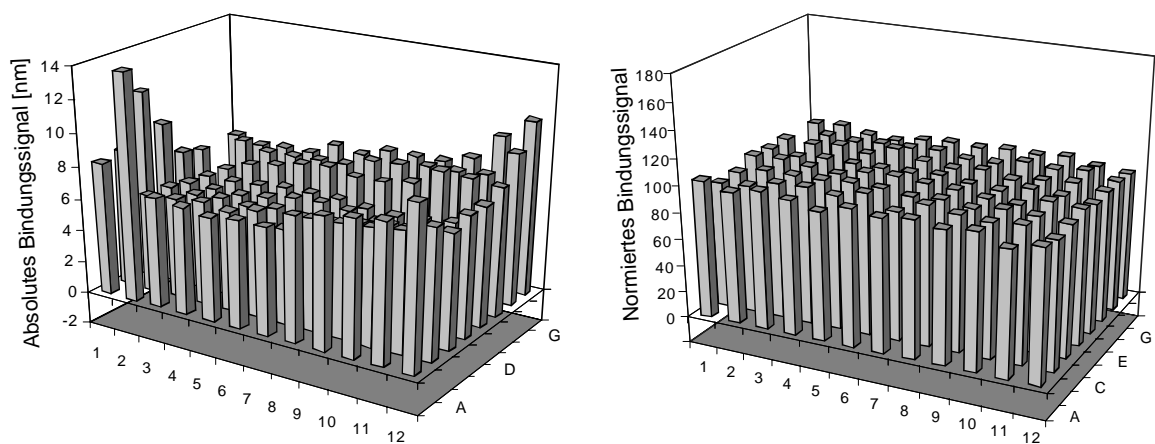


Fig. 39: Absolute und normierte Bindungssignale bei der Detektion des Einflusses einer Brechungsindexänderung auf einer 96er RfS-MTP (AMD).

4.2.1.4 Temperatureffekte

Da das BioSpec konzeptionell nicht für Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen vorgesehen war, wurde bei der Konstruktion sowohl auf eine Isolierung als auch auf eine aktive Temperierung von Detektionseinheit und RfS-MTP verzichtet. Obwohl keine Thermostatisierung vorhanden ist, kann es durch Schwankungen der Raumtemperatur zur Beeinflussung der Messergebnisse kommen. In einem nicht klimatisierten Raum beträgt die Tagesschwankung in der Regel maximal 5°C (Clemens 2000), für klimatisierte Laborräume

kann eine deutlich kleinere Temperaturschwankung angenommen werden, die im Idealfall unter $1^{\circ}\text{C}/\text{Tag}$ liegt. Damit war während einer Messung mit Temperaturschwankungen $<0,2^{\circ}\text{C}$ zu rechnen. Um den evtl. störenden Einfluss einer Temperaturschwankung zu untersuchen, wurde eine mit PBS-Pufferlösung gefüllte 96er RfS-MTP (AMD) auf 14°C abgekühlt und das Schichtdickensignal während der Erwärmung auf Raumtemperatur (23°C) verfolgt. Diesen Schichtdickenverlauf gibt

Fig. 40 in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Die absoluten Schichtdickensignale wurden dabei auf den Wert bei 23°C (Messung Nr. 350) normiert. Der hyperbolische Kurvenverlauf kommt dabei nicht durch einen entsprechenden Zusammenhang von Schichtdickenänderung und Temperatur zustande, sondern spiegelt lediglich die sich hyperbolisch an die Raumtemperatur annähernde RfS-MTP Temperatur wieder. Vielmehr konnte ein linearer Zusammenhang von Temperatur und Schichtdickensignal bzw. Schichtdickensignaländerung beobachtet werden (Fig. 41) was am Einkanalssystem bestätigt werden konnte (Jung 2001, Wegner 2001).

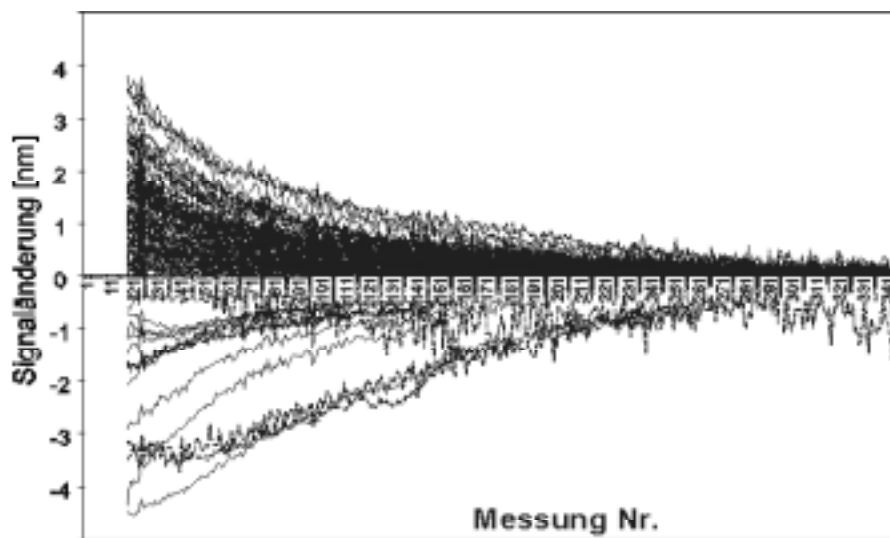


Fig. 40: Messung des Basisliniensignals beim langsamen Erwärmen einer mit Puffer gefüllten RfS-MTP (AMD) von 14°C auf 23°C .

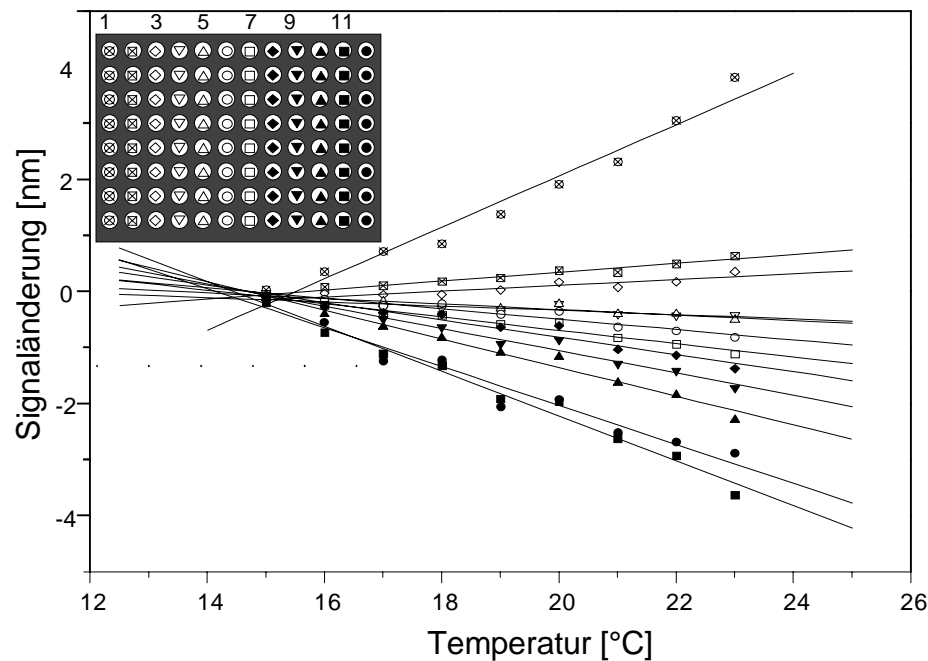


Fig. 41: Der Temperatureffekt auf die Basisliniendrift in Abhängigkeit von der vertikalen Position des Wells auf einer 96er RfS-MTP (AMD).

Erstaunlicherweise war die Temperaturabhängigkeit dabei nicht für die ganze Auslesefläche dieselbe. Vielmehr zeigte sich ein Verlauf der Temperaturabhängigkeit auf der Platte von links nach rechts. Während in lampenseitigen Wells (Reihe 10-12) eine starke Abnahme der Schichtdicke mit der Temperatur gefunden wurde, zeigten kameraseitige Wells (2-5) praktisch keine Temperatureinflüsse (Fig. 41). Die Ergebnisse in Reihe 1 (⊗, Schichtdickenanstieg bei Temperaturerhöhung) dürfen dabei auf Grund der gerätebedingten mangelhaften Ausleuchtung dieser Wells nicht berücksichtigt werden. Insgesamt lagen die Temperaturabhängigkeiten bei Werten von $+0,08\text{nm}/^\circ\text{C}$ bis $-0,34\text{ nm}/^\circ\text{C}$ in einem Bereich, der deutlich über den am Einkanal erzielten Ergebnissen lag ($0,01\text{ nm}/^\circ\text{C}$, Wegner 2001). Allerdings sind die Temperaturabhängigkeiten noch immer so gering, dass sie, vor allem im Hinblick auf das gegenüber dem Einkanalssystem erhöhte Rauschen (vgl. 4.2.1.5), im Bindungsexperiment vernachlässigt werden können.

4.2.1.5 Signalrauschen und dessen Abhängigkeit von der ausgewerteten Fläche

Maßgeblich verantwortlich für die Nachweisgrenze eines RfS-Aufbaus ist das Signalrauschen (daneben spielen die Oberflächenbeladbarkeit, die Natur der untersuchten Wechselwirkung und die Empfindlichkeit eine Rolle). Bei der RfS sind die Bindungssignale im Gegensatz zu fluoreszenzbasierten Methoden wie z.B. TIRF unabhängig von der ausgelesenen Fläche, da keine über eine Fläche integrierte Fluoreszenzintensität, sondern die absolute optische Schichtdicke bestimmt wird. Allerdings korreliert das Signalrauschen mit der Auslesefläche, denn mit kleiner werden Wells reduziert sich die zur Auswertung genutzte

Pixelzahl (Fig. 42). Dies gilt – wie es beim BioSpec der Fall ist – nur dann, wenn trotz reduzierter Wellfläche die Gesamtplattenfläche konstant bleibt. Also z.B. beim Übergang von 96- zu 384- und 1536-Well-Platten. Für miniaturisierte Systeme (kleine Wells aber auch kleine Gesamtplattenfläche) sollte das Rauschen durch ein vorteilhafteres Pixel:Well – Verhältnis wieder reduziert werden können (Jung 2001).

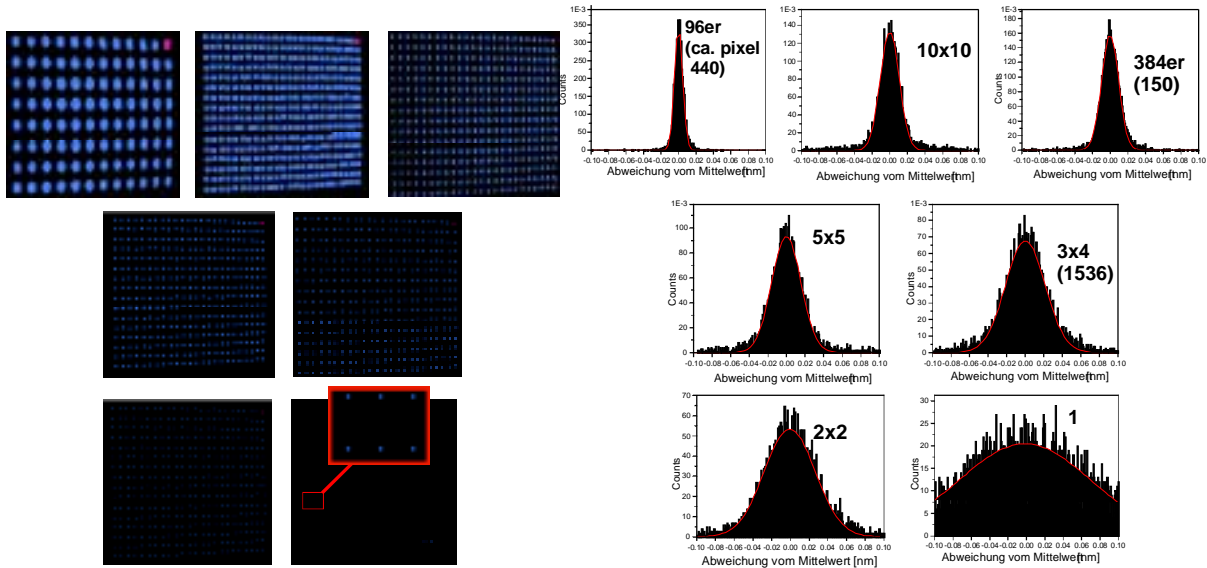


Fig. 42: Wellmasken, die zur Bestimmung der Abhängigkeit des Rauschens von der Wellgröße benutzt wurden und das damit erzielte Rauschen.

Um diese grundlegenden theoretischen Überlegungen zu überprüfen, wurden mit Hilfe der BioSpec-Software Wellmasken bei unterschiedlicher Wellgröße untersucht. Neben 96er (ca. 400 Pixel/Well) und 384er (ca. 150 Pixel/Well) Platten wurden auch Masken mit deutlich kleineren Wells generiert (10x10, 5x5, 3x4, 2x2, 1 Pixel/Well). Obwohl die Software auf eine Wellzahl von 384 beschränkt war, konnten somit Wells von höherparallele Platten (1536 Wells pro Platte und mehr) simuliert werden. Die verwendeten Wellmasken sowie das ermittelte Rauschen sind in Fig. 42 gezeigt. Das Rauschen wurde dabei als Häufigkeitsverteilung der Abweichung vom Mittelwert bei jeweils 4224 Messpunkten bestimmt. Falls neben der Pixelzahl keine weiteren Parameter das Rauschen beeinflussen, sollten die Standardabweichungen der Gaußkurve aus Fig. 42 proportional zur $(\text{Pixelzahl})^{-1/2}$ sein, was mit Fig. 43 gezeigt wurde.

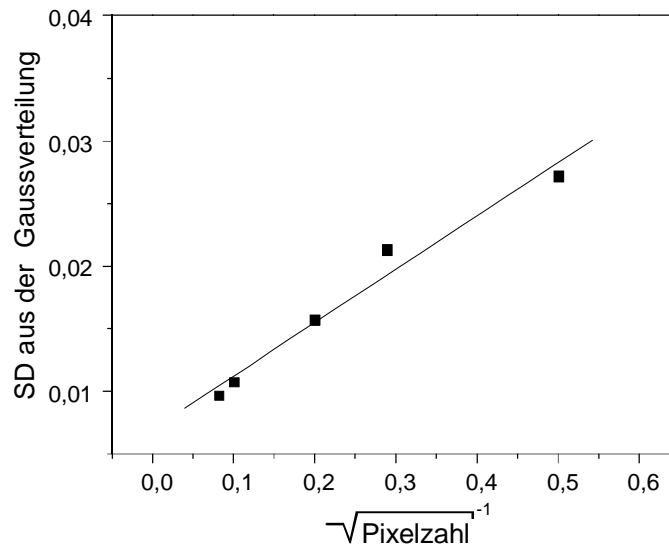


Fig. 43: Zusammenhang zwischen Wellgröße und Rauschen.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass selbst beim 96-Well-Format ein gegenüber dem Einkanalssystem deutlich erhöhtes Rauschen festgestellt wurde. Dieses hohe Rauschen ist dafür verantwortlich, dass mit dem BioSpec lediglich die Wechselwirkung von sehr großen Molekülen wie Proteinen untersucht werden können. Allerdings konnte bei den dabei beobachtbaren Signalen im Bereich von wenigen Nanometern selbst ohne Änderung des optischen Aufbaus ein Miniaturisierungspotential über das 1536er-Format hinaus bestätigt werden.

4.2.1.6 Die Plattenqualität im Hinblick auf unspezifische Bindung

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten diejenigen Eigenschaften charakterisiert wurden, die durch die physikalischen bzw. prozesstechnischen Randbedingungen festgelegt sind, wird hier auf die Qualität der nasschemisch aufgetragenen Aminodextran-Polymerschicht eingegangen. Ihre Aufgabe ist das Verhindern unspezifischer Wechselwirkung der zu untersuchenden Targets mit der Biosensoroberfläche. Dazu wurden die mit AMD belegten Mikrotiterplatten mit für Screeningexperimente vielfach überhöhter Konzentration an Proteinlösungen inkubiert und die Signale für unspezifische Bindung aufgezeichnet. Verwendet wurden hierzu Hühnerovalbumin (1 mg/ml), Rinderserumalbumin (1 mg/ml) und sterilisiertes Kälberserum (10% in PBS). Die Ergebnisse decken sich mit den Erfahrungen am Einkanalssystem (Fig. 44). Ovalbumin und Rinderserumalbumin zeigen nur minimale Bindung zur Aminodextranoberfläche. Lediglich Kälberserum, das bekanntermaßen extrem zur unspezifischen Adsorption neigt, zeigt Bindungssignale, die nicht vernachlässigt werden können.

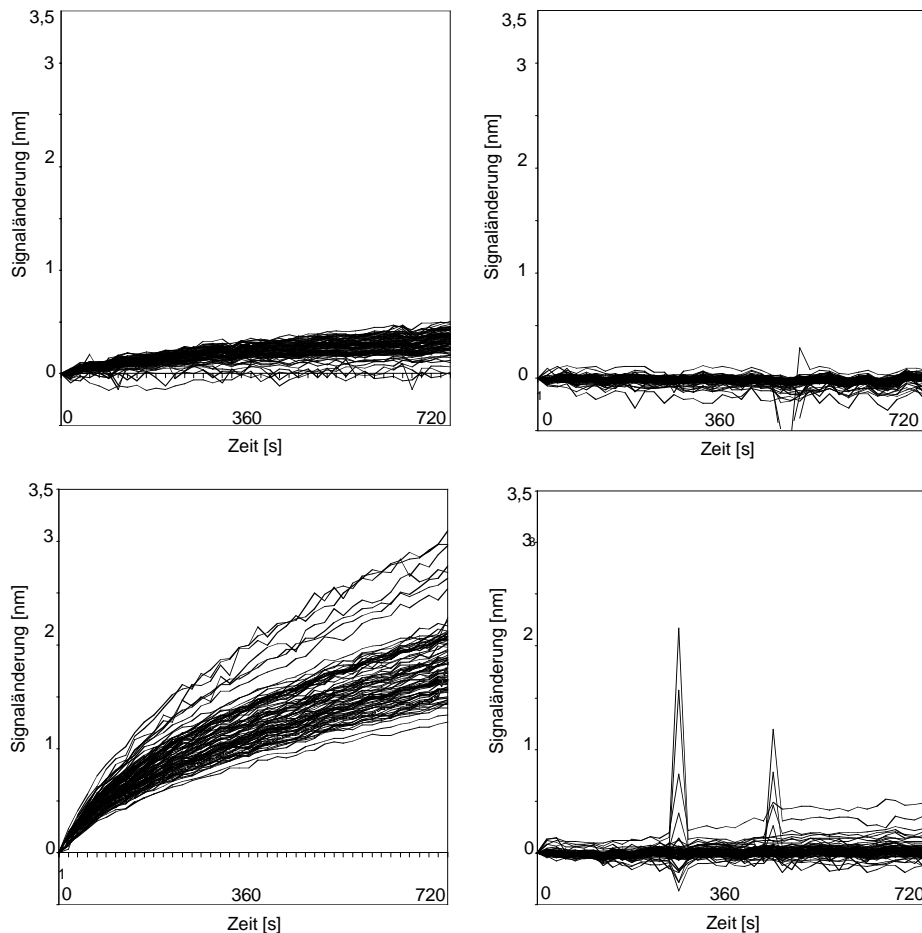


Fig. 44: Unspezifische Bindung in den Mikrotiterplatten. Oben: Belegung mit Ovalbumin (1 mg/ml) bei Erst- (links) und Folgemessung (rechts). Unten: Belegung mit Kälberserum (1:10 verdünnt, links) und Rinderserumalbumin (1 mg/ml, rechts).

In Fig. 44 ist in der oberen Hälfte gezeigt, dass Platten, die zum ersten Mal belegt wurden, ein erhöhtes Bindungssignal für unspezifische Wechselwirkung zeigten. Dabei wurden nicht ideal abgeschirmte Oberflächenregionen irreversibel abgesättigt, so dass bei den Folgemessungen keine störende unspezifische Bindung mehr detektiert werden konnte. Dieser singuläre Effekt war deutlich stärker ausgeprägt als beim Einkanalssystem und lässt, da das Aufbringen der AMD-Schicht bei beiden Systemen analog erfolgte, darauf schließen, dass die Aminodextranoberfläche beim Verkleben mit dem Plastikkörper verstärkt beansprucht wurde. Die Gefahr der Verletzung der AMD-Oberfläche war dabei an den Wellrändern besonders groß. Deshalb sollten Wellmasken möglichst so erzeugt werden, dass Signale der Kamerapixel, die den Randbereichen der Wells zugeordnet sind, nicht berücksichtigt werden. Mit Hilfe der Steuersoftware konnte die Erzeugung solcher Wellmasken auch automatisiert durchgeführt werden. Ausschnitte aus Wellmasken mit unterschiedlich starker Berücksichtigung der Wellränder sind in (Fig. 45) gezeigt.

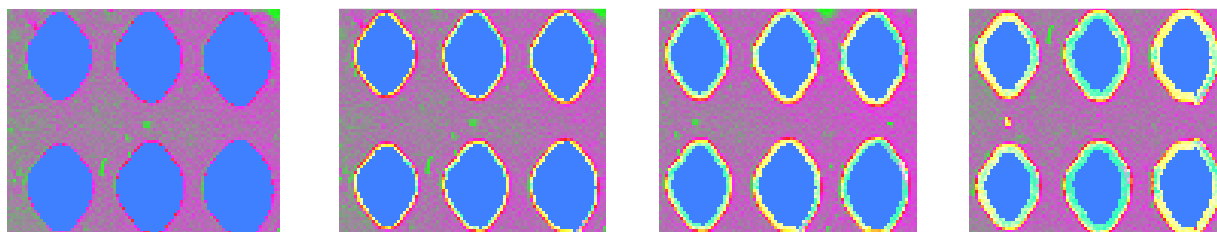


Fig. 45: Ausschnitt aus dem Kamerabild mit generierten Wellmasken für eine 96er RfS-MTP bei kompletter Auswertung des Wells bzw. bei einem Abstand zum Wellrand von 1,2 und 3 Pixel.

4.2.2 ASSAYENTWICKLUNG FÜR DAS SYSTEM THROMBIN/THROMBININHIBITOR

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten geklärt werden konnte, dass sowohl die Ausleseeinheit als auch die RfS-MTP prinzipiell zur Detektion von biomolekularer Wechselwirkung geeignet sind, wurde mit dem System Thrombin/Thrombininhibitor als erstem konkreten Beispiel im Hinblick auf ein Screening nach relevanten Wirkstoffen, ein in der Pharmaentwicklung relevantes und mit anderen Methoden bereits vielfach untersuchtes System, gewählt (vgl. Kap. 2.7). Für die Assayentwicklungen wurden verschiedene bereits bekannte Thrombininhibitoren eingesetzt, die im Rahmen einer Kooperation von der Firma Knoll AG (Ludwigshafen/Deutschland) erhalten wurden (Tabelle 7).

Tabelle 7 Zusammenstellung der verwendeten Inhibitoren.

	Standardinhibitor 393 g/mol
Code 14 ⁵	Inhibitor 1
Code 15	Inhibitor 2
Code 16	Inhibitor 3

Zunächst wurde untersucht, ob der spezifische Nachweis von Thrombin vom Einkanalssystem auf das 96er-Format des BioSpec übertragen werden kann. Danach wurde der Bindungsassay im Hinblick auf die Target- und Ligandkonzentrationen und die Dauer der Bindungsmessung hin optimiert. Damit war es möglich, über die reine Identifizierung einer aktiven Substanz

⁵ Die Strukturformeln fallen z.T. unter das Firmengeheimnis der Knoll AG und können deshalb hier nicht gezeigt werden. Es handelt sich um Strukturvarianten des Standardinhibitors.

hinaus deren Aktivität über ihren IC-50-Wert zu quantifizieren. Nach erfolgter Assayimplementierung auf 96er RIfS-MTPs wurde der Assay auf das 384er-System übertragen.

4.2.2.1 Spezifische Bindung von Thrombin

Um die spezifische Wechselwirkung von Thrombin über diejenige seiner Bindungstaschen, die für die enzymatische Spaltung von Fibrinogen verantwortlich ist, zu untersuchen, wurde eine RIfS-MTP (AMD) kovalent mit einem Ligand (=Standardinhibitor) modifiziert. Bei diesem Standardinhibitor handelte es sich um ein Derivat des bekannten Inhibitors Thrombostop (vgl. Kap. 2.7). Er wurde an seiner freien Aminogruppe über eine Amidbindung kovalent an die Dextranschicht immobilisiert. Dabei musste das am Einkanalssystem bereits entwickelte Immobilisierungsprotokoll überarbeitet werden, um dem Umstand, dass in den RIfS-MTPs mit Polystyrolkavitätenkörper keine organischen Lösemittel verwendet werden können, Rechnung zu tragen. Hierbei war von Vorteil, dass der verwendete Inhibitor sowohl im wässrigen Medium als auch in polaren organischen Lösemitteln (DMF, Methanol) sehr gut löslich war. Wasserunlösliche Liganden müssten, um reproduzierbar in Polystyrol-RIfS-MTPs immobilisiert werden zu können, zuerst in ein lösliches Derivat überführt werden. Daneben bestünde für solche Liganden auch die Möglichkeit, die RIfS-MTP mit einem gegen organische Lösemittel resistenteren Polypropylen-Kavitätenkörper zu versehen und dann in einem geeigneten Lösungsmittel zu arbeiten, in dem der Ligand ausreichende Löslichkeit besitzt. Alle im folgenden gezeigten Ergebnisse wurde mit Polystyrol-RIfS-MTPs bei Immobilisierung in wässrigem Milieu durchgeführt.

Eine in einer solchen MTP gemessene Bindungskurve bei Zugabe von Thrombin (20 µg/ml) und die anschließende Regeneration mit HCl (pH 1,5) ist in Fig. 46 gezeigt. Da die Probe in der MTP nicht gerührt wird, erfolgt die Diffusion nach dem 2. Fickschen Gesetz und man erhält unter diffusionslimitierter Bindung an die Oberfläche eine Bindungskurve in Form einer Wurzelfunktion (Schütz 2000).

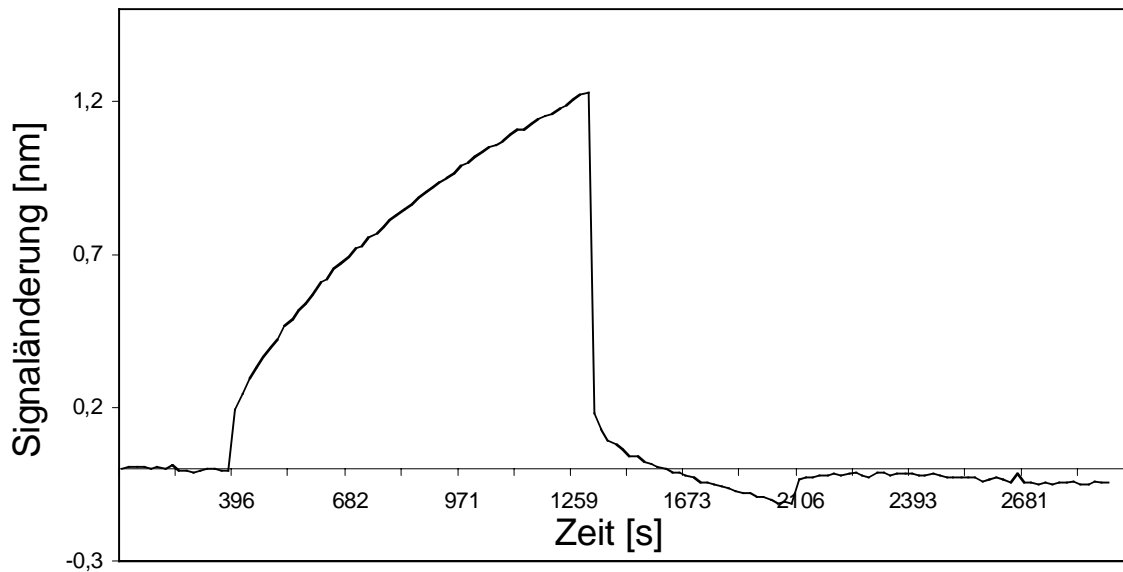


Fig. 46: Spezifische Bindung von Thrombin auf einer mit Inhibitor modifizierten Oberfläche in einem Well einer RfS-MTP (AMD).

Dabei ist das Bindungssignal zu einem festen Zeitpunkt direkt der Konzentration an freiem Thrombin in Lösung proportional. Zur Auswertung und Charakterisierung der Bindungskurven wurde deshalb die Differenz zwischen Startwert und letztem Bindungssignal vor dem Einpipettieren der Regenerationslösung herangezogen. Als Startwert kommen dabei das Basisliniensignal vor Bindung oder der erste Messpunkt der Bindungskurve in Frage:

Verwendet man das Basisliniensignal, so kann z.B. die Gleichgewichts- bzw. Maximalbelegung bestimmt und damit die Qualität der RfS-MTP festgelegt werden. Allerdings kann es durch Erschütterungen beim Pipettieren zu einem Versatz des Basisliniensignals und damit zu einer Verfälschung der Messwerte kommen. Dies ist besonders deshalb kritisch, weil dieser Versatz von Well zu Well in Größe und Richtung unterschiedlich ist. Dasselbe Problem tritt auf, wenn Platten von der Ableseposition abgehoben und wieder aufgesetzt werden. Ob ein solcher Effekt beim Messen aufgetreten ist, kann daran erkannt werden, dass selbst nach kompletter Regeneration ein zum Signal vor Bindung unterschiedliches Basisliniensignal erhalten wird. Die Kurve in Fig. 46 zeigt ein Well mit idealem Verhalten, bei dem dieser Versatz nicht auftritt.

Wegen den genannten Gründen wurde als Startwert der erste Punkt der Bindungskurve definiert. Bei hohen Targetkonzentrationen und einem damit verbundenen steilen Anstieg in der Bindungskurve muss man dabei einen Verlust beim Bindungssignal in Kauf nehmen. Dieser beträgt mit 0,2 nm in Fig. 46 15% des Gesamtsignals und entspricht der Differenz des Basisliniensignals und des ersten Bindungssignals, wenn kein Signalversatz auftritt.

4.2.2.2 Referenzieren der Thrombinbindungssignale

Wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, empfiehlt es sich auf Grund der vorhandenen Inhomogenitäten der RIfS-MTP, eine Referenzierung der Messsignale vorzunehmen. Im Fall der Bindung von Thrombin, wurde dabei einmal pro Tag das Bindungssignal von 20 $\mu\text{g/ml}$ Thrombin in der verwendeten RIfS-MTP registriert und zur Referenzierung verwendet. Damit sollten alle Proben, die ebenfalls eine Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ an freiem Thrombin beinhalten ein Bindungssignal von 100% ergeben (Fig. 47).

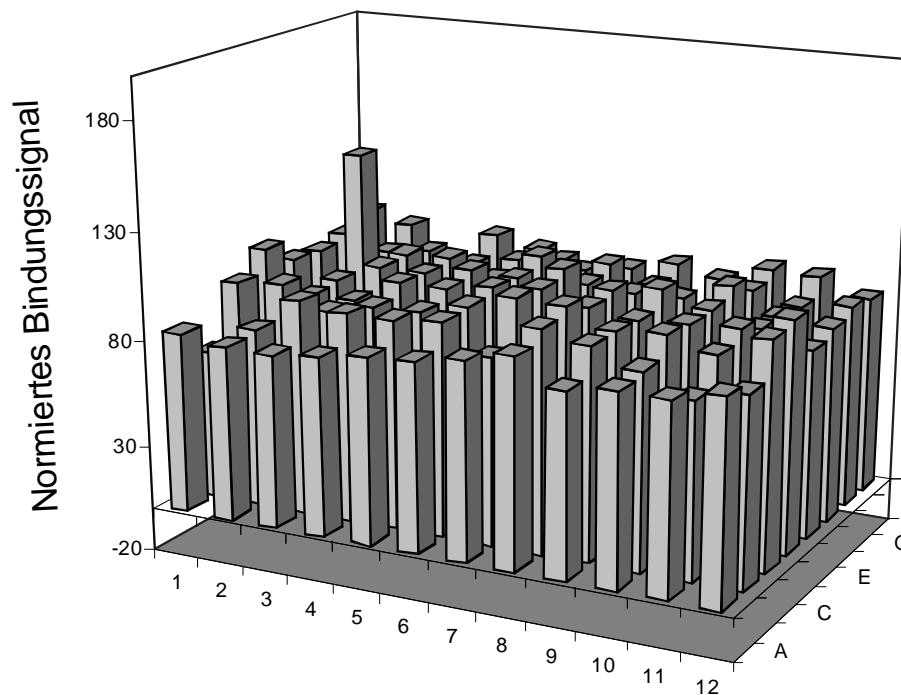


Fig. 47: Referenzierte Bindungssignale der spezifischen Bindung von Thrombin in einer RIfS-MTP.

Dabei variieren die Bindungssignale in einem Bereich von $< 20\%$, was zur Hit-Identifikation ausreichen sollte. Messungen, die durch die Anwesenheit von Luftblasen in einem einzelnen Well verfälscht wurden, fielen bei der Kalibrierung in der Regel durch vielfach überhöhte Signale auf. Dies ermöglichte es, solche Wells schnell zu identifizieren, die gemessenen Signale auszuklammern und die entsprechenden Proben ein weiteres Mal zu testen.

4.2.2.3 Aufbau des Assays

Um eine Vielzahl potentieller Inhibitoren auf ihre Wechselwirkung mit Thrombin hin zu untersuchen, wurde ein Bindungshemmtest erarbeitet. Dabei wurde die zu testende Substanz mit Thrombin vorinkubiert, diese Probe nach wenigen Minuten, in denen sich ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellen konnte, in die RIfS-MTP pipettiert und mit der Messung des Bindungssignals begonnen. Das Bindungssignal spiegelt dabei die Konzentration an noch freiem Thrombin in Lösung wieder. Mit einer hohen Konzentration

einer Testsubstanz hinreichender Aktivität sollte die Konzentration an freiem Thrombin gegen null gehen und damit kein Bindungssignal mehr detektiert werden können. Schematisch ist der Assay in Fig. 48 gezeigt.

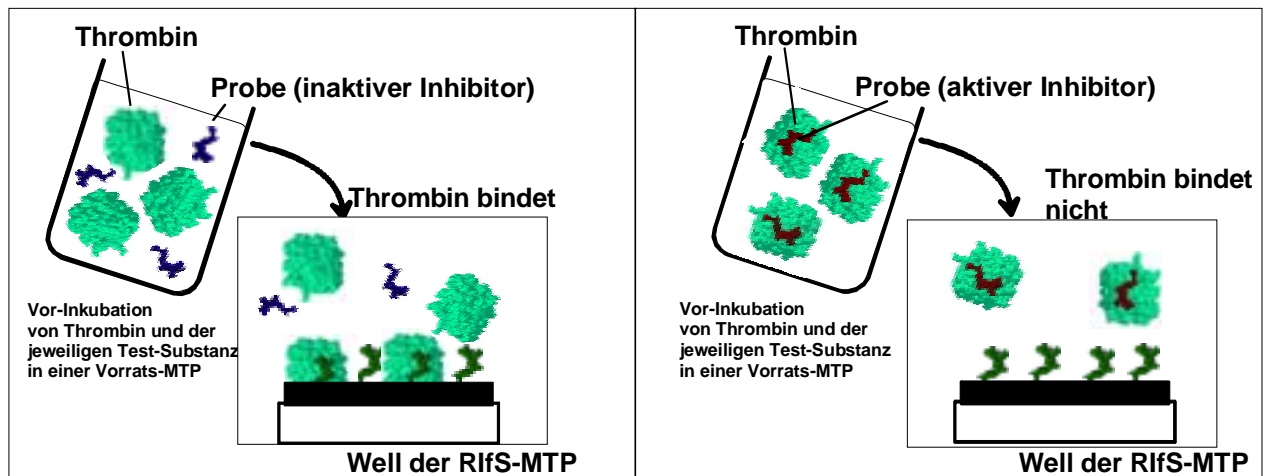


Fig. 48: Schema des Bindungsassays zur Suche nach potentiellen Thrombininhibitoren.

Mit diesem Assay wird detektiert, ob eine Testsubstanz mit dem aktiven Zentrum von Thrombin wechselwirkt. Zwar ist zu erwarten, dass Substanzen, die das aktive Zentrum besetzen, das Enzym in seiner Aufgabe, Fibrinogen zu spalten, behindert, über die tatsächliche Thrombinaktivität bei Anwesenheit einer solchen Substanz kann aber noch keine konkrete Aussage getroffen werden. So ist denkbar, dass der vermeintlich gefundene Inhibitor als Aktivitätspromotor fungiert. Dazu müssen sich weitere Studien z.B. in Form eines Sekundärscreening anschließen. Falls eine der untersuchten Substanzen in Wechselwirkung mit der Exo-Site, also der zweiten Bindungstasche des Thrombins, tritt und damit eine inhibitorische Wirkung ausübt, so wird dies mit dem verwendeten Bindungshemmtest nicht erkannt. Hierzu ist ein weiterer Assay nötig, der sich auf die Exo-Site fokussiert.

Um die Aussagekraft des Bindungshemmtests zu überprüfen, wurden mit dem BioSpec Proben gemessen, die neben Thrombin in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ und Ovalbumin als Hintergrundprotein (400 $\mu\text{g/ml}$) teilweise den verwendeten Standardinhibitor (60 ng/ml) enthielten. Bindungskurven, die dabei in einer 96er RIF5-MTP erhalten wurden, sind in Fig. 49 gezeigt. Die Kurven sind auf den ersten Messpunkt der Bindung normiert. Bei der gewählten Inhibitorkonzentration konnten die Bindungssignale bereits ohne eine Referenzierung deutlich unterschieden und dem jeweiligen Probenotyp zugeordnet werden.

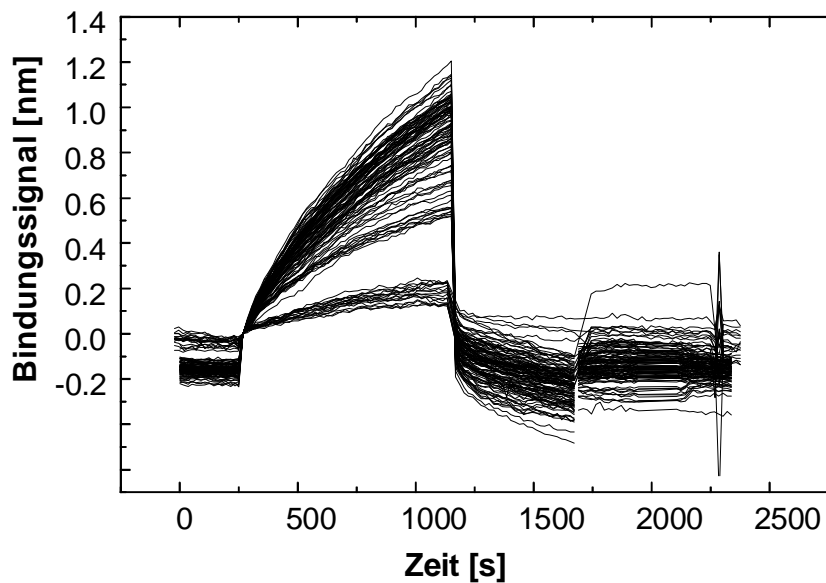


Fig. 49: Bindungssignale von Thrombin und mit Inhibitor vorinkubiertem Thrombin analog dem Schema in Fig. 48.

4.2.2.4 Optimierung der Thrombinkonzentration

Um für das Screening einer Substanzbibliothek möglichst wenig an Reagenzien zu verbrauchen, musste untersucht werden, welche Konzentrationen an Thrombin noch zu vernünftig auswertbaren Bindungskurven führten. Gleichzeitig war bei diesen Untersuchungen von Interesse, wie gut unterschiedliche Thrombinkonzentrationen voneinander unterschieden werden können. Denn auch beim Bindungshemmtest, bei dem die eingesetzte Thrombinmenge in allen Proben gleich war, wurde mit dem Bindungssignal eine Thrombinkonzentration, nämlich die an freiem Enzym, charakterisiert. Im in Fig. 50 gezeigten Experiment wurden fünf verschiedene Thrombinkonzentrationen eingestellt und auf derselben Platte nacheinander vermessen. Dabei wurde bei einer Messung in allen Wells dieselbe Konzentration detektiert, so dass insgesamt 480 Bindungskurven erhalten wurden. Bereits aus den nicht referenzierten Messkurven (links) wurde klar, dass selbst eine Thrombinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ noch von der Basislinie getrennt werden kann. Dies entspricht bei einer Füllmenge von 80 $\mu\text{l/Well}$ einer Proteingesamtmenge von 0,16 $\mu\text{g/Well}$ oder 15,36 $\mu\text{g/RiFS-MTP}$. Bei den unbearbeiteten Bindungskurven konnte ohne die Kenntnis, welche Kurve zu welchem Well gehört, nicht direkt vom Signal auf die eingesetzte Konzentration geschlossen werden. Dies wurde erst durch das Referenzierverfahren erreicht. Dabei wurde in Fig. 50 (rechts) jeder Messpunkt auf das letzte Bindungssignal im entsprechenden Well bei 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,8 $\mu\text{g/well}$) referenziert. Dies führte dazu, dass die

Kurven, abhängig von der eingesetzten Thrombinkonzentration, separiert werden konnten. Wurde der Kalibrierdatensatz und der Probedatensatz bei unterschiedlichen Konzentration aufgenommen, musste auf eine günstige Auswahl der Probenkonzentration geachtet werden. Würden zu hohe Konzentrationen eingesetzt, würde eine Sättigung der Oberfläche erreicht. Dabei ginge der Zusammenhang zwischen Thrombinkonzentration und Bindungssignal verloren. Bei Konzentrationen von $<20 \mu\text{g/ml}$ war dies allerdings noch nicht der Fall.

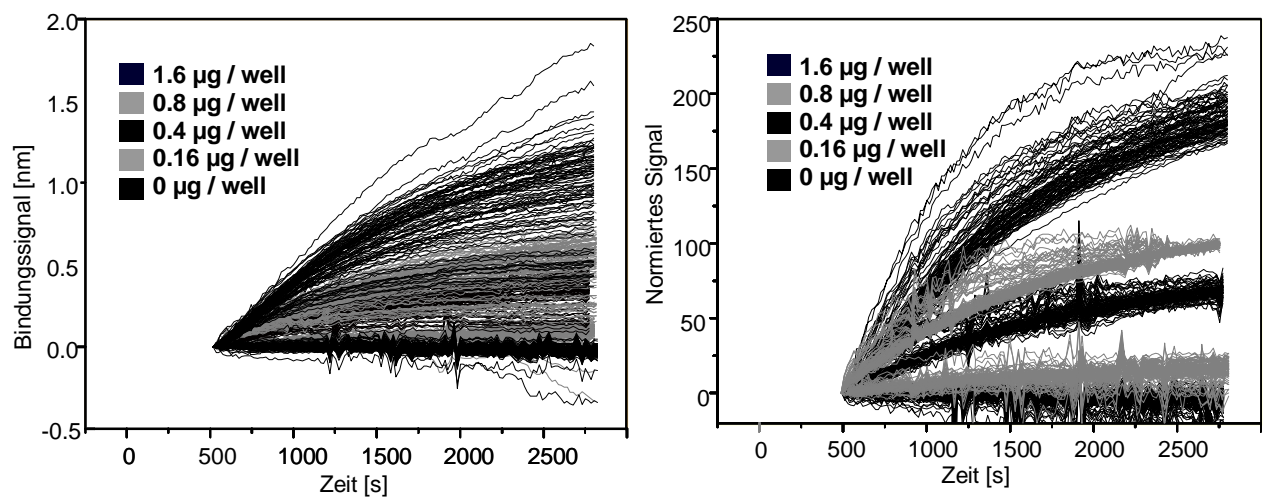


Fig. 50: Bindungssignale bei unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen: links sind die gemessenen Bindungskurven gezeigt. Rechts wurden die Kurven auf die Maximalsignale bei $0,8 \mu\text{g/well}$ ($=10 \mu\text{g/ml}$) kalibriert.

Aussagekräftige Bindungskurven wurden bei Konzentrationen $> 5 \mu\text{g/ml}$ ($> 0,4 \mu\text{g/well}$) erhalten. Da es sich bei Thrombin um ein Protein handelt, das auch in größeren Mengen erhältlich ist, wurde für die folgenden Untersuchungen, falls nicht anders angegeben, $20 \mu\text{g/ml}$ (bzw. $1,6 \mu\text{g/well}$) verwendet.

4.2.2.5 Screeningversuche unter Idealbedingungen

Nachdem gezeigt wurde, dass inhibiertes Thrombin mit Hilfe des BioSpec detektiert werden konnte (vgl. 4.2.2.3), sollte das Screening einer Substanzbibliothek mit Hilfe des Standard-Thrombininhibitors nachgeahmt werden. Dazu wurden von einem Laboranten vor jeder Messung eine unbekannte Anzahl von Proben mit Inhibitor vorinkubiert ($1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). Anschließend wurde untersucht, ob die Datensätze so ausgewertet werden konnten, dass möglichst alle aktiven Substanzen eindeutig wiedergefunden wurden (keine falsch-negativen Ergebnisse) und dabei die Anzahl der falsch-positiv getesteten Proben möglichst gering gehalten werden konnte. In Fig. 51 sind die Bindungskurven (links) sowie die ausgewerteten Bindungssignale für die Thrombinkonzentrationen $10 \mu\text{g/ml}$ und $20 \mu\text{g/ml}$ gezeigt.

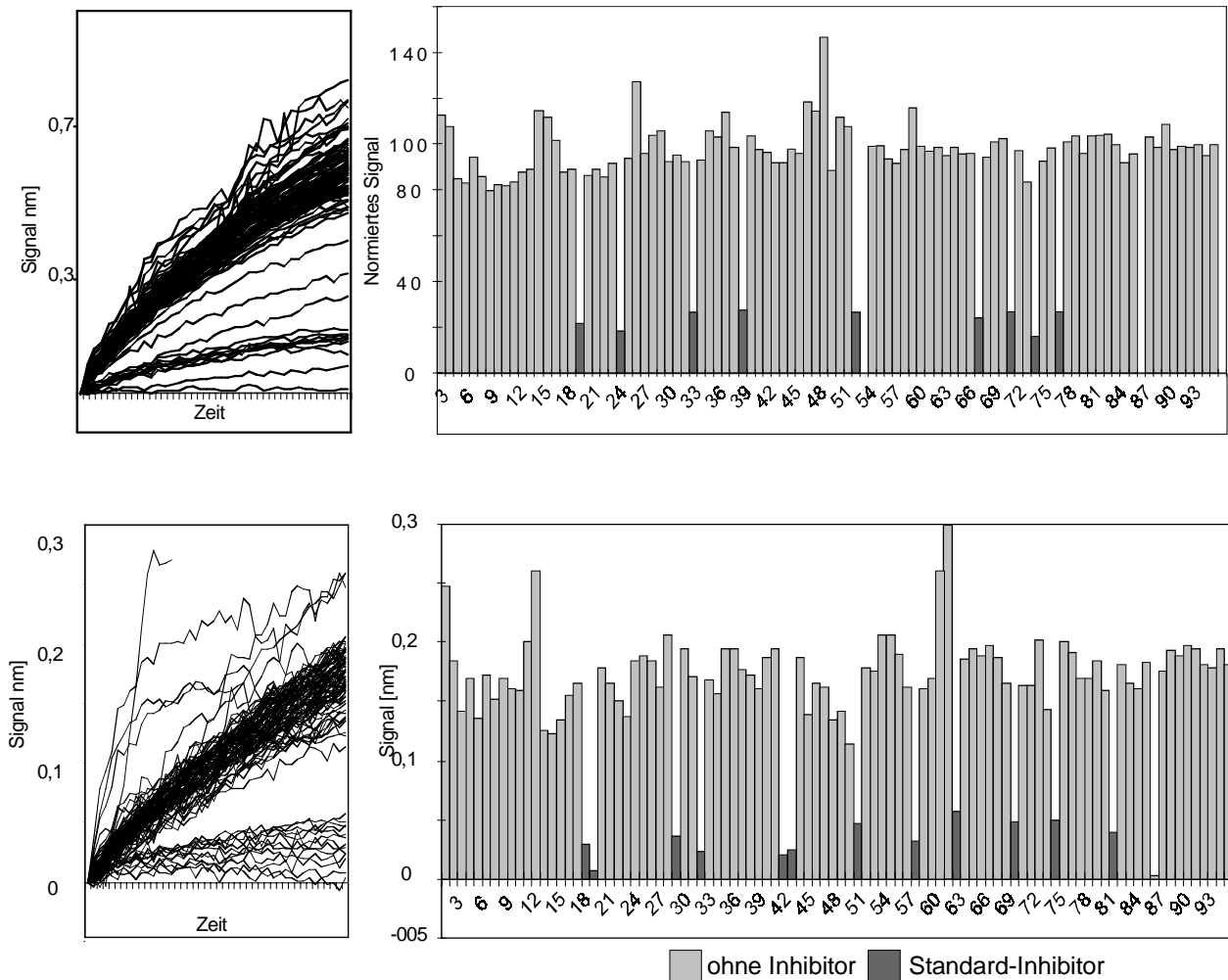


Fig. 51: Bindungskurven (links) und die dabei erhaltenen Bindungssignale (rechts) für zwei Screening-Experimente. Oben wurde mit einer Thrombinkonzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ gearbeitet, unten mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$. Beim zweiten Experiment ist der nicht referenzierte Datensatz gezeigt.

Bei einer Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ Thrombin lies sich bereits aus den Bindungskurven für die meisten Proben eine eindeutige Zuordnung bzw. Ja/Nein-Entscheidung treffen. Lediglich in drei Wells wurden Kurven erhalten, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. 2 Wells (52 und 86) zeigten bereits beim Referenzieren, dass dort die Transduceroberfläche beschädigt und somit keine Messung möglich war. Diese Wells wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Nach der Referenzierung der Daten konnten alle Inhibitorproben mit einem Ausschlusskriterium von 50% Inhibition wiedergefunden werden. Außerdem wurde keine inaktive Probe als Hit identifiziert. Damit traten weder falsch-positive noch falsch-negative Fehlinterpretationen auf.

Obwohl auch beim Experiment mit einer Thrombinkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ die Bindungskurven noch eindeutig zugeordnet werden konnten, zeigte sich hier bereits deutlich, dass mit geringer werdender Thrombinkonzentration das Rauschen die Messung beeinflusst. Bei $10 \mu\text{g/ml}$ Thrombin wurden ebenfalls alle Proben richtig zugeordnet und weder falsch-

positive noch falsch-negative Ergebnisse wurden erhalten. Da bei diesem Experiment eine sehr homogene Platte verwendet wurde, konnte auf eine Referenzierung verzichtet werden. In Fig. 51 (unten rechts) sind deshalb die absoluten Bindungssignale gezeigt.

4.2.2.6 *Screeningversuche unter Realbedingungen*

Die in 4.2.2.5 gezeigten Messungen fanden unter idealisierten Bedingungen statt. Bei realen Messungen muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Proben dieselbe Affinität besitzen. Damit kann es in Abhängigkeit der Affinität zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Inhibition kommen. Eine weitere wichtige Kenngröße wird durch die Substanzbibliothek vorgegeben. Da es sich bei den Einzelsubstanzen um Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen, Herkunft und Strukturmerkmale handelt, die alle möglichst im selben Medium gelöst vorliegen sollten, werden diese in der Regel in DMSO bereitgestellt, denn dieses stellt für sehr viele Stoffe ein universelles Lösungsmittel dar. Deshalb darf ein Screeningassay nicht durch die Anwesenheit von DMSO in der Größenordnung von wenigen Prozenten gestört werden. In der Regel beträgt der DMSO-Gehalt der zu untersuchenden Probe in der Pharmaindustrie weniger als 1%.

Um diesen praxisbezogenen Forderungen Folge zu leisten, wurden Messungen mit unterschiedlichen Inhibitoren bei einer Zugabe von 5% DMSO zur Probe durchgeführt. Typische Ergebnisse sind in Fig. 52 zu sehen. Oben ist ein Experiment bei Zusatz von DMSO gezeigt, während im unteren Experiment kein DMSO verwendet wurde. Die unterschiedlichen Inhibitoren wurden durch unterschiedliche Schraffuren gekennzeichnet.

Bei den Messungen zeigte sich, dass die Anwesenheit von DMSO die Messungen weder im Hinblick auf die Detektionsmethode (Rauschen, Drift) noch im Hinblick auf einen Aktivitätsverlust des Thrombins stört. Ersteres ist eine prinzipielle, gerätespezifische Eigenschaft. Der Einfluss des DMSO auf das untersuchte Target muss allerdings für jedes neue Target untersucht werden. Für Targets, die empfindlich auf DMSO reagieren, müssen dann andere Substanzbibliotheken erstellt werden.

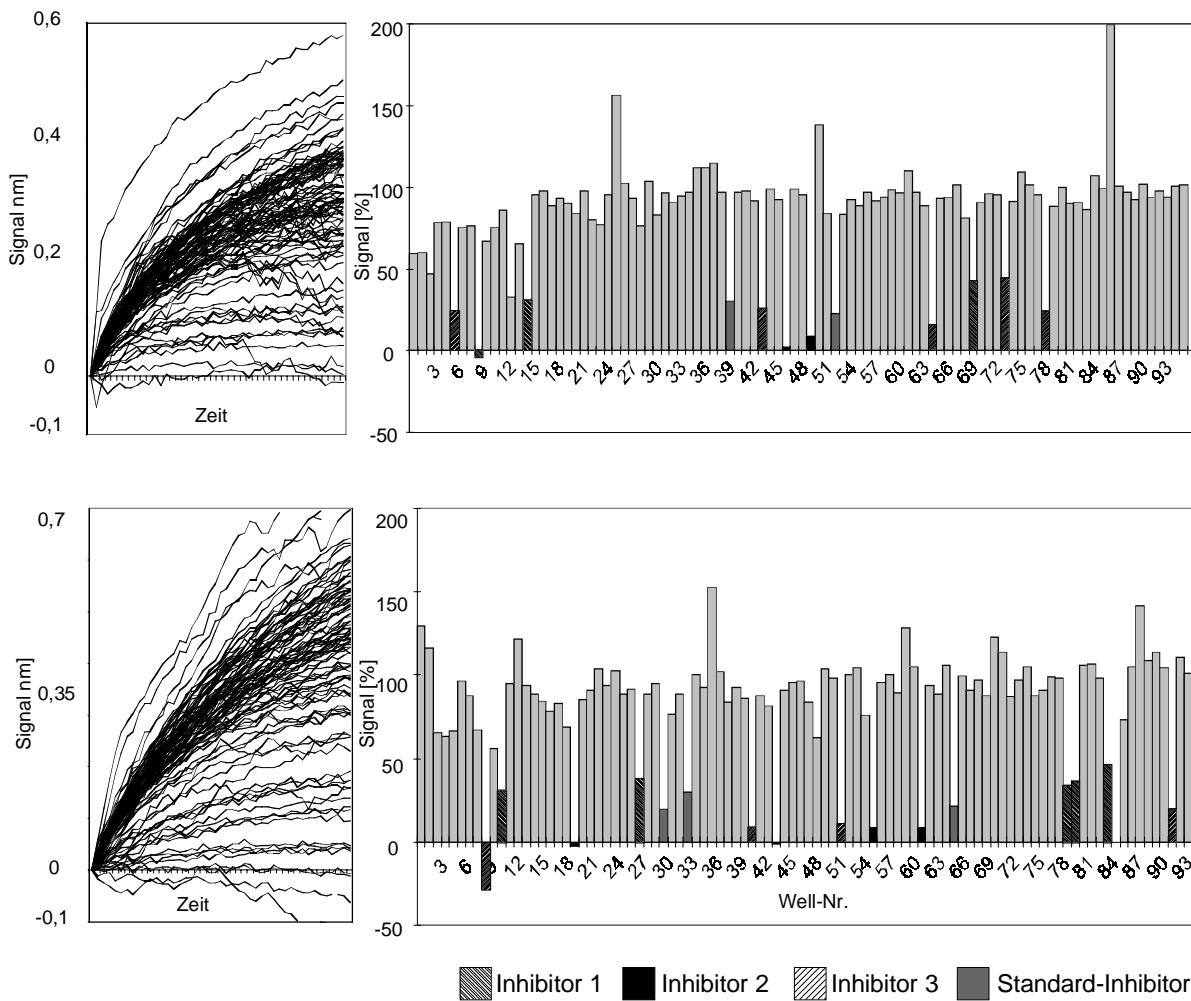


Fig. 52: Screeningexperimente bei 20 µg/ml Thrombin unter Realbedingungen: Es wurden Inhibitoren unterschiedlicher Aktivität gemessen. Gleichzeitig wurde den Proben DMSO zugesetzt (oben), bzw. auf DMSO verzichtet (unten).

Die unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen Inhibitoren machte sich in der Stärke der Inhibition bemerkbar. Alle Inhibitoren konnten dabei eindeutig als Screening-Hit identifiziert werden. Der Umstand, dass die Inhibitoren zum Teil noch sehr starke Bindungssignale lieferten (v.a. Inhibitor 1) muss so interpretiert werden, dass für deren eindeutige Detektion mit erhöhten Inhibitorkonzentrationen oder geringeren Thrombinkonzentrationen gemessen werden sollte.

4.2.2.7 Übertragen des Assays auf das 384-Well Format

Nach dem 96er Well-Format ist eine Wellzahl von 384, also eine Vervierfachung der Kavitäten- und somit der Informationsdichte, als Standard in der Pharmaindustrie verbreitet. Am prinzipiellen Ablauf der Messung (Basislinie, Bindung, Regeneration, Basislinie) änderte sich dabei nur wenig. Allerdings war zu beachten, dass mit dem zur Verfügung stehenden

Pipettierroboter nur 96 Wells simultan befüllt werden konnten. Der Pipettierkopf verfügte zusätzlich zum Vertikaltrieb über eine x-y-Positionierung in der Horizontalen. Dies ermöglichte es, vier benachbarte Wells mit Hilfe einer Pipettierspitze sequenziell zu bedienen. Bei einem Spitzenvolumen von 250 μl und einem Probenvolumen von 40 μl /Well konnte nach einmaligem Aufsaugen der Probe innerhalb von wenigen Sekunden in jeweils vier benachbarte Wells die selbe Probenlösung pipettiert werden. Damit konnten, anders als in der Praxis gefordert nur 96 verschiedene Proben, dafür allerdings in vierfacher Reproduktion, gemessen werden. Da mittlerweile aber auch Pipettiersysteme auf dem Markt sind, die mit 384 Spitzen gleichzeitig arbeiten, stellt das verwendete System keine prinzipiellen Anforderungsprobleme in den Raum, sondern konnte als Modellsystem für das Screening im 384er Format untersucht werden.

Beim 384er System führte die kleinere ausgelesene Fläche je Well zu einem erhöhten Signalrauschen (Kap. 4.2.1.5). Deshalb war es deutlich schwieriger, Messungen bei unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen, wie sie für das 96er System in 4.2.2.4 gemacht wurden, durchzuführen. In Fig. 53 sind auf einer 384er Platte die Signale nach 13 min. spezifischer Bindung von Thrombin in Konzentrationen von 0-40 $\mu\text{g/ml}$ gezeigt.

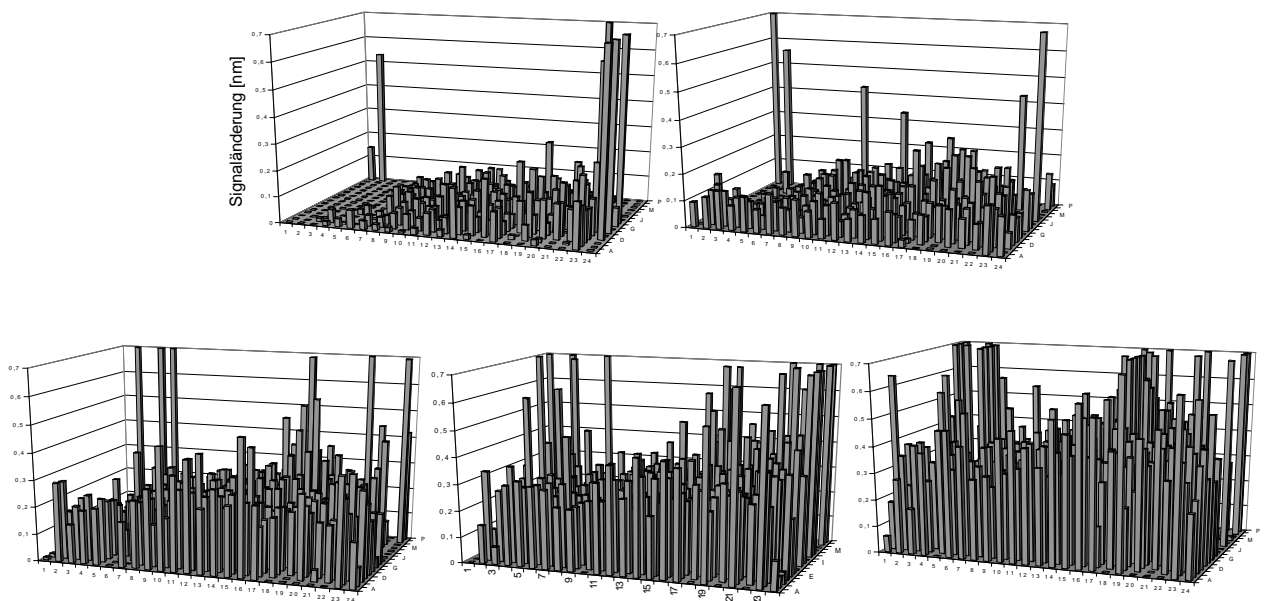


Fig. 53: Bindungssignale für unterschiedliche Thrombinkonzentrationen auf einer 384er RI/S-MTP. Gezeigt sind von links oben nach rechts unten Signale bei Konzentrationen von 0, 5, 10, 20 und 40 $\mu\text{g/ml}$.

Wie bereits bei den 96er Platten gefunden, zeigten auch die 384er Platten eine deutliche Inhomogenität der Bindungssignale. Eine Referenzierung wie in Fig. 54 gezeigt, ergab auch im 384er System einheitliche und vergleichbare Signale auf der kompletten Platte. Im Gegensatz zum 96er System kam es hierbei öfters zu Fehlmessungen mit unbrauchbaren Werten (In Fig. 54: eine Fehlmessung mit zu hohem Wert). Dies lag daran, dass sich beim

Pipettieren gebildete Luftblasen auf Grund des kleineren Kavitätenvolumens am Rand des Wells (SiO_2 -Plasik-Grenzfläche) festsetzten und damit die Messwerte verfälschten. Im Vergleich zu den Referenzierungsergebnissen im 96er System (4.2.2.2) erhält man eine größere Signalschwankung, die auf den größeren Einfluss des Signalrauschens zurückgeführt wurde.

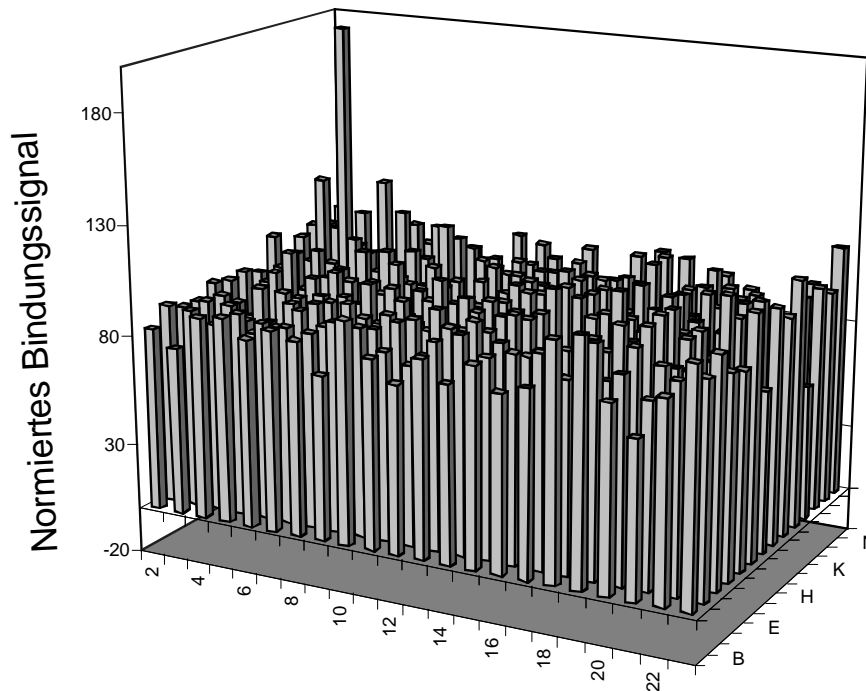


Fig. 54: Normierte Bindungssignale auf einer 384er RfS-MTP bei einer Thrombinkonzentration von $20 \mu\text{g/ml}$.

Mit der 384er RfS-MTP wurden ebenfalls Screeningexperimente durchgeführt. Dazu wurden Konzentrationen von $20 \mu\text{g/ml}$ verwendet, wie sie bereits für das Arbeiten in der 96er RfS-MTP optimiert wurden. Nach dem Registrieren der Bindungskurve und dem Auftragen der Signale wurden für die Auswertung bereits ohne Referenzierung eine Wiederfindungsrate von $>96\%$ (3 falsch negative Ergebnisse), bei lediglich 3% falsch positiven Werten, erreicht. In Fig. 55 sind 96 der 384 Bindungssignale gezeigt. Die Kurven gehören dabei zu einem der 4 nacheinander ablaufenden Pipettierschritten zum Befüllen der RfS-MTP. Im unteren Teil der Abbildung sind die bereits referenzierten Bindungssignale am Ende der Messung gezeigt, deren Auswertung im Vergleich zur Auswertung der Rohdaten eine weitere Verbesserung der Ergebnisse erbrachte. Zur Hit-Identifizierung wurde eine Signalabnahme von 40% bzw. 50% beispielhaft ausgewählt. Auf die Ergebnisse und den Vergleich zwischen 96er- und 384er-RfS-MTP wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

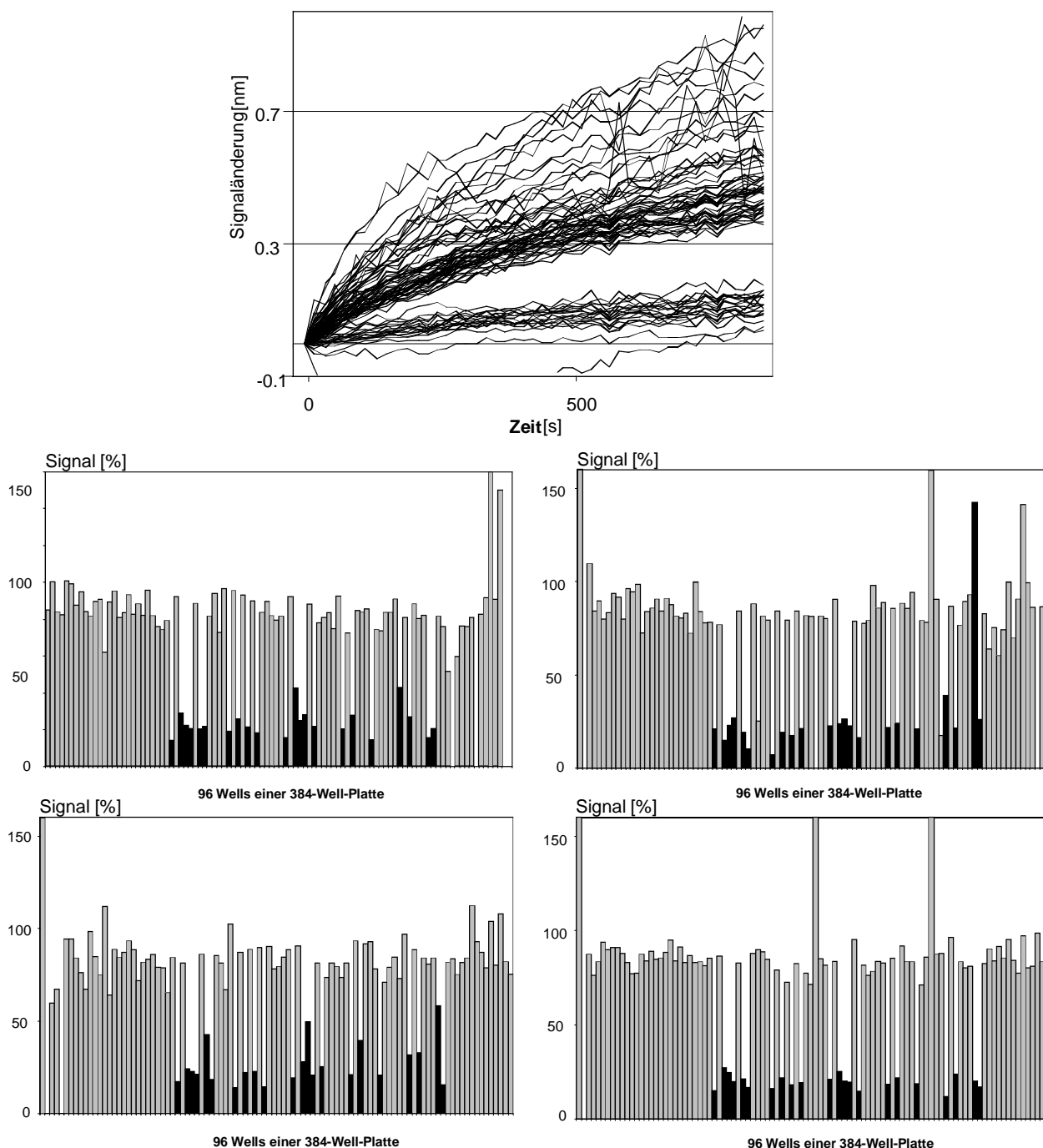


Fig. 55: Ergebnisse eines Screenings in einer 384er RfS-MTP: Gezeigt sind 96 der 384 Bindungskurven, die sich durch Auswerten von einem der 4 Pipettierschritte zum Befüllen der Platte ergaben (oben), sowie die Bindungssignale am Ende der Messung (unten). Diese sind entsprechend den vier Pipettierschritten in einer Aufteilung von 4x96 Messwerten gezeigt.

4.2.2.8 Auftreten von falsch positiven und falsch negativen Screening-Hits

Eine sinnvolle Auswertung erfolgt bei Screeningexperimenten am besten über die Anzahl an falsch-positiven und falsch-negativen Screening-Hits. Dabei sind, wie bereits in Kapitel 2.2.2.3 gezeigt, vor allem die falsch-negativen Hits für die Qualität des Assays verantwortlich. Das Kriterium für eine Hit-Identifikation muss für jeden Assay entsprechend der Anzahl der

aktiven Substanzen optimiert werden. Im Falle des untersuchten Inhibitorscreenings für Thrombin, wurde als Hit-Kriterium eine Signalabnahme von 40% bzw. 50% in Bezug auf die Referenzmessung verwendet. D.h. Signale mit einer Intensität von <60% bzw. <50% wurden als Hit klassifiziert. Die damit erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 für eine 96er RIfS-MTP und eine 384er RIfS-MTP gezeigt.

Tabelle 8 Hit-Identifizierung auf der 96er- und 384er RIfS-MTP bei unterschiedlichen Hit-Kriterien. In beiden Fällen wurde mit dem Standardinhibitor ohne DMSO-Zusatz gearbeitet.

	Aktivität Wiedergefunden	Inaktivität Wiedergefunden	Falsch negative Hits	Falsch positive Hits
<i>96 Well RIfS-MTP 40% Kriterium</i>	<i>9 von 9</i>	<i>85 von 87</i>	<i>0</i>	<i>(2)</i>
<i>96 Well RIfS-MTP 50% Kriterium</i>	<i>9 von 9</i>	<i>85 von 87</i>	<i>0</i>	<i>(2)</i>
<i>384 Well RIfS-MTP 40% Kriterium</i>	<i>87 von 88</i>	<i>288 von 296</i>	<i>1</i>	<i>10</i>
<i>384 Well RIfS-MTP 50% Kriterium</i>	<i>86 von 88</i>	<i>291 von 296</i>	<i>2</i>	<i>6</i>

Für das 96er System waren die gehemmten Bindungssignale für Inhibitoren so deutlich ausgeprägt, dass sich für beide Kriterien kein Unterschied ergab. Wichtig war, dass alle aktiven Substanzen wiedergefunden wurden und damit keine falsch-negativen Hits auftraten. Bei den zwei falsch-positiven Hits handelte es sich um Wells, von denen bereits durch Vorversuche bekannt war, dass sie nicht zur Auswertung herangezogen werden durften. Vermutlich war auf Grund von Fehlern bei den manuellen Immobilisierungsschritten dort kein Inhibitor immobilisiert worden. Damit wurden unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes eine Wiederfindungsrate von 100% erreicht.

Für das 384er System wurden je nach verwendetem Hit-Kriterium unterschiedliche Ergebnisse erreicht. Während beim 50%-Kriterium 2 von 88 aktiven Substanzen nicht identifiziert werden konnten, ließ sich die Zahl dieser falsch-negativen Hits beim 40%-Kriterium auf eine Substanz verringern. Gleichzeitig stieg aber die Zahl der falsch-positiven Hits von 6 auf 10 (von insgesamt 296 inaktiven Substanzen) an. Im Beispiel des Thrombinassays war die erhöhte Zahl an falsch positiven Hits noch vertretbar, so dass als Hit-Kriterium 40% Inhibition gewählt wurde.

4.2.2.9 Parallele Qualitative Untersuchung eines aktiven Inhibitors

Für ein Primärscreening genügt im einfachsten Fall eine nicht weiter zu differenzierende Ja/Nein Entscheidung um die Aktivität eines potentiellen Inhibitors zu bestimmen und dessen Quantifizierung dann in einer anschließenden weiterführenden Analyse zu ermitteln. Eine

differenzierte Auswertung wäre allerdings auch im Screening von Vorteil, sei es, um den Aufwand an nachgeschalteten Untersuchungen möglichst gering zu halten oder die parallele RIfS selbst in Form eines Sekundärscreenings hierfür zu benutzen.

Die Anwendung der parallelen RIfS im Sekundärscreening wurde dabei durch die Untersuchung des Standardinhibitors gezeigt:

Der Ablauf der Messung entsprach dabei den Screeningexperimenten, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden. Als Probe diente dabei eine Thrombinlösung (20 µg/ml), der der Standardinhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,0 mol/l und $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l zugesetzt wurde. Um die einzelnen Proben statistisch erfassen zu können, wurde in jeweils 8 Wells dieselbe Inhibitorkonzentration verwendet. Dabei wurden die Konzentrationen so auf der Platte verteilt, dass die Reihen 1-12 jeweils einer Konzentration zugeordnet waren (vgl. Fig. 46).

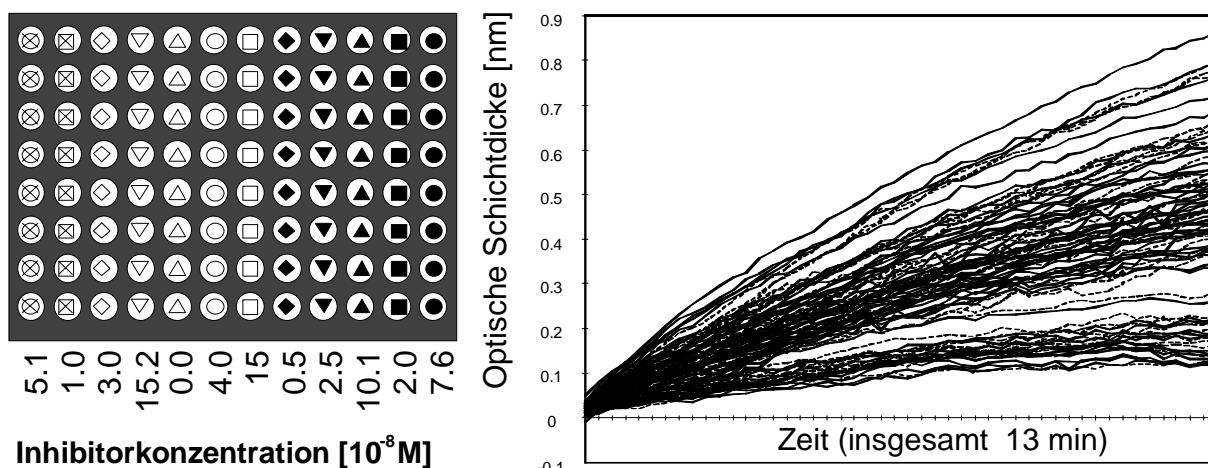


Fig. 56: *Quantitative Untersuchung des Standardinhibitors. Links sind die Verteilung der Inhibitorkonzentrationen auf der Platte, rechts die erhaltenen Bindungssignale auf der 96er RIfS-MTP gezeigt.*

Bereits aus Fig. 56 (rechts) wurde ersichtlich, dass in den unterschiedlichen Wells unterschiedlich starke Bindungssignale detektiert wurden. Eine einfache Auswertung ist in dieser Darstellung allerdings kaum möglich, denn lediglich 24 Kurven mit Signalen von <0,2 nm können von den anderen qualitativ getrennt werden. Nach der Referenzierung und der getrennten Auftragung der Endpunktsignale, wie sie in Fig. 57 gezeigt ist, wurde deutlich, dass nicht nur zwischen erfolgter und nicht erfolgter Inhibition unterschieden werden konnte, sondern dass eine eindeutige Quantifizierung der Inhibitorkonzentration im gemessenen Konzentrationsbereich möglich war. Die einzelnen Punkte entsprechen dabei den Mittelwerten aus jeweils 8 Wells.

Eine komplette Inhibierung von Thrombin mit dem Standardinhibitor war bei den gewählten Assay-Bedingungen ab einer Konzentration von 10^{-7} mol/l möglich. Hierbei trat allerdings ein Signal-Offset von ca. 20% auf. Für ein Screening sollte damit bei gleicher Thrombinkonzentration die Konzentration der Bibliothekssubstanzen $> 10^{-7}$ mol/l liegen, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 4.2.2.5 steht. Aus der Titrationskurve wurde durch Auswerten des Testmittelpunktes, also desjenigen Punktes, bei dem die Thrombinbindungsstellen zur Hälfte inhibiert waren, für den verwendeten Inhibitor ein IC-50 Wert von 40 nM ermittelt. Dieser Wert deckt sich gut mit IC-50-Werten von 52 nM (gleicher Assay) und 22 nM (chromogener Assay), die bei der BASF ermittelt wurden (Eckard *et al.* 2000). Die Ergebnisse können auf Grund der ähnlichen Thrombinkonzentration (14 μ g/ml bei den Literaturdaten, 20 μ g/ml in Fig. 57) direkt verglichen werden, was in der Regel bei IC-50-Werten nicht der Fall ist.

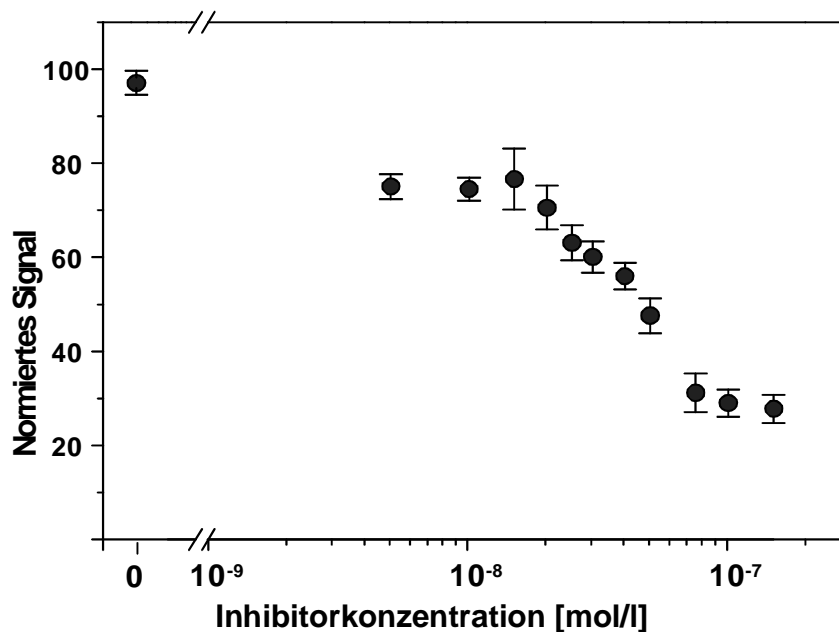


Fig. 57: Titrationskurven zur Bestimmung des IC-50 Wertes der Inhibitoraktivität mit dem BioSpec.

4.2.2.10 Optimierung der Gesamtanalysenzeit

Neben der Optimierung des Assays hinsichtlich Reagenzienverbrauch und Datenreferenzierung musste auch die Testdauer eines Screeningassays bzw. der Zeitaufwand pro Testsubstanz untersucht werden. Dabei war zu klären, wie lange eine Bindungskurve aufgenommen werden musste, bis ihr Informationsgehalt für eine Detektion potentieller Inhibitoren ausreichte. Eine Auswertung erfolgte mit Hilfe der in 4.2.2.9 durchgeführten Messung. Wurden die Bindungsereignisse nur kurzzeitig aufgenommen und dann ausgewertet, so erhielt man deutlich größere Schwankungen für die Bindungssignale bei gleicher Thrombin- und Inhibitorkonzentration. Da die Bindungssignale bei einer solchen

Kurzzeitmessung sehr klein waren, konnte hierfür v.a. das Rauschen verantwortlich gemacht werden. Wurde die Bindung so lange detektiert, dass die Signale sich deutlich vom Rauschen unterschieden, wurden bessere Ergebnisse erzielt. Eine weitere Verlängerung der Detektionsdauer führte dann allerdings zu keiner weiteren Verbesserung der Daten. Bei sehr langen Messzeiten waren die unterschiedlichen Bindungscharakteristika der einzelnen Wells der Hauptgrund für Signalunterschiede. In Fig. 58 ist dies an den mit länger werdender Messdauer kleiner werdenden Standardabweichungen zu sehen.

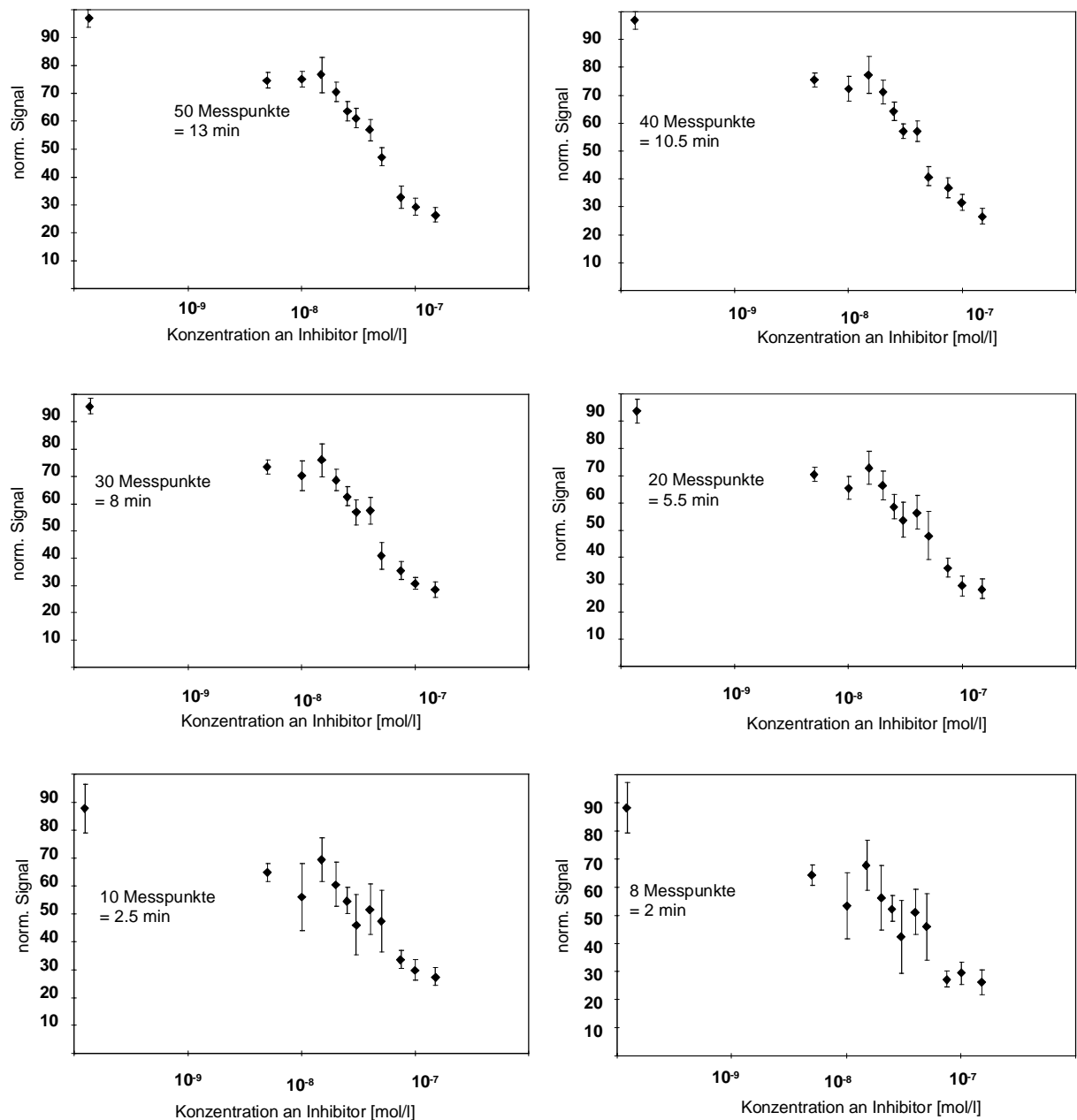


Fig. 58: Auswertung eines Bindungsinhibitionstest bei verschiedenen Bindungszeiten zur Optimierung der Messzeit des Screening-Assays. Dabei wurde jeweils der selbe Datensatz nach unterschiedlicher Bindungsdauer ausgewertet.

Eine Verlängerung der Messdauer von 8 auf 10,5 oder gar 30 min. erbrachte keinen zusätzlichen Informationsgewinn; die Absolutsignale und deren Standardabweichungen waren hier praktisch identisch. Damit scheint es nicht sinnvoll, ein Screening bei sehr langen Bindungszeiten zu betreiben, denn neben dem erhöhten Zeitaufwand kann es bei langen Bindungszeiten zu zusätzlichen Problemen kommen: Bei sehr langer Bindungszeit erhält man hochbeladene Oberflächen, deren Regeneration schwieriger durchzuführen ist. Durch die dadurch u.U. notwendigen extremeren Regenerationsbedingungen werden die Transduceroberflächen stärker beansprucht.

Bei einer starken Verkürzung der Messzeit erhielt man ab ca. 2,5 min. einen deutlichen Signaleinbruch. Die Bindungssignale lagen mit 0,1-0,2 nm in einem Bereich, in dem das Signalrauschen die Detektion störte (vgl. Fig. 57). Dadurch kam es zu erheblich größeren Standardabweichungen. Auch wenn selbst bei einer Messzeit von nur 2 min noch zwischen inhibierter und nicht inhibierter Probe unterschieden werden konnte, sollte zu Gunsten von zuverlässigen Screeningergebnissen die Messdauer nicht unter 2,5 min liegen. Bei einer optimalen Bindungsdauer von 5 min kann unter der Annahme, dass für Basislinienmessungen und Regeneration weitere 5 min benötigt werden, ein Probendurchsatz von 576 Proben/h (96er-Format) bzw. 2304 Proben/h (384er-Format) erzielt werden. Das entspricht einer Analysenzeit von 6,25 s/Probe (96er-Format) bzw. 1,56 s/Probe (384er-Format).

Der Durchsatz lässt sich dabei noch erhöhen, wenn auf das online-Monitoring des Regenerationsschrittes verzichtet wird.

4.2.2.11 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Optimierung

Durch die Optimierung der verschiedenen Einflussgrößen ergaben sich als optimale Parameter für den untersuchten Screeningassay für Thrombininhibitoren:

Tabelle 9 Optimierte Parameter für den Screeningassay für das System Thrombin-Inhibitor.

Parameter	Idealbedingungen
<i>Thrombinkonzentration</i>	10-20 µg/ml (96er) 20 µg/ml (384er)
<i>Wirkstoffkonzentration</i>	> 10 ⁻⁷ M
<i>Regenerationsmedium</i>	HCl pH 1,7
<i>Einfluss von DMSO</i>	unkritisch
<i>Referenzierungsmethode</i>	Referenzierung auf das maximale Bindungssignal
<i>Hit-Kriterium</i>	50% Inhibition (96er) 40% Inhibition (384er)
<i>Analysenzeit für das Bindungsereignis</i>	5-8 min
<i>Probendurchsatz</i>	Max. 576 (96) bzw. 2304 Proben /h (384)
<i>Tagesdurchsatz bei 24 h Betrieb</i>	Max. ca. 14.000 (96) bzw. 55.000 (384)Proben

4.2.3 UNTERSUCHUNG EINER TRIAZIN-SUBSTANZBIBLIOTHEK

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln ein indirekter Bindungsassay und ein indirekter funktioneller Assay beschrieben wurden, wird hier auf eine weitere Form, den direkten Bindungsassay, eingegangen.

Beispielhaft wurde die Wechselwirkung von Antikörpern mit 36 Substanzen der Triazinklasse untersucht.

Das Ziel des hier gezeigten Assays war es, die kombinatorische Festphasensynthese möglichst eng mit dem Screening zu verbinden (Rademann *et. al* 2000). Die RfS-MTP war dazu bestens geeignet, denn die mit PEG modifizierten Glasoberflächen konnten direkt dazu verwendet werden, über Standardreaktionen der kombinatorischen Festphasensynthese eine oberflächengebundene Substanzbibliothek in den Wells der RfS-MTP zu synthetisieren. Dabei wurden, da die Syntheseschritte zum Teil in organischen Lösungsmitteln stattfanden, Mikrotiterplatten mit Polypropylen-Kavitätenkörper verwendet. Während beim klassischen Screening von kombinatorisch erzeugten Substanzen die Einzelverbindungen zuerst vom Trägermaterial gelöst werden müssen, um dann in Lösung eingesetzt zu werden, konnte bei der hier gezeigten Methode auf Grund der gemeinsamen Plattform (RfS-MTP) auf das Abspalten vom Träger verzichtet werden. Die Synthese selbst, sowie die Strukturformeln der Bibliothekssubstanzen sind in Kapitel 3.2.1.6 zu finden.

4.2.3.1 Assayformat

Das Assayformat des direkten Bindungsassays war sehr simpel: Jedes Well wurde mit Antikörperlösung derselben Konzentration (20 µg/ml) befüllt. Da sich – anders als bei den in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.4 gezeigten Assays – in jedem Well eine andere oberflächengebundene Substanz befand, konnte über die Bindungskurve direkt eine Aussage über die Wechselwirkung zwischen Antikörper und oberflächengebundenem Triazin gemacht werden. Das automatische Befüllen und Entleeren der RIfS-MTP erfolgte mit dem bereits beschriebenen Pipettierprogramm. Beispielhaft ist das Bindungssignal eines kompletten Zyklus für ein Well in Fig. 59 gezeigt. Das Bindungssignal wurde zwischen Messpunkt 20 und 70 (entspricht 360s – 1260s) aufgenommen. Die Regeneration erfolgte mit Pepsin, das typischerweise einen sehr hohen Signalsprung bewirkte. Da die Triazinoberfläche gegen das Regenerationsmedium inert war, wurde auch nach 20 Messzyklen kein signifikanter Signalarückgang auf der RIfS-MTP festgestellt.

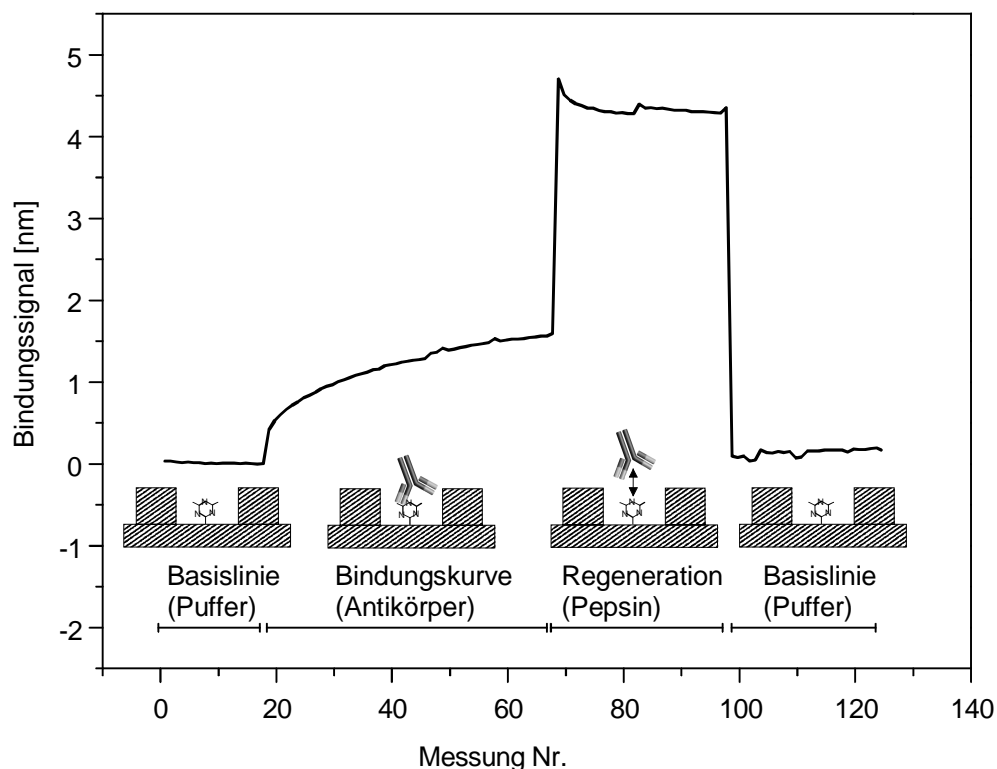


Fig. 59: Beispielkurve für das Binden eines Triazin-Antikörpers an einer der synthetisierten Substanzen.

4.2.3.2 Spezifität der Bindung

Um nachzuweisen, dass die detektierten Signale tatsächlich von einer spezifischen Bindung und nicht von einer unspezifischen Wechselwirkung mit der Oberfläche herrührten, wurde mit einem Antikörper-Triazin-Paar ein Bindungsinhibitionstest durchgeführt. Dazu wurde zuerst

das Signal eines freien Antikörpers (polyklonaler α -Atrazin-Antikörper) bei Wechselwirkung mit dem Triazin 2e (vgl. Tabelle 2, Kapitel 3.2.1.6) detektiert und dieses dann mit einer Messung verglichen, bei der der Antikörper zuvor mit seinem Immunogen (Atrazincapronsäure, 25 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert wurde. Das Ergebnis ist in Fig. 60 zu sehen. Während der freie Antikörper an das oberflächengebundene Triazin binden kann, ist der blockierte Antikörper dazu nicht mehr in der Lage.

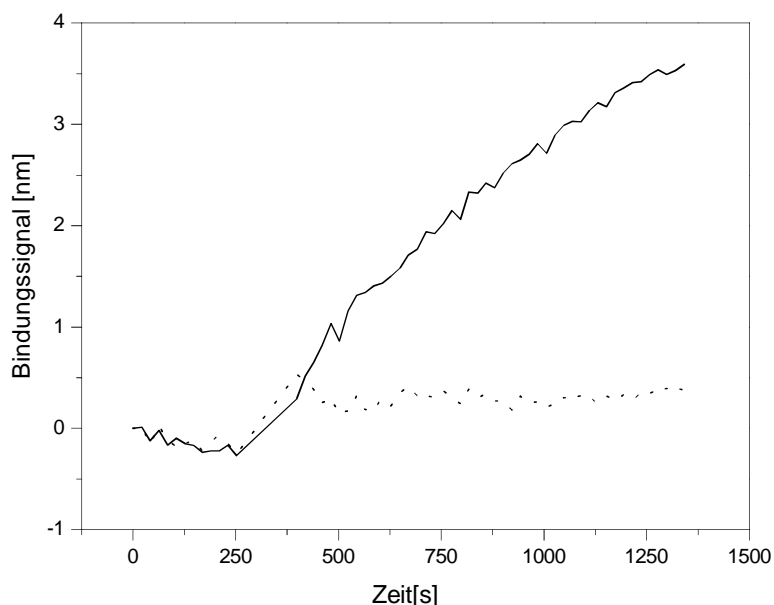


Fig. 60: Untersuchung der Spezifität der Bindungssignale: Während der freie Antikörper an das oberflächengebundene Triazin bindet (—), zeigt der inhibierte Antikörper keine Wechselwirkung (---).

4.2.3.3 Screening der Triazinbibliothek mit unterschiedlichen Targets

Insgesamt wurden die Bindungseigenschaften von 4 verschiedenen Antikörpern mit den 36 Triazinen und den 16 Referenzsubstanzen der Bibliothek untersucht. Verwendet wurden folgende Antikörper:

Monoklonaler α -Atrazin-Antikörper K4E7

Polyklonaler α -Simazin-Antikörper

Monoklonaler Triazinantikörper K1F4

Polyklonaler α -Isoproturon-Antikörper

Die Bindungssignale, die mit diesen Antikörpern auf der mit Triazinen belegten RfS-MTP erhalten wurden, sind in Fig. 61 gezeigt. Der α -Isoproturon-Antikörper besitzt nur geringe Kreuzreaktivität zu Triazinen und sollte deshalb mit keiner der Substanzen wechselwirken. Die Tatsache, dass mit diesem Antikörper keine Bindungssignale detektiert wurden, bestätigte

dies und zeigte nochmals, dass in der RIfS-MTP praktisch keine unspezifische Bindung auftrat. Die 3 Triazin-spezifischen Antikörper erkannten die einzelnen Triazinderivate unterschiedlich gut. K1F4 differenzierte nur wenig zwischen den Triazinen mit unterschiedlichen Seitengruppen, während der α -Simazin-Antikörper und K4E7 deutliche Unterschiede in der Wechselwirkung zu unterschiedlichen Triazinen zeigten. Damit waren vor allem die beiden letzteren für eine über das Screening hinausgehende Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Affinität geeignet.

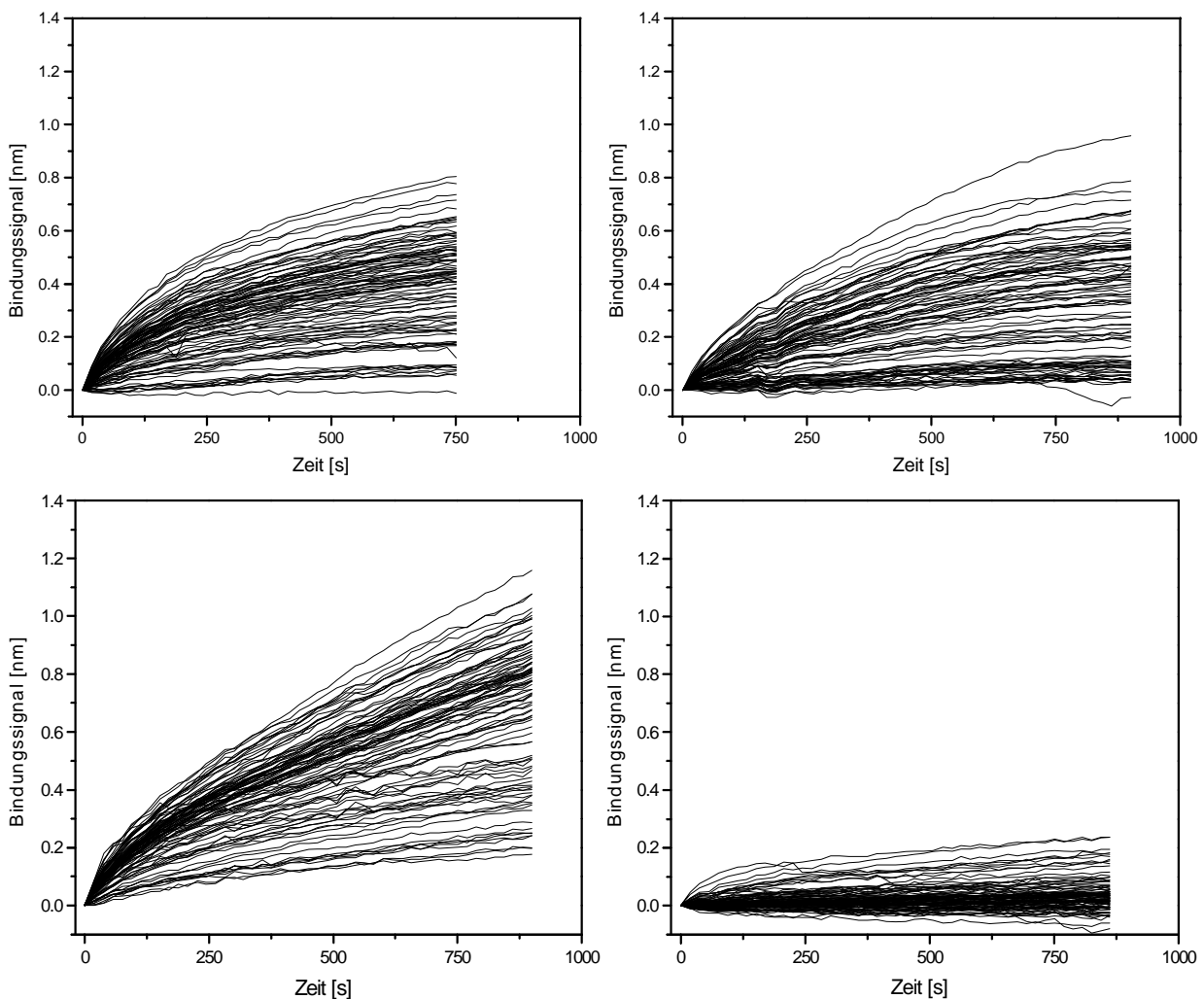


Fig. 61: Bindungskurven unterschiedlicher Antikörper mit der immobilisierten Triazin-Bibliothek: Von links oben nach rechts unten: K4E7, α -Simazin, K1F4, α -Isoproturon.

Fig. 61 eignete sich dazu, prinzipiell festzustellen, ob die verwendeten Targets Wechselwirkungen zeigten. Zur Zuordnung der Signale wurden die Bindungssignale nach

750 s Bindung verwendet. Diese wurden in Fig. 62 für den α -Simazin-Antikörper und für K4E7 analog ihrer Position auf der RIfS-MTP aufgetragen. Dabei entsprachen Balken gleicher Färbung den Triazinderivaten, die sich nur im Rest R1, nicht aber im Rest R2 unterschieden. Um die Reproduzierbarkeit der Signale feststellen zu können wurde jede Substanz in 2 benachbarten Wells synthetisiert. Damit gehörten jeweils 2 benachbarte Wells mit identischer Färbung zur selben Substanzen. Die exakten Bindungssignale wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Substanzbezeichnungen können Kapitel 3.2.1.6 entnommen werden. Als Fehler sind die Abweichungen vom Mittelwert angegeben, die sich ergeben, wenn man Wells mit gleichem Triazinderivat miteinander vergleicht.

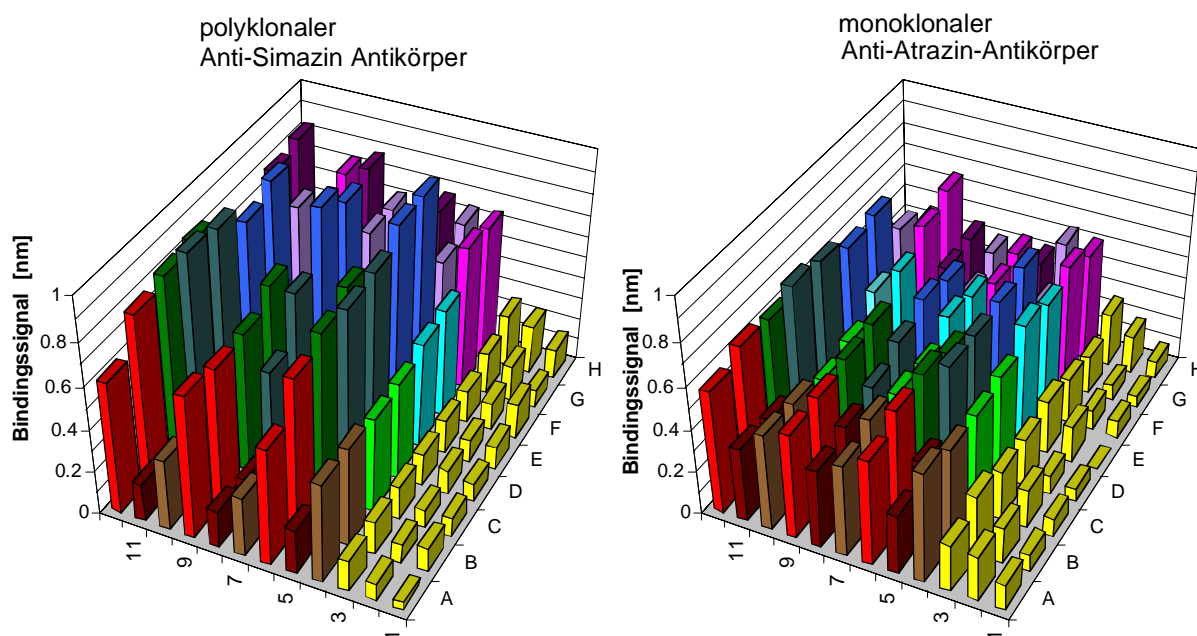


Fig. 62: Screeningergebnisse für zwei der untersuchten Triazin-Antikörper. Reihe 1-3: Vergleichssubstanzen, Reihe 4-12: Triazinderivate.

Tabelle 10 Bindungssignale der Triazinderivate mit dem polyklonalen α -Simazin-Antikörper und mit K4E7.

Substanz*	α -Simazin [nm]	K4E7 [nm]	Substanz	α -Simazin [nm]	K4E7 [nm]
1a	0,46 \pm 0,001	0,49 \pm 0,042	1g	0,50 \pm 0,011	0,56 \pm 0,030
1b	0,22 \pm 0,014	0,33 \pm 0,059	1h	1,06 \pm 0,049	0,67 \pm 0,020
1c	0,62 \pm 0,115	0,53 \pm 0,049	1i	0,58 \pm 0,034	0,33 \pm 0,080
2a	0,30 \pm 0,036	0,45 \pm 0,040	2g	0,48 \pm 0,016	0,50 \pm 0,027
2b	0,16 \pm 0,009	0,39 \pm 0,033	2h	0,93 \pm 0,071	0,55 \pm 0,033
2c	0,65 \pm 0,020	0,50 \pm 0,013	2i	0,51 \pm 0,051	0,31 \pm 0,017
3a	0,365 \pm 0,035	0,45 \pm 0,004	3g	0,45 \pm 0,086	0,52 \pm 0,023
3b	0,16 \pm 0,018	0,34 \pm 0,011	3h	0,86 \pm 0,046	0,73 \pm 0,015
3c	0,70 \pm 0,1140	0,61 \pm 0,042	3i	0,54 \pm 0,027	0,22 \pm 0,056
1d	0,45 \pm 0,011	0,49**	1j	0,65 \pm 0,025	0,55 \pm 0,057
1e	0,91 \pm 0,017	0,65 \pm 0,005	1k	0,60 \pm 0,038	0,46 \pm 0,106
1f	0,79 \pm 0,043	0,55 \pm 0,038	1l	0,62 \pm 0,056	0,38 \pm 0,042
2d	0,37 \pm 0,009	0,44 \pm 0,007	2j	0,50 \pm 0,016	0,42 \pm 0,013
2e	0,62 \pm 0,154	0,48 \pm 0,045	2k	0,62 \pm 0,008	0,37 \pm 0,043
2f	0,69 \pm 0,059	0,55 \pm 0,018	2l	0,74 \pm 0,049	0,43 \pm 0,012
3d	0,34 \pm 0,002	0,42 \pm 0,023	3j	0,71 \pm 0,020	0,62 \pm 0,035
3e	0,94 \pm 0,014	0,80 \pm 0,018	3k	0,60 \pm 0,081	0,50 \pm 0,073
3f	0,83 \pm 0,017	0,61 \pm 0,017	3l	0,81 \pm 0,027	0,39 \pm 0,107

* die entsprechenden Strukturen finden sich in Kapitel 3.2.1.6

** Einfachmessung.

An den Signalen für identische Substanzen ist die hohe Reproduzierbarkeit der Bindungssignale zu erkennen. Des weiteren erkennt man, dass die Signale für Substanzen, die lediglich im Rest R1 variierten, sich in den meisten Fällen kaum unterschieden. Das heißt aber, dass der weniger zugängliche Rest R1 einen geringeren Einfluss auf die Bindungsstärke besaß als R2. Dabei zeigten vor allem Triazine mit großen Seitenketten (Substanzen 1b, 2b, 3b) eine verminderte Affinität zu beiden Antikörpern, während Triazine mit kleinen Seitenketten (Substanzen 1e, 2e, 3e, 1h, 2h, 3h, 1f, 2f, 3f) eine höhere Affinität zeigten. Die Abhängigkeit der Affinität von der Größe der Seitenkette der Triazine ist für andere Antikörper bereits bekannt (Bruun *et al.* 2001).

Die Tatsache, dass der Rest R1 für die Wechselwirkung nur eine untergeordnete Rolle spielte, traf zwar für die meisten Substanzen zu, es wurden aber auch Fälle gefunden, bei denen der Einfluss von R1 deutlich zu sehen war. Am Beispiel von 6 Substanzen und deren Bindungssignale zum α -Simazin-Antikörper und zu K4E7 soll die gefundene Struktur-Affinitätsbeziehung in Abhängigkeit vom Rest R1 gezeigt werden (Fig. 63).

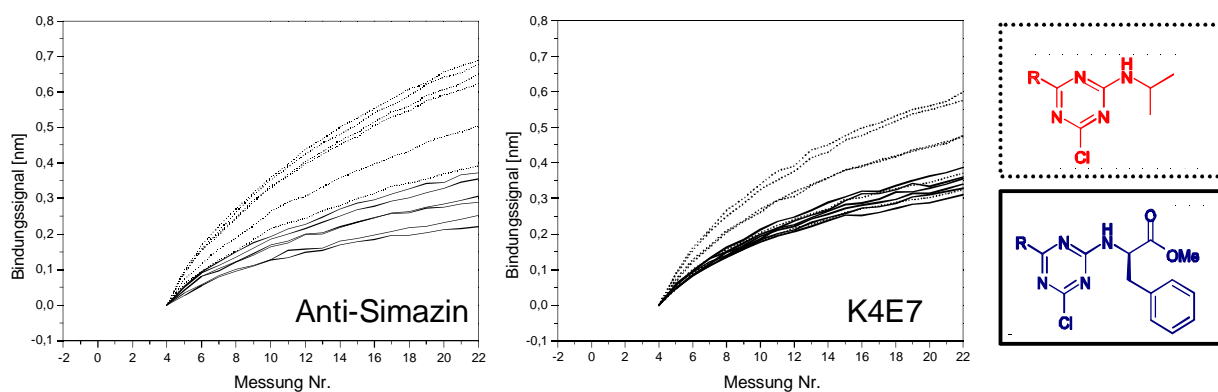


Fig. 63: Ausgewählte Bindungssignale zur Untersuchung des Einflusses von R1 auf die Affinität. Jeweils 2 Bindungskurven gehören zur selben Substanz. Substanzen, die sich nur im Rest R1 unterscheiden sind mit der selben Schraffur gezeichnet. Gezeigt sind die Wechselwirkungen der beiden Antikörper mit den Substanzen 1a,2a,3a (—) und 1e,2e,3e (-----).

K4E7 konnte nicht zwischen den Substanzen 1a, 2a und 3a unterscheiden. Diese unterschieden sich nur im Rest R1 und besaßen alle eine voluminöse Phenylalanin-methylestergruppe als R2. Für die Verbindungen 1e, 2e und 3e, die sich ebenfalls im Rest R1 unterschieden, allerdings eine relativ kleine Isopropylamingruppe als Rest R2 trugen, hing das Bindungssignal deutlich vom Rest R1 ab (Aufspaltung in den Bindungskurven analog ihrer Reste R1). Die stärkste Wechselwirkung wurde mit R1 = Phe erhalten, die schwächste mit R1 = Ahx. Der α -Simazin-Antikörper zeigt mit denselben Substanzen ein anderes Verhalten. Er konnte, wenn auch nur in geringem Ausmaß zwischen den Substanzen 1e, 2e und 3e unterscheiden, was sich durch die Aufspaltung in 3 Bindungskurvenpaare bemerkbar machte. Die Substanzen 1a, 2a und 3a wurden hingegen vom α -Simazin-Antikörper deutlich weniger diskriminiert als von K4E7.

4.2.3.4 Zusammenfassung

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Kombination der RIFS mit der kombinatorischen Festphasensynthese für Screeningexperimente geeignet ist. Die Integration von Synthese und Testung in ein System erleichterte und beschleunigte dabei die Wirkstofffindung durch den Wegfall von Arbeitsschritten wie Abspalten vom Träger, Substanzquantifizierung oder Proben transfer. Zusätzlich stellte das einfache Testformat einen Vorteil gegenüber gängigen Screeningassays dar. Da sich das Bindungssignal nicht nur bei der Wechselwirkung mit dem Antikörper, sondern bereits während der einzelnen Schritte der Substanzsynthesen ändert, ist es denkbar, dass mit Hilfe der parallelen RIFS bereits diese Synthese verfolgt, kontrolliert und optimiert werden kann. Dazu muss aber, im Hinblick auf die dabei auftretenden kleinen Signaländerungen, ein deutlich besseres Auflösungsvermögen der

RIfS-Detektionseinheit erreicht werden. Dass solche Reaktionsverfolgungen möglich sind wurde mit einem Einkanalgerät bereits gezeigt (Haake *et al.* 2001).

4.2.4 ASSAYENTWICKLUNG ZUR UNTERSUCHUNG VON PHOSPHOTYROSINKINASEN

Beim *Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R)* handelt es sich um ein Enzym, das zur Phosphorylierung von Proteinen befähigt ist, also um eine Phosphotyrosinkinase (vgl. Kapitel 2.9).

Die Entwicklung eines Screeningassays, mit dem Inhibitoren für den EGF-R gefunden werden sollten, basierte auf Messungen, die bei der Firma Boehringer Ingelheim durchgeführt wurden⁶. Dort wurde das System mit Hilfe eines Einkanal-RIfS-Systems untersucht und der Assay für die Einkanal-Messungen optimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Assay-System auf das parallele RIfS-System übertragen und ein exemplarisches Screening durchgeführt.

4.2.4.1 Der Aufbau des Screening-Assays

Beim durchgeführten Assay handelte es sich im Gegensatz zum Thrombin-Assay um einen funktionellen Assay. Das heißt, es wurde nicht untersucht, ob eine Substanz an das Enzym EGF-R bindet, sondern es wurde die tatsächliche Aktivität, in diesem Fall die Fähigkeit Tyrosingruppen in Proteinen zu phosphorylieren, detektiert. Die Detektion mittels RIfS, die auf der Bindung einer Komponente an die Oberfläche basiert, wurde indirekt mit einem Antikörper-Hilfssystem erreicht. Der komplette Ablauf des Assays war folgender (vgl. Fig. 64):

Als Substrat diente ein Peptid, das nur aus den Aminosäuren Glutaminsäure und Tyrosin bestand (poly GT). Die Tyrosinreste in diesem Substrat konnten von der Phosphotyrosinkinase EGF-R phosphoryliert werden. Dazu waren sehr genau definierte Reaktionsbedingungen, wie z.B. die Anwesenheit von ATP und eine Temperatur von 30°C nötig. Alle diese Anforderungen wurden im Messprotokoll berücksichtigt. Nach 2h sollte eine aktive Kinase genügend Substrat umgesetzt haben. Ist die Kinase inhibiert, so sollte kein phosphoryliertes Substrat in der Reaktionslösung vorhanden sein.

Zu den Proben wurde anschließend ein Antikörper gegeben, der an phosphorylierte Tyrosinreste band, der aber nicht phosphorylierte Tyrosinreste nicht erkannte. Damit wurden

⁶ Projekt LIBRARIAN II und gesonderte Kooperation mit Boehringer Ingelheim: Herr Dr. Gerald Birk und Herr Steffen Hadamovsky.

nur bei vorhandenem Phosphotyrosin, also bei aktiver Kinase, die Bindungsstellen des Antikörpers abgesättigt.

Mittels RIfS konnte nun unter Verwendung einer Oberfläche, an die Phosphotyrosin gebunden war, getestet werden, ob sich in der Probenlösung noch Antikörper mit freien Phosphotyrosinbindungsstellen befinden. Damit konnte dann auf die Aktivität des EGF-R geschlossen werden. Der gesamte Assay ist schematisch in Fig. 64 gezeigt. Wenn die Kinase aktiv ist, wird kein Antikörpersignal erhalten, bei inaktiver Kinase bindet der Antikörper an die Transduceroberfläche.

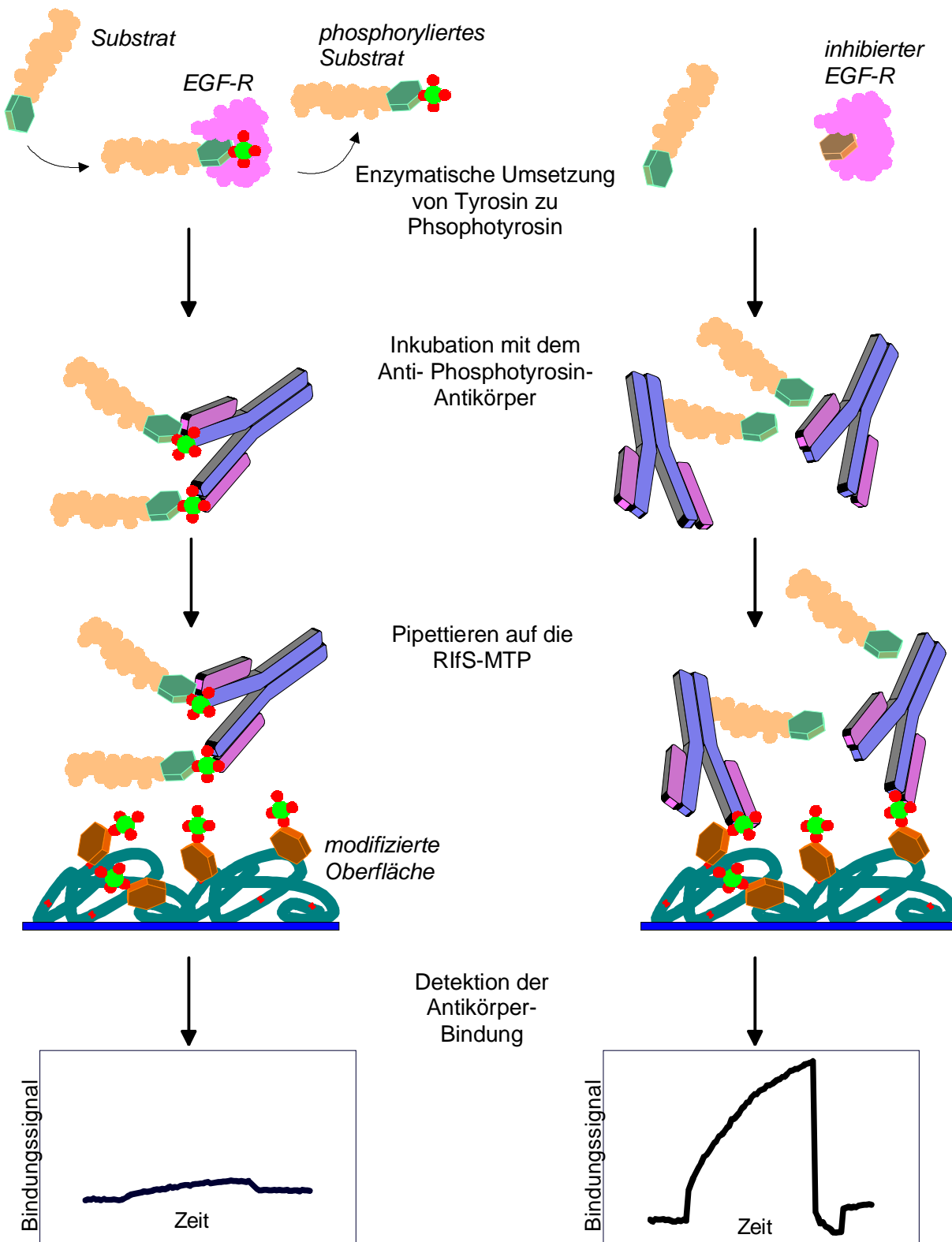


Fig. 64: Schematischer Aufbau des Phosphotyrosinase-Assays.

4.2.4.2 Optimierung der Phosphotyrosinoberfläche

Die wichtigste Voraussetzung für die Umsetzung des beschriebenen Assays war, dass die Wechselwirkung des Antikörpers mit der Sensoroberfläche detektierbar ist. Im Einkanalssystem konnte dazu ein erfolgreiches Protokoll erarbeitet werden, mit dem

Antikörpersignale von ca. 3 nm erreicht wurden (Hadamovsky *et. al.* 2000). Auf Grund des Umstandes, dass man mit dem parallelen RfS-Aufbau ein deutlich schlechteres Signal:Rausch-Verhältnis erreicht, konnte auf solchen Oberflächen allerdings kein Antikörpersignal detektiert werden. Bindungsergebnisse bei einer 1:1 Übertragung des Einkanal-RfS-Assays sind in Fig. 65 gezeigt. Hierbei konnte keine spezifische Wechselwirkung des Antikörpers festgestellt werden. Der Versuchsaufbau und die Skalierung entsprechen dabei denen in Fig. 68, die nach der Oberflächen-Optimierung erhalten wurden.

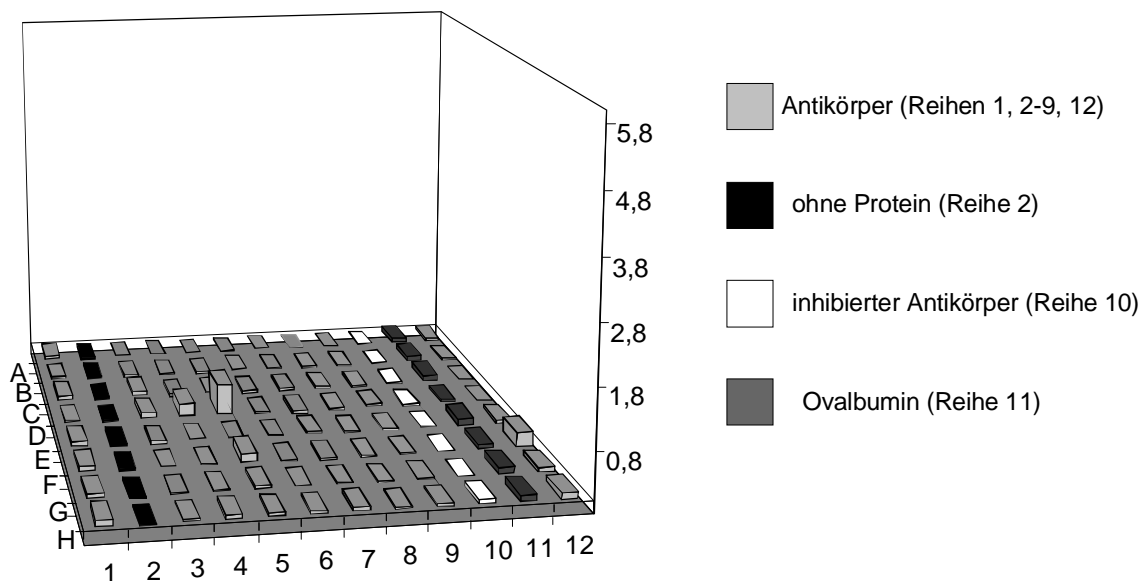


Fig. 65: Bindungssignale bei der Verwendung von Oberflächen, die analog den Einkanaltransducern hergestellt wurden.

Die Vermutung, dass für das negative Ergebnis vor allem die Dichte der Phosphotyrosinmoleküle an der Transduceroberfläche verantwortlich war, konnte durch die Optimierung des Immobilisierungsprotokolls bestätigt werden. Diese Messungen wurden am Einkanalssystem durchgeführt.

Um eine Immobilisierung des Phosphotyrosins ohne Quervernetzung zu erreichen, wurden ein Phosphotyrosin eingesetzt, dessen Aminofunktion mit einer Fmoc-Gruppe geschützt war (Fig. 66). Durch das Verwenden einer Fmoc-Schutzgruppe konnte unterbunden werden, dass das aktivierte Reagenz bereits vor dem Kontakt mit der Transduceroberfläche polymerisiert. Nach erfolgter Kupplung über TBTU-Chemie wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten und das freie Phosphotyrosin an der Oberfläche erhalten.

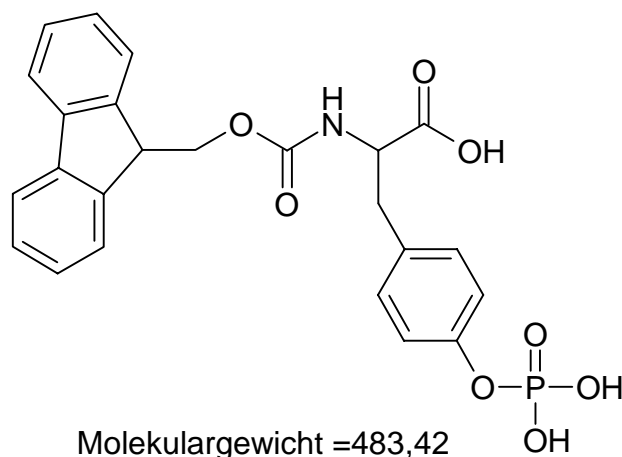


Fig. 66: Das Fmoc-geschützte Phosphotyrosin erlaubt eine gerichtete Immobilisierung ohne die Gefahr einer Polymerisierung.

Während sich Fmoc-Phosphotyrosin nur mäßig im Lösungsmittel DMF löste, zeigte der intermediär entstehende TBTU-Aktivester eine bessere Löslichkeit. Dadurch konnten höherkonzentrierte Immobilisierungsreagenzlösungen hergestellt und damit eine bessere Belegung mit Phosphotyrosin erhalten werden. In Fig. 67 (links) sind die mit solchen Oberflächen erhaltenen Antikörpersignale in Abhängigkeit der Konzentration an Fmoc-Phosphotyrosin in der Immobilisierungslösung gezeigt. Durch hochkonzentrierte Lösungen konnten bis zu 1,4 nm Antikörper gebunden werden, wobei zu erkennen war, dass Konzentrationen über 1 g/ml zu keiner merklichen weiteren Verbesserung führten.

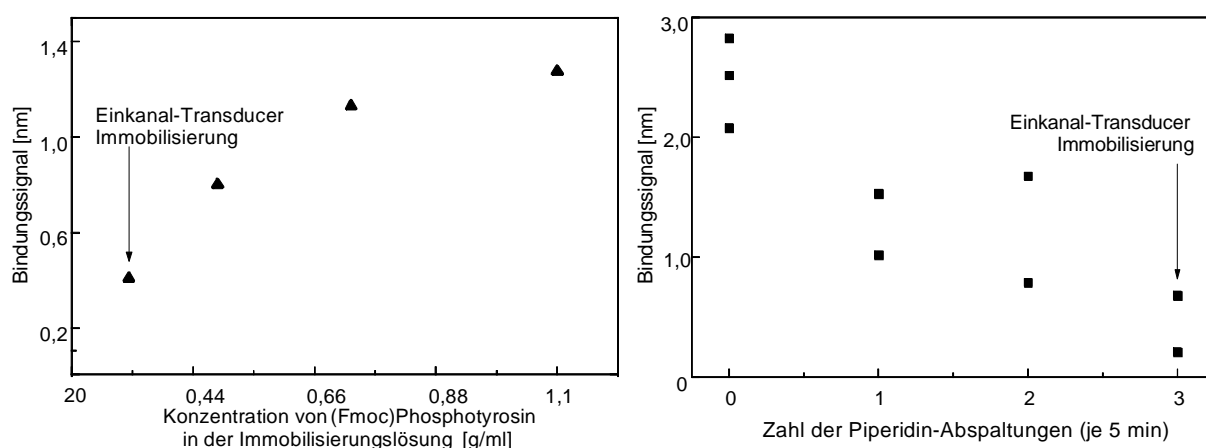


Fig. 67: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Immobilisierung von (Fmoc-)Phosphotyrosin.

Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde Piperidin benutzt. Als Base ist Piperidin in der Lage, die Transduceroberfläche anzugreifen. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt versucht, die Piperidinbehandlung auf ein Mindestmaß zu verkürzen (Fig. 67, rechts). Dabei stellte sich

heraus, dass auf die Behandlung mit Piperidin gänzlich verzichtet werden konnte, da der Antikörper nicht zwischen geschütztem und freiem Phosphotyrosin unterschied. Durch den Verzicht auf die Piperidinbehandlung konnte das Antikörpersignal auf ca. 3 nm verbessert werden.

4.2.4.3 Wechselwirkung des Phosphotyrosinantikörpers mit der Phosphotyrosin-oberfläche

Mit der optimierten Transduceroberfläche wurden erneut Antikörperbindungen auf dem parallelen Aufbau untersucht (Fig. 68). Dazu wurden, bedingt durch die Oberflächenchemie, modifizierte AMD-RfS-Mikrotiterplatten aus Polypropylen verwendet. Die Proben bestanden dabei aus Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml. In einigen Wells wurde der Antikörper mit Fmoc-Phosphotyrosin (25 µM) vorinkubiert, so dass seine Bindungsstellen blockiert waren (Reihe 10). Daneben wurden als Referenz Ovalbumin (1 mg/ml; Reihe 11) und PBS-Puffer ohne Protein (Reihe 2) gemessen. Die entscheidende Aussage aus diesem Experiment war, dass die spezifische Bindung des Antikörpers klar nachgewiesen werden konnte, denn während die reine Antikörperlösung Signale zwischen 1 und 4 nm ergaben, lagen die Signale für inkubierten Antikörper deutlich unter 0,2 nm.

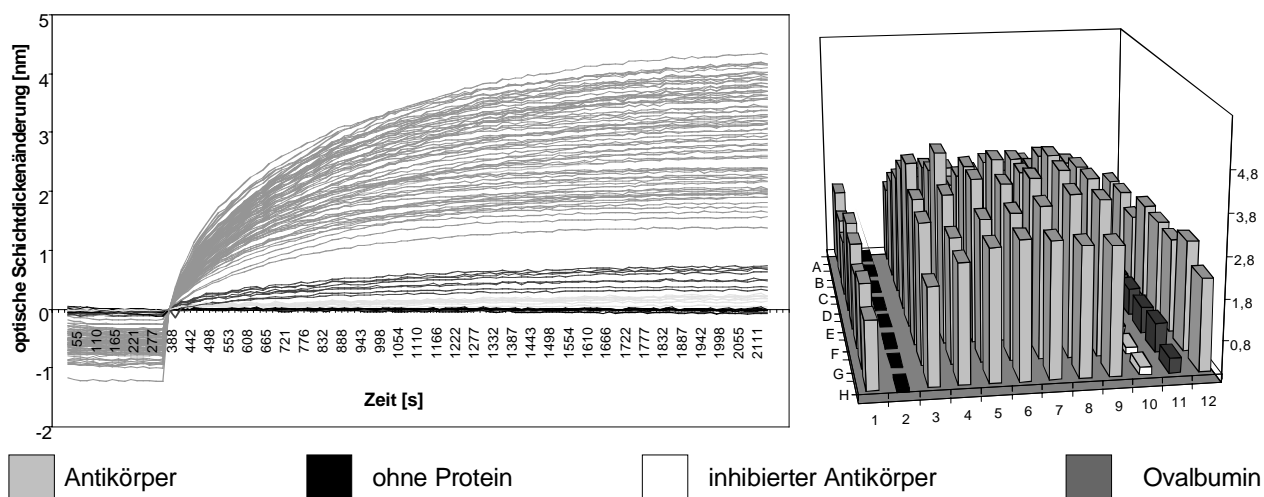


Fig. 68: Bindungssignale bei 20 µg/ml Antikörper. Außerdem sind Signale von inhibiertem Antikörper, von Ovalbuminlösung und von Proben ohne Protein gezeigt.

Die große Streuung der Signale für bindenden Antikörper kam auch bei diesem Experiment durch Platteninhomogenitäten zustande. Dies wurde deutlich, wenn man die Bindungsendpunkte als Balkendiagramm auftrug (Fig. 68, rechts). Vor allem an den Plattenrändern wurden sehr niedrige Bindungssignale erhalten. Diese Inhomogenität konnte aber, genauso wie im Thrombin-Assay, durch eine Referenzierung erfasst und ausgeglichen werden. In Fig. 69 sind die referenzierten Signale für die Messung aus Fig. 68 zu sehen.

Dabei sind nur die Signale für gebundenen Antikörper gezeigt (Reihe 1, 2-9,12). Sämtliche Signale lagen bei weniger als 15% Abweichung vom Idealwert, was die Spezifikation für ein Screening erfüllte.

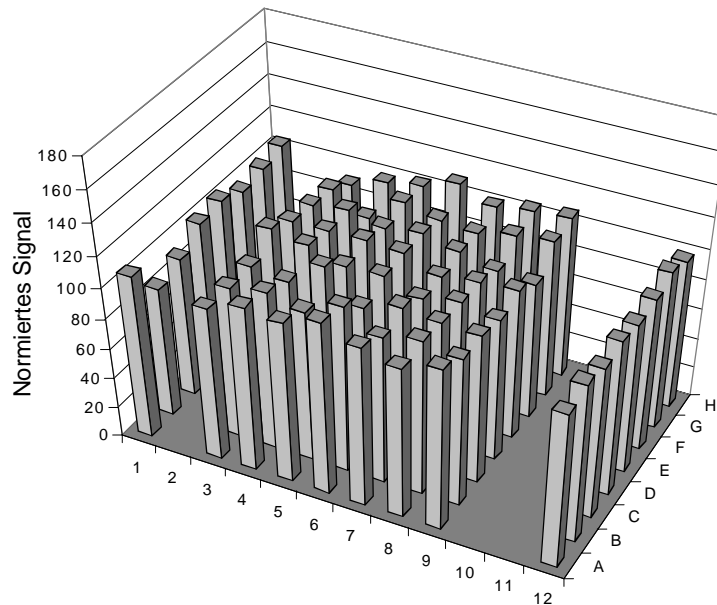


Fig. 69: Referenzierung der Antikörpersignale.

4.2.4.4 Optimierung der Assay-Komponenten

Die Detektion der Kinaseaktivität erfolgte indirekt über die Bindungssignale des Phosphotyrosin-Antikörpers. Deshalb musste die Antikörperkonzentration so gewählt werden, dass mit dem parallelen RfS-Aufbau auswertbare Signale erhalten werden konnten. Die Bindung von Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen ist in Fig. 70 gezeigt. Mit Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/ml}$ (2 $\mu\text{g/well}$) wurden geeignete Signale zwischen 1 und 3 nm erhalten. Auch bei kleineren Konzentrationen von bis zu 5 $\mu\text{g/ml}$ (0,5 $\mu\text{g/well}$) konnten die Bindungssignale noch detektiert werden, allerdings ließen recht kleine Signale nur wenig Spielraum für eine eindeutige Hit-Identifizierung. Deshalb wurden bei den Screeningexperimenten Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper verwendet.

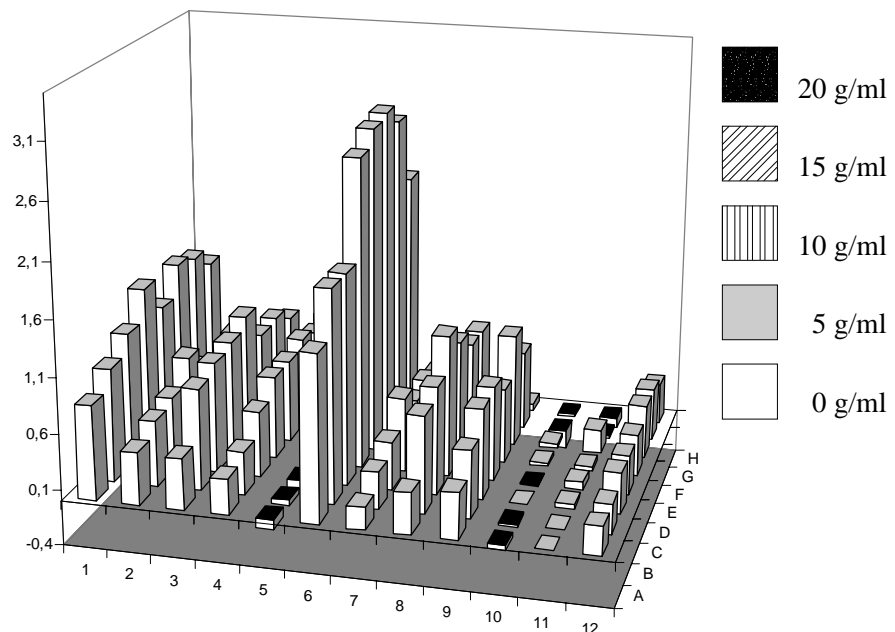


Fig. 70: Bindungssignale in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration.

Die Antikörperbindung dient zum Nachweis von phosphoryliertem Substrat. Das Substrat wird in einem vorgelagerten Schritt durch die Kinase EGF-R phosphoryliert.

Das Substrat poly-GT und der Phosphatträger ATP sollten im Überschuss verwendet werden um eine ideale Kinaseaktivität zu erhalten. Mit Konzentrationen von 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ poly-GT und 10^{-4}M ATP wurde dies realisiert. Bei diesen Überschüssen sollten geringfügige Konzentrationsschwankungen keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität ausüben. Damit war für den ersten Schritt des Assays, der in der Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf das Substrat bestand, vor allem die Konzentration der Kinase sowie die Inkubationsdauer für diese Umsetzung entscheidend. Idealerweise sollten die Bedingungen so gewählt werden, dass genau soviel phosphoryliertes Substrat entsteht, um alle Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Antikörpersignale, die man bei unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen erreichte, sind in Fig. 71 zu sehen. Dort sind die Antikörpersignale bei aktiver Kinase und bei inaktiver Kinase gezeigt. Die Inaktivierung der Kinase erfolgte dadurch, dass bei solchen Proben kein ATP zugegeben wurde. Bei 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ Antikörper und 8 units EGF-R konnte eine Signaldifferenzierung, wie sie für das Screening gefordert wird, erreicht werden. Wurde die Kinasekonzentration geringer gewählt, dann konnte nicht genügend Substrat phosphoryliert werden, um eine Absättigung der Antikörperbindungsstellen zu erreichen. Höhere Kinasekonzentrationen waren auf Grund der Kosten nicht vertretbar.

Für die Inkubationszeit der Kinase wurde ein Idealwert von 2 h bei 30°C gefunden. Bei kürzeren Inkubationszeiten wurde nicht genügend Substrat umgesetzt.

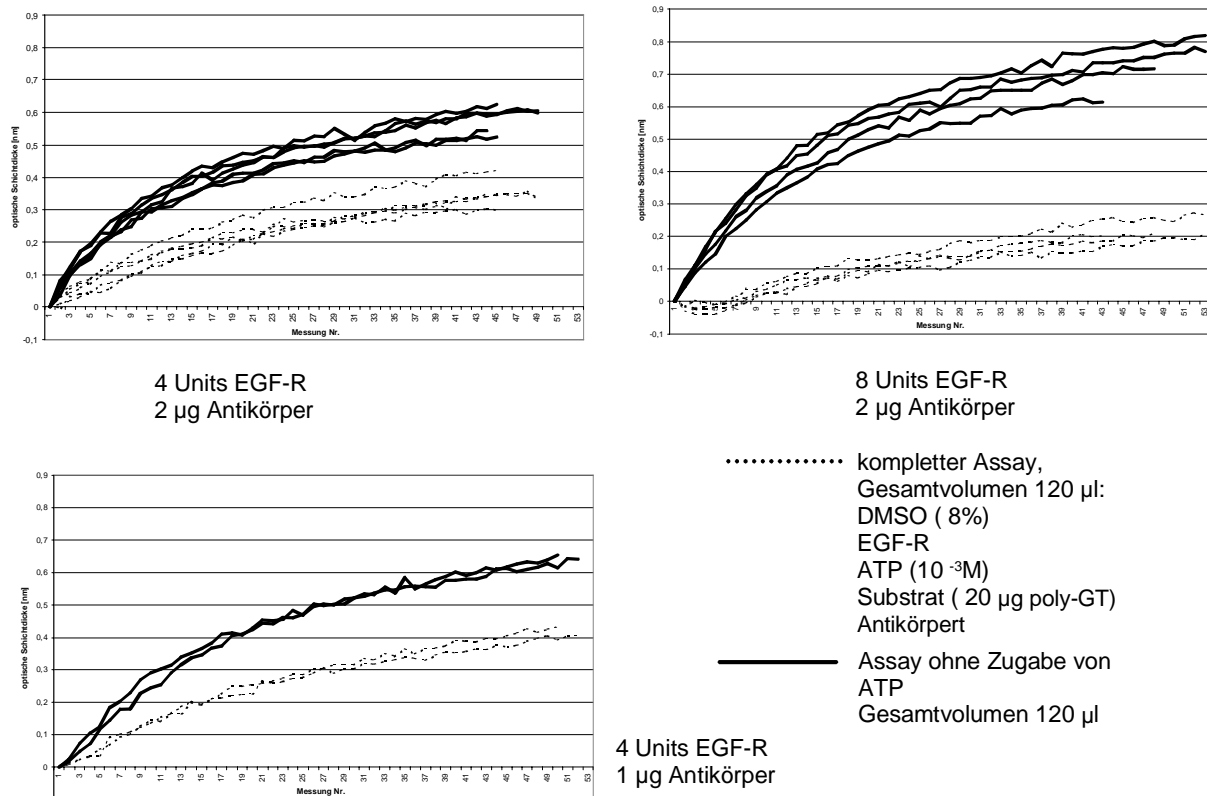


Fig. 71: Optimierung der Kinase- und der Antikörperkonzentration.

Mit den optimierten Konzentrationen für Antikörper und Kinase wurde dann mit Hilfe des bekannten Inhibitors Genistein untersucht, ob sich inhibierte von nicht inhibierter Kinase unterscheiden ließ. Der Inhibitor Genistein wurde dabei in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2} M$ eingesetzt. Die Antikörpersignale für inhibierte und freie Kinase sind in Fig. 72 zu sehen. Daneben wurden, um die Ergebnisse besser bewerten zu können, die Maximalsignale des Antikörpers ohne Zugabe von Kinase bzw. ATP gemessen. Dabei wurde ein deutlicher Signalunterschied zwischen Proben mit aktiver Kinase und Proben mit inhibierter Kinase erhalten. Dieser Unterschied wurde für eine Hit-Identifikation als ausreichend bewertet. Der Umstand, dass bei Proben mit Inhibitorzusatz ein kleineres als das Maximalsignal (Maximalsignal ca. 0,7 nm) erhalten wurde, zeigte, dass beim gewählten Konzentrationsverhältnis zwischen Inhibitor und Kinase keine vollständige Inhibition stattfand. Höhere Inhibitorkonzentrationen schieden aber auf Grund der Konzentrationsverhältnisse von Substanzbibliotheken aus. Damit erhielt man bei diesem Experiment einen Signalfeldbereich von 0 – 0,5 nm, um eine Hit-Identifikation durchzuführen.

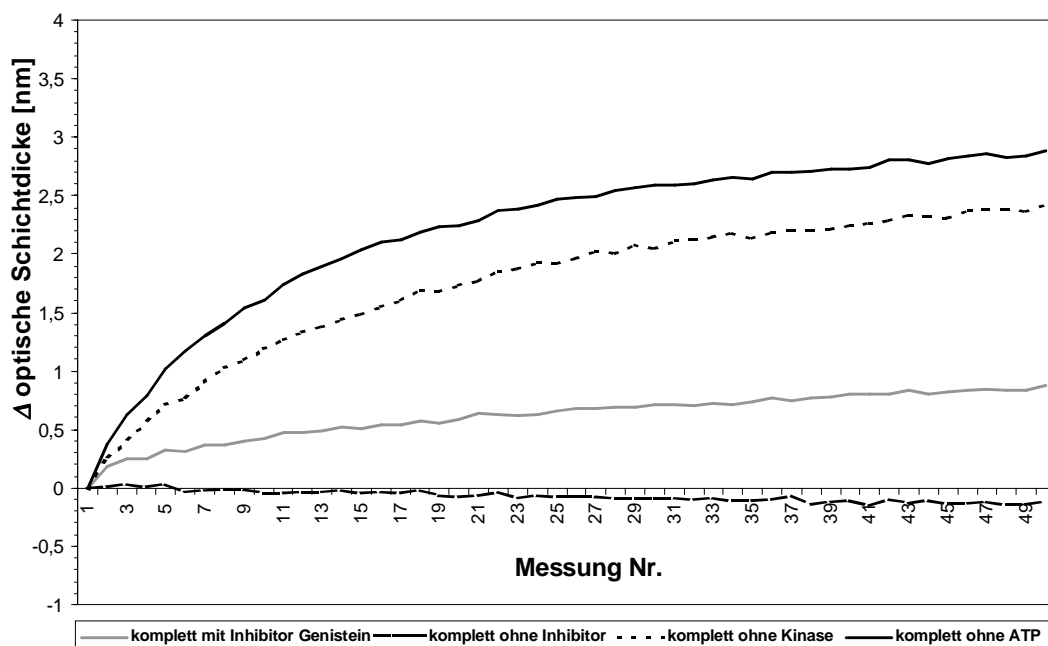


Fig. 72: Messungen in einzelnen Wells: Messung von aktiver und inhibierter Kinase sowie von Vergleichsproben.

4.2.4.5 Parallele Messung von Inhibitoraktivität

Mit den in 4.2.4.4 erarbeiteten Parametern wurde ein Screening mit bekannten Inhibitoren für den EGF-Rezeptor (Fig. 73) in einer RIfS-MTP durchgeführt.

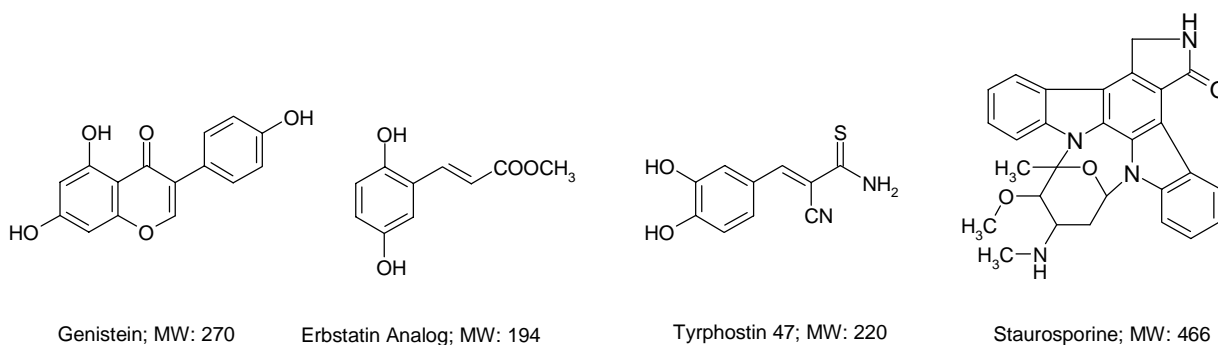


Fig. 73: Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren für den EGF-Rezeptor.

Dabei wurden Proben gemessen, die

a) *aktive Kinase*

b) *inhibierte Kinase*

Inhibitor Genistein, $2 \cdot 10^{-2} M$

Inhibitor Erbstatin Analog, $2 \cdot 10^{-2} M$

Inhibitor Tyrphostin 47, $2 \cdot 10^{-2} M$

c) *keine Kinase*

enthielten. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu testen, wurden dieselben Proben mehrfach gemessen. In Fig. 74 sind die drei Probentypen (a-c) der Übersicht halber in

getrennte Diagramme eingezeichnet. Dabei entsprechen jeweils vier benachbarte Signale (quadratisch angeordnet) der Vierfachmessung derselben Probe. Für ein Screening waren die Proben (a) und (b) von Interesse. Selbst ohne eine Referenzierung konnten die Proben mit inhibierter Kinase eindeutig wiedergefunden werden: Während die aktive Kinase Signale von $< 0,13$ nm lieferte, zeigen Proben mit inhibierter Kinase Signale $> 0,2$ nm. Dabei wurde bei allen drei Inhibitoren (Genistein *G*, Erbstatin Analog *E*, Tyrophostin 47 *T*) eine nahezu vollständige Desaktivierung erreicht, was daran zu erkennen war, dass die Antikörpersignale bei inhibierter Kinase (b) den Referenzsignalen (c) entsprachen.

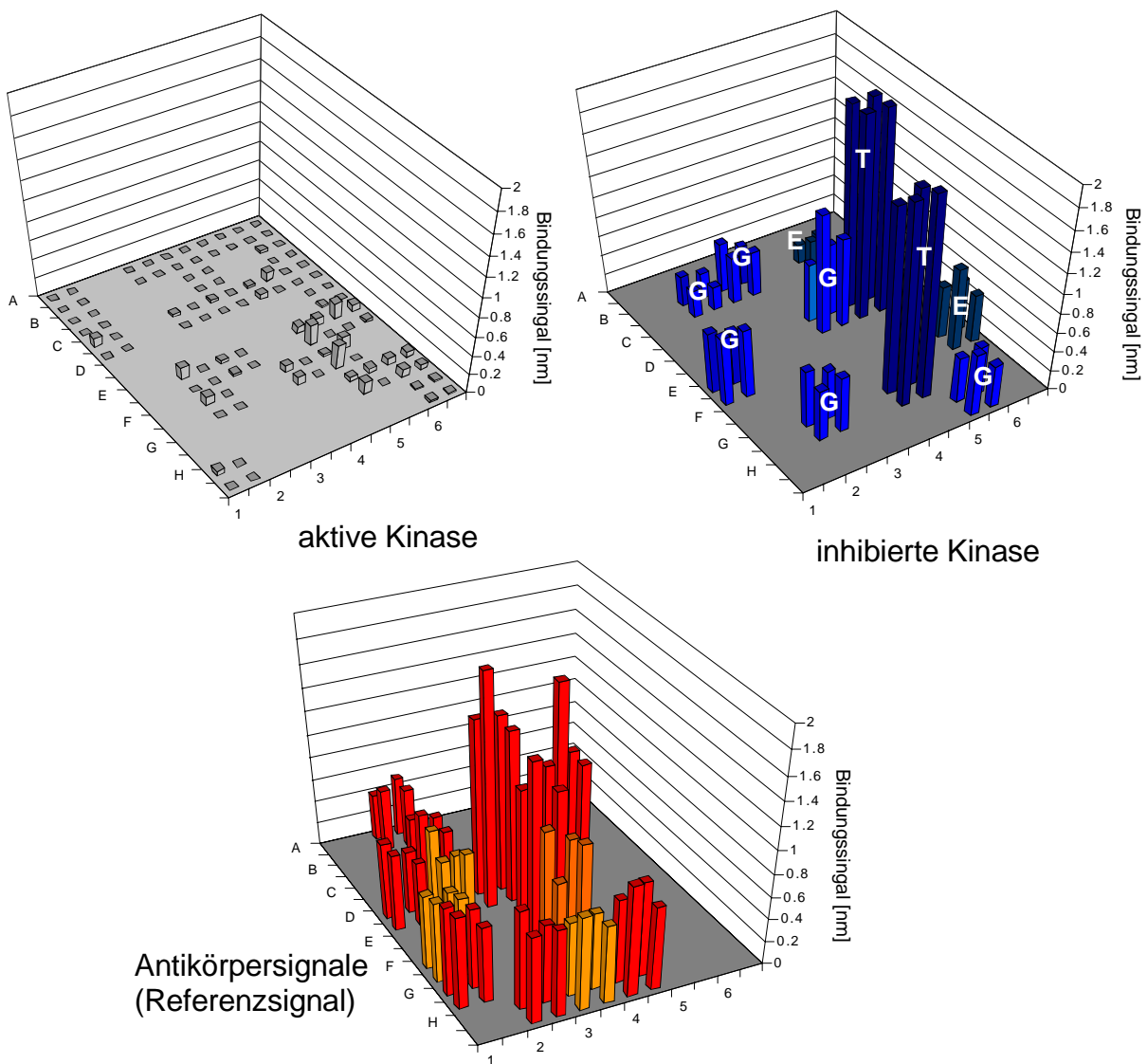


Fig. 74: Parallele Messungen von aktiver und inhibierter Kinase.

4.2.4.6 Screening einer Substanzbibliothek

Von der Firma Boehringer Ingelheim⁷ wurde eine Substanzplatte zur Verfügung gestellt, die 96 Proben enthielt. Darunter befanden sich die Inhibitoren Genistein und Staurosporine. Mit Hilfe des entwickelten Assays, sollte getestet werden, ob Aktivität in einzelnen Proben nachgewiesen werden konnte. Das Ergebnis ist in Fig. 75 zu sehen. Während geringe Inhibitorkonzentrationen (Genistein: 10^{-4} M; Staurosporine: 10^{-5} M) nicht zur Inhibition ausreichen, konnten höhere Inhibitorkonzentrationen (Genistein 10^{-3} M; Staurosporine 10^{-4} M) eindeutig als Hit identifiziert werden.

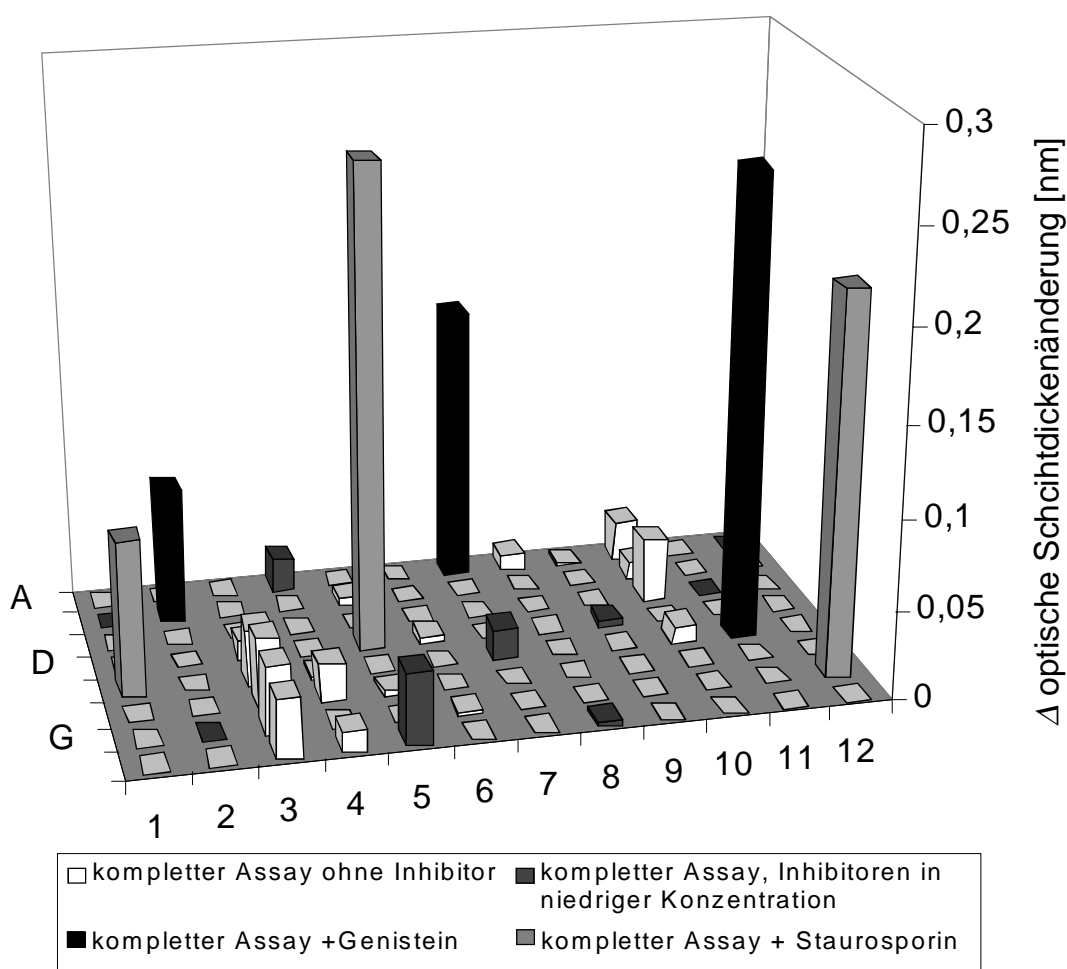


Fig. 75: Screening von 96 Proben auf ihre Inhibitionswirkung auf den EGF-Rezeptor.

4.2.4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Optimierung

Durch die Optimierung der verschiedenen Einflussgrößen ergaben sich als optimale Parameter für den untersuchten Screeningassay für EGF-R-Inhibitoren:

⁷ Die Proben stammten von Herrn Steffen Hadamovsky, Abteilung Leitstrukturfindung, Gruppe HTS; Biberach an der Riss.

Tabelle 11 Optimierte Parameter für den Screeningassay für das System Thrombin-Inhibitor.

Parameter	Optimiere Werte
<i>EGF-R-Konzentration</i>	0,8 units/ μ l
<i>Wirkstoffkonzentration</i>	$> 10^{-4}$ M
<i>Antikörperkonzentration</i>	20 μ g/ml
<i>Regenerationsmedium</i>	Pepsinlösung
<i>ATP-Konzentration</i>	10^{-4} M
<i>Substratkonzentration</i>	2 μ g/ml
<i>Inkubationszeit</i>	2 h bei 30°C
<i>DMSO-Zugabe</i>	Beeinflusst die Kinaseaktivität nicht
<i>Referenzierungsmethode</i>	Referenzierung auf das maximale Bindungssignal ist nicht unbedingt erforderlich

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit aufgezeigt, die markierungsfreie Detektion für den Einsatz im Hochdurchsatzscreening zu nutzen. Dabei lag das Augenmerk zum einen auf der Bereitstellung und experimentellen Charakterisierung von unterschiedlichen Transduceroberflächen, mit denen Liganden über Affinitätsbindungen gerichtet immobilisiert werden können. Zum anderen wurde ein für HTS-Anwendungen vorgesehener Prototyp auf seine Eignung hin grundlegend charakterisiert und an unterschiedlichen Beispielassays die Anwendungsbreite sowie die Grenzen des Prototypen aufgezeigt.

Effektive Immobilisierungstechniken, zur kovalenten Immobilisierung von Biotin, (Strept-)Avidin und NTA wurden entwickelt und es wurde gezeigt, dass sich mit diesen Systemen Biotin-Konjugate bzw. His-Tag-Fusionsproteine in unterschiedlicher Dichte auf der Sensoroberfläche immobilisieren lassen, so dass kinetische und thermodynamische Untersuchungen mit Hilfe der RfS möglich waren. Die hohe Stabilität der so hergestellten Schichten ergab gleichbleibende funktionale Eigenschaften über viele Messzyklen hinweg. Damit konnten über Affinitätstitrationen die Affinitätskonstanten von Modellsystemen bestimmt sowie die Affinitätskonstanten des Systems Avidin-Biotin bzw. Biotinkonjugat oder -derivat abgeschätzt werden. Anhand von kinetischen Messungen konnte die Wechselwirkungskinetik von His-Tag-Fusionsproteinen mit einer spezifischen NTA-Oberfläche untersucht werden.

Bei der Charakterisierung des Prototypen konnte gezeigt werden, dass bei solchen Systemen die Homogenität der Transducerplatten von großer Bedeutung sind. Anhand von Modellsystemen wurde gezeigt, dass vorhandene Inhomogenitäten nur durch sinnvolles Referenzieren der Messungen beseitigt werden konnten. Das im Vergleich zu Einkanalssystemen deutlich verringerte Auflösungsvermögen führte zwar dazu, dass kinetische Studien nicht und thermodynamische Abschätzungen nur bedingt möglich waren, trotzdem konnte gezeigt werden, dass über die Anforderungen des HTS hinaus eine quantitative

Bewertung der Ergebnisse möglich ist und dass weiterhin ein deutliches Miniaturisierungspotential vorhanden ist.

Am Beispiel von drei Assays, die in die Kategorien indirekter Assay, direkter Assay und indirekter funktioneller Assay eingeordnet werden können, wurde gezeigt, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Bindungsstudien für ein HTS auf Basis von markierungsfreier optischer Detektion geeignet sind. Dabei störten auch die unvermeidbare Anwesenheit von DMSO nicht. Am Beispiel einer Triazinsubstanzbibliothek wurde gezeigt, wie die Generierung einer Substanzbibliothek durch kombinatorische Festphasensynthese mit dem anschließenden Screening der Bibliothek verbunden werden kann, indem beide Schritte auf einer gemeinsamen Plattform, der RfS-Mikrotiterplatte, durchgeführt wurden.

5.2 Einordnung und Bewertung

Die markierungsfreie Detektion von biomolekularer Wechselwirkung an Oberflächen wird seit über 15 Jahren mit großem Enthusiasmus untersucht. Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Verfahren liegt darin, dass zur Beobachtung der Bindungsereignisse keine der bindenden Komponenten modifiziert werden muss. Dadurch sind solche Techniken im besonderen Maße zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen im Bereich der biochemischen und pharmazeutischen Forschung interessant geworden.

Mit der Entwicklung einer hochparallelen Detektionseinheit gelang es in den letzten Jahren erstmals, eine direkt optische Methode für das HTS zugänglich zu machen. Mit einer Kavitätendichte von 384 Kavitäten je Transducerplatte und einer Auswertzeit von deutlich unter 15 min wird die parallele RfS dabei den hohen Anforderungen an Probandurchsätzen des ultra-HTS gerecht. Auf Grund der zeitaufgelösten Detektion ist abzusehen, dass in Zukunft auch eine parallele kinetische Auswertung der Daten möglich sein wird und sich die parallele RfS damit als HTS-Detektionsmethode etablieren kann. Die Synergien, die sich durch die Verwendung der RfS-Mikrotiterplatte als gemeinsame Plattform von Synthese und Screening ergeben, sollten diese Entwicklung unterstützen.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie als Detektionsmethode im HTS vorgestellt. Die hier präsentierten Ergebnisse sind verheißungsvoll, aber das Potential ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Folgende Ansätze zur Erweiterung und Verbesserung der Methode können weiter verfolgt werden:

Oberflächenchemie

- Die Entwicklung von Oberflächen, auf denen Proteine in eine Phospholipidmembran eingelagert werden, ermöglicht es, mit RIfS auch die Eigenschaften von Membranproteinen zu untersuchen.
- Im Hinblick auf die Probenträger, die Kavitätendichten von 384 und mehr Wells pro MTP enthalten, macht ein Einsatz nur Sinn, wenn die Oberflächenmodifizierung teilweise oder komplett automatisiert abläuft.

Messsystem

- Verbesserung von Nachweisgrenze und Signalstabilität des Detektionssystems, um Änderungen der Beladung hochauflösend detektieren zu können, wie dies bereits bei RIfS-Einkanalsystemen der Fall ist. Dabei muss vor allem der optische Strahlengang sowie die Eigenschaften der reflektierenden Schichten, vor allem der Antireflexschicht, optimiert werden.
- Die Miniaturisierung des System auf Formate von wenigen Quadratmillimetern ermöglicht eine enorme Reduktion des Probenverbrauchs und kann dazu führen, die parallele optische Detektion auch auf dem Gebiet der DNA-Arrays und der damit durchgeführten diagnostischen Anwendungen zu etablieren.

Probenträger

- Durch eine Erhöhung der Kavitätendichte über 384 Wells hinaus kann der Durchsatz des Systems weiter gesteigert werden. Dass der optische Aufbau, insbesondere die CCD-Kamera dazu geeignet sind, konnte in dieser Arbeit bereits belegt werden.

Charakterisierung der Biomolekularen Erkennung

- Die Etablierung und Validierung von Methoden, mit denen am parallelen Detektionsmodul kinetische und thermodynamische Daten automatisiert so erhalten, ausgewertet und dargestellt werden können, dass es den Durchsatzanforderungen des HTS gerecht wird.

6 LITERATUR

- Ahluwalia A., De Rossi D., Ristori C., Schirone A., Serra G., A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors, *Biosen. Bioelectron.* (1992) **7** 207-214.
- Amersham Pharmacia Biotech homepage (2001): www.apbiotech.com
- Arnostova H., Kucerova Z., Tislerova I., Trnka T., Ticha M., Affinity chromatography of porcine pepsin on different types of immobilized 3,5-diiodo-L-tyrosine, *J. Chromatogr. A* (2001) **911** 211-216.
- Barceló D., and Hennion M.-C. (1997) *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Elsevier, Amsterdam.
- Bartlett P.N., Cooper J.M., A review of the immobilisation of enzymes in electropolymerized films, *J. Electroanal. Chem.* (1993) **362** 1-12.
- Bayer E., Wilchek M., The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology, *Meth. Biochem. Analysis* (1980) **26** 1-45.
- Bayer E., Wilchek M., Avidin column as a highly efficient and stable alternative for immobilization of ligands for affinity chromatography, *J. Mol. Recognit.* (1990) **3** 102-107.
- Bergmann L., Schaefer C., Lehrbuch der Experimentalphysik, 9.Auflage 1993, Verlag de Gruyter, Berlin.
- Bergström K., Holmber K., Protein immobilization to polystyrene via long poly(ethylene glycol) chains, *Biotechnol. Bioeng.* (1991) **38** 952-955.
- Biacore International AB, Uppsala Schweden, www.biacore.com.
- Biacore, International Application published under the patent cooperation treaty (PCT) PCT/Se98/00196. International Publication Number: WO 98/34098 (1998).

- Birkert O., Entwicklung und Charakterisierung von Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung biotinylierter Liganden für die Affinitätsanalytik, Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1998).
- Birkert O., Haake H-M., Schütz A., Mack J., Brecht A., Jung G., Gauglitz, G., A Streptavidin Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, *Anal. Biochem.* (2000) **282** 200-208.
- Birkert O., Tünnemann R., Jung G., Gauglitz G., Label Free Parallel Screening of Combinatorial Triazine Libraries Using Reflectometric Interference Spectroscopy, (2001) eingereicht.
- Birkert O., Gauglitz G., Assay development for Label Free High Throughput Screening of Thrombin Inhibitors Using Reflectometric Interference Spectroscopy, *ABC J.* (2002) im Druck.
- Boas M., Effect of desiccation upon the nutritive properties of egg white, *Biochem. J.* (1927) **21** 712.
- Braun M., Camps X., Vostrowsky O., Hirsch A., Endreß E., Bayerl Th.M., Birkert O., Gauglitz G., Synthesis of a Biotinylated Lipofullerene as a New Type of Transmembrane Anchor. *Eur. J. Org. Chem.* (2000) 1173-1181.
- Brecht A., Ingenhoff J., Gauglitz G., Direct monitoring of antigen-antibody interactions by spectral interferometry, *Sens. Act. B.* **6** (1992) 96-100.
- Brecht A., Gauglitz G. Optimised Layer system for immunosensors based on the *RIfS* transducer, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1994) **349** 360-366.
- Brown B.A., Drozynski C.A., Dearborn C.B., Hadjian R.A., Liberatore F.A., Tulip Th.H., Tolman G.L., Haber S.B., Conjugation of metallothionein to a murine monoclonal antibody, *Anal. Biochem.* (1988) **172** 22-28.
- Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P., Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science* (1998) **281** 2013-2016.
- Bruck S.D., Aspects of three types of hydrogels for biomolecular applications, *J. Biomed Mat. Res.* (1973) **7** 387-404.
- Bruun L., Koch C., Jakobsen M.H., Pedersen B., Christianse M., Aamand J., Characterization of monoclonal antibodies raised against different structures belonging to the s-triazine group of herbicides, *Anal. Chim. Acta* (2001) **436** 87-101.

- Buchdunger E., Mett H., Trinks U., Regenass U., Muller M., Meyer T., Beilstein P., Wirz B., Schneider P., Traxler P., Lydon N., 4,5-Bis(4-fluoroanilino)phthalimide: a selective inhibitor of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway with potent in vivo antitumor activity, *Clin. Cancer Res.* (1995) **1** 813-821.
- Buckle P.E., Davies R.J., Kinning T., Yeung D., Edwards P.R., Pollard-Knight D., Lowe C.R., The resonant mirror: A novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions: Part II: Applications, *Biosens. Bioelectron.* (1993) **8** 355-362.
- Burbaum J.J., Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon? *DDT* (1998) **3(7)** 313-321.
- Caparon M.H., De Ciechi P.A., Devine C.S., Olins P.O., Lee S.C., Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding. *Molecular Diversity* (1996) **1** 241-246.
- Chan W.C.W., Nie S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science* (1998) **281** 2016-2020.
- Ciardiello F., Bianco R., Damiano V., De Lorenzo S., Pepe S., De Placido S., Fan Z., Mendelsohn J Bianco A.R., Tortora G., Antitumor Activity of Sequential Treatment with Topotecan and Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody C225, *Clin. Cancer Res.* (1999) **5** 909-916.
- Clark L.C., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann NY Acad. Sci.* (1962) **102** 29-45.
- Clemens J., Entwicklung eines einfachen Modells zur Abschätzung der sommerlichen Überwärmung in Gebäuden, Diplomarbeit im Fachbereich Physik der Universität-Gesamthochschule Siegen (2000).
- Collioud A. Clemence J.F., Sanger M., Sigrist H., Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports : Synthesis and application of a light-activable and thiol-reactive cross-linking reagent, *Bioconjugate Chem.* (1993) **4** 528-536.
- Conti M., Falini G., Samori B., How Strong is the Coordination Bond between a Histidine Tag and Ni-Nitrilotriacetate? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules, *Angew. Chem.* (2000) **112** 221-224.

- Cook N.D., Scintillation proximity assays – a versatile high throughput screening technology. *Drug Discovery Today* (1996) **1** 287-294.
- Coughlin S.R., How the protease thrombin talks to cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) **96** 11023-11027.
- Decher G., Lehr B., Lowack K., Lvov Y., Schmitt J., New nanocomposite films for biosensors: Layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA, *Biosens. Bioelectron.* (1994) **9** 677-684.
- Denhardt D.T., A membrane filter technique for the detection of complementary DNA, *Biochem. Biophys. Research Comm.* (1966) **23** 641-645.
- Deutsches Tierschutzgesetz. Neufassung vom 1.1.1987. Der Bundesminister für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. 53123 Bonn.
- Dotz J., Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: Von Hirundin zu Hirudinmimetica, *Angew. Chem.* (1995) **107** 948-962.
- Eakin R., Snell E., Williams R., The concentration and assay of avidin, the injury-producing protein in raw egg white, *J. Biol. Chem.* (1941) **140** 535-545.
- Eckard P. Eustachi M., Nord S., Schmitt B., Thrombin-Screening im 96Well Format mit dem Biospec, Vortrag im Rahmen des 6. Statusseminar LIBRARIAN II, Mannheim, Mai 2000.
- Elam J.H., Nygren H., Covalent coupling of polysaccharides to silicon and silicon rubber surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* (1984) **18** 953-959.
- Elender G., Kühner M., Sackmann E., Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers, *Biosens. Bioelectron.* (1996) **11** 565-577.
- Enzelberger M., Entwicklung von Werkzeugen zur Darstellung und Durchmusterung von Proteinbibliotheken, Dissertation an der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart (1999).
- Falorni M., Giacomelli G., Mameli L., Porcheddu A., New 1,3,5-triazine derivatives as templates for the homogeneous phase synthesis of chemical libraries, *Tetrahedron Lett.* (1998) **39** 7607-7610.
- Fan Z., Mendelsohn J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.* (1998) **10** 67-73.

- Fielding M., Barceló D., Helweg A., Galassi S., Torstensson L., van Zoonen P., Wolter R., Angeletti G. (1992) Water Pollution report, 27. *Pesticides in ground and drinking water*, Commission of the European Communities, Brussels.
- Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science* (1991) 251 767-773.
- Furka Á., Sebestyén F., Asgedom M., Dibo G., Abstar. 14th Int. Congr. Biochem., Prague (1988) 5 47.
- Gao H., Sanger M., Luginbuhl R., Sigrist H., Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical wave guides, *Biosens. Bioelectron.* (1995) 10 317-328.
- Gauglitz G., Optical Sensor Arrays Based on Microtiterplate Dimensions, *Mikrochim. Acta* (1999) 131 9-17.
- 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.
- Gershon P.D., Khilko S., Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *J. Immunological Methods* (1995) 183 65-76.
- Gonzales J., Oades K., Leychkis Y., Harootunian A., Negulescu P., Cell based assays and instrumentation for screening ion-channel targets, *Drug Discovery Today* (1999) 4 431-439.
- Green N., Avidin, *Adv. Protein Chem.* (1975) 29 85-113.
- Gräfe D., Grau W., Kühner M. Deutsches Patent DE199937797C1 (2001).
- Guesdon J.-L., Immunoenzymatic techniques applied to the specific detection of nucleic acids, *J. Immunol. Meth.* (1992) 150 33-49.
- Gustafson G.R., Baldino C.M., O'Donnell M-M.E., Sheldon A., Tarsa R.T., Verni C.J., Coffen D.L., Incorporation of carbohydrates and peptides into large triazine-based screening libraries using automated parallel synthesis, *Tetrahedron* (1998) 54 4051-4065.
- Haake, H.M., Tünnemann, R., Brecht, A., Austel, Volkhard, Jung, G., Gauglitz, G., Eingereicht bei *Angew. Chem.* 2001
- Haase J., Luther H. (Ciba Specialty Chemicals Holding Inc. Basel) EP 0878469A1.

- Hadamovsky St., Birk G., Ein HTS-Phosphorylierungsassay für die RIfS-Methode, Tagungsband 2. BioSesnorsymposium Tübingen (2001) 48-49.
- Hall E., Biosensoren, (1995) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 24.
- Harper M., Lema F., Boulot G., Poljak R.J., Antigen specificity and cross-reactivity of monoclonal anti-lysozyme antibodies. *Molec. Immunol.* (1987) **24** 97-108.
- Harrison M., Changes in scale in automated pharmaceutical research, *DDT* (1998) **3(7)** 343-349.
- Haupts U., Ruediger M., Pope A.J., Macroscopic versus microscopic fluorescence techniques in (ultra)-high-throughput screening, *Drug Discovery Today* (2000) **1** 3-9.
- Hecht E., Siemsen F. (Übers.), Optik, Adison-Wesley, Bonn, München 1989.
- Heimbrook D., Oliff A., Gibbs J.B., Essentials of signal transduction. 5th edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA. (1997) 35-45.
- Hermanson G., Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996).
- Hermanson G., Mallia A.K., Smith P.K., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, San Diego (1992).
- Hertzberg R.P., Pope A.J., High-throughput screening: new technology for the 21st century, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000) **4** 445-451.
- Hiller Y., Gershoni J., Bayer E., Wilchek M., Biotin binding to avidin, *Biochem. J.* (1987) **248** 167-171.
- Hishiya T, Shibata M, Kakazu M, Asanuma H, Komiyama M., Molecularly imprinted cyclodextrins as selective receptors for steroids, *Macromolecules* (1999) **32** 2265-2269.
- Hochuli E., Döbeli H., Schacher A., New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues, *J. Chromatography* (1987) **411** 176-184.
- Hock B., Immunochemical Assay of Environmental Pollutants Using Pesticides as an Example. *Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle* VCH, Heidelberg (B. Hock, R. Niessner, Eds) (1995) 3-24.
- Houston J.G., Banks M., The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology, *Curr. Opin. Biotech.* (1997) **8** 734-740.

- Imagawa M., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ishikawa E., Niitsu Y., Urushizaki I., Knazawa R., Tachibana S., Nakazawa N., Ogawa H., Characteristics and evaluation of antibody-horseradish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde, and periodate, *J. Appl. Biochem.* (1982) **4** 41-57.
- Jakeway S.C., De Mello A.J., Russell E.L., Miniaturized total analysis systems for biological analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.* (2000) **366** 525-539.
- Jarman M., Coley H.M., Judson I.R., Thornton T.J., Wilman, D.E.V., Abel, G., Ruttly, C.J.J., Synthesis and cytotoxicity of potential tumor-inhibitory analogues of trimelamol (2,4,6-tris[(hydroxymethyl)methylamino]-1,3,5-triazine) having electron-withdrawing groups in place of methyl, *Med. Chem.* (1993) **36** 4195-4200.
- Johnsson B., Löfas S., Lindquist G., Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors, *Anal. Biochem.* (1991) **198** 268-77.
- Jung A. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (2001).
- Jung, G. (Ed.), Combinatorial Chemistry, Synthesis, Analysis, Screening, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1999).
- Kaminski Z.J., 2-Chloro-4,6-Disubstituted-1,3,5-Triazines. A Novel Group of Condensing Reagents, *Tetrahedron Lett.* (1985) **26** 2901.
- Kienberger F., Kada G., Gruber H.J., Pastushenko V. Ph., Riener Ch., Trieb M., Knaus H-G., Schindler H., Hinterdorfer P., Recognition Force Spectroscopy Studies of the NTA-His6 Bond, *Single Mol.* (2000) **1** 59-65.
- Klingler J., Friedrich T., Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* (1997) **73** 2195-2200.
- Kopp M.U., Crabtree H.J., Manz A., Developments in technology and applications of Microsystems, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1997) **1** 410-419.
- Kraus G., Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1993).
- Kukla M.J., Ludovici D.W., Kavash R.W., Heeres J., Janssen P.A.J. (Janssen Pharmaceutica); EP 945447 (1999).

- Langone J.J., Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques, *J. Immunol. Methods* (1982) **55** 277-296.
- Le Grice S.F., Gruninger-Leitsch F., Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography, *Eur. J. Biochem.* (1990) **187** 307-314.
- Lemmo A.V., Rose D.J., Tisone Th.C., Inkjet dispensing technology: Applications in drug discovery, *Curr. Opin. Biotech.* (1998) **9** 615-617.
- Liddell E., Weeks I., Antikörper-Techniken, (1996) Heidelberg/Berlin/Oxford, Spektrum Akad. Verl. ISBN 3-8274-0048-1.
- Lihme A., Schafer-Nielsen C., Larsen K.P., Mueller K.G., Boeg-Hansen T.C., Divinylsulfone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrixes by immobilization of immunoglobulins and other proteins, *J. Chromatogr.* (1986) **376** 299-305.
- Löfas S., Johnsson D., A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilisation of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1990) 1526-1528.
- Löfas S., Johnsson B., Edstrom A., Hansson A., Lindquist G., Hillgren R.M.M., Stigh L., Methods for site controlled coupling to carboxymethyl-dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors, *Biosens. Bioelectron.* (1995) **10** 813-822.
- Lu B., Smyth M.R. O'Kennedy R., Immunological activities of IgG antibody on pre-coated Fc receptor surfaces, *Anal. Chim. Acta* (1996) **331** 97-102.
- Masala S., Taddei M., Solid-Supported Chloro[1,3,5]triazine. A Versatile New Synthetic Auxiliary for the Synthesis of Amide Libraries, *Org. Lett.* (1999) **1** 1355-1357.
- Mateo C., Fernandez-Lorente G., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules* (2000) **1** 739-745.
- Mauzac M., Auber N., Jozefonivicz J., Antithrombic activity of some polysaccharide resins, *Biomaterials* (1982) **3** 221-224.

- Merrill E.W., Poly(ethylene oxide) and blood contact: a chronicle of one laboratory, in: Harris J.M. (Ed.), Pol(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications, Plenum Press, New York (1992).
- Minning S., Die Lipase aus *Rhizopus oryzae*: Klonierung, Expression, Reinigung und Mutagenese eines industriell relevanten Enzyms für die Biokatalyse und die Strukturbestimmung, Dissertation an der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart (1999).
- Mirsky, V.M., Hirsch Th., Piletsky S.A., Wolfbeis O.S., A spreader-bar approach to molecular architecture: Formation of stable artificial chemoreceptors, *Angew. Chem, Int. Ed.* (1999) **38** 1108-1110.
- Moore K.J., Turconi S. Asham S., Ruediger M., Haupts U., Emerick V., Pope A.J., Single molecule detection technologies in high throughput screening: Fluorescence correlation spectroscopy, *J. Biomol. Screen.* (1999) **4** 335-353.
- Nieba L., Nieba-Axmann E., Persson A., Hämäläinen M., Edebratt F., Hansson A., Lidholm J., Magnusson K., Karlsson A.F., Plückthun A., BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins Using a Chelating NTA Sensor Chip, *Anal. Biochem.* (1997) **252** 217-228.
- Oldenburg K.R., Zhang J.H., Chen T., Maffia A., Blom K.F., Combs A.P. Chung T.D.Y., Assay miniaturization for ultra-high throughput screening of combinatorial and discrete compound libraries: a 9600-well (0.2 microliter) assay system, *J. Biomol. Screen.* (1998) **3** 55-62.
- Padlan E. A., Anatomy of the antibody molecule, *Molecular Immunology* (1994) **31** 169-217.
- Payen M., Gateccel C., Kermarec N., Beloucif S., Almitrine and inhaled nitric oxide in acute respiratory failure. Nitric oxide and the lung, W.M. Zapol Ed; Marcel Dekker, New York, (1996) p.313.
- Pedley D.G., Skelly P.J., Tighe B.J., Hydrogels in biomedical applications, *Br. Polym. J.* (1980) **12** 99-109.
- Pfannschmidt C., Langowski J., Superhelix Organization by DNA Curvature as Measured Through Site-specific Labeling, *J. Mol. Biol.* (1998) **275** 601-611.

- Piebler J., Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1997).
- Piebler J., Brecht A., Giersch Th., Hock B., Gauglitz G., Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *J. Immun. Methods* (1997) **201** 189-206.
- Piebler, J., Schreiber, G., Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor IFN α 2, *J. Mol. Biol.* (1999) **294** 223-237.
- Piebler J., Brecht A., Hehl K., Gauglitz G., Protein interactions in covalently attached dextran layers, *Colloids Surf. B* (1999) **13** 325-336.
- Piebler J., Brecht A., Valiokas R., Liedberg B., Gauglitz G., A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens. Bioelectron.* (2000) **15** 473-481.
- Polzius R., Schneider T., Bier F.F., Bilitewski U., Koschinski W., Optimization of biosensing using grating couplers: Immobilization on tantalium oxide waveguides, *Biosens. Bioelectron.* (1996) **11** 503-514.
- Pope A.J. Haupts U., Moore K.J., Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening; theory and practice, *Drug Discovery Today* (1999) **4** 350-362.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* (1975) **258** 598-599.
- Price C.P., Newman D.J., Principles and practice of immunoassay, Stockton Press, New York (1991).
- Puu G., Gustafson I., Artursson E., Ohlsson P.A., Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support, *Biosens. Bioelectron.* (1995) **10** 463-476.
- Rademann J., Jung G., Integrating Combinatorial Synthesis and Bioassays. *Science* (2000) **287** 1947-1948.
- Ramm P., Imaging systems in assay screening, *Drug Discovery Today* (1999) **4** 401-410.
- Ramsden J.J., Brachmanova G.I., Archakov A.I., Immobilization of protein to lipid bilayers, *Biosens. Bioelectron.* (1996) **11** 523-528.

- Ratner B.D., Hoffmann A.S., Synthetic hydrogels for biomedical applications, in: Andrade J. D. (ed.) *Hydrogels for medical and Related Applications*, ACS Symposium Series Vol. 31, American Chemical Society, Washinton, DC (1976) 1-36.
- Richards F.F., Konigsberg W.H., Rosenstein R.W., Varga J.M., On the specificity of Antibodies: Biochemical and biophysical evidence indicates the existence of polyfunctional antibody combining regions, *Science* (1975) **187** 130-137.
- Roberts V.A., Getzoff E.D., Tainer J. A., Structural basis of antigenic cross-reactivity. *Structure of Antigens*, CRC Press, Boca Raton. (1993) **2** 31-53.
- Roberts M.A., Rossier J.S., Bercier P., Girault H., UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems, *Anal. Chem.* (1997) **69** 2035-2042.
- 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.
- Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (1995) **19** 183-232.
- Scheller F., Schubert F., *Biosensoren* (1989) Birkhäuser Verlag, Basel, 51.
- Schmitt H.-M., Brecht A., Piehler J., Gauglitz G., An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosen. Bioelectron.* (1997) **12** 219-233.
- Schobel U., Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1999).
- Schütz A., Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (*RIFS*) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (2000).
- Siegrist A.E., Eckhardt C., Kaschig J., Schmidt E. in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A18, B. Elvers, S. Hawkins, G. Schulz Eds; 5th Edn, VCH, Weinheim, (1993) 153-189.

- Sigal G.B., Bamdad C., Barberis A., Strominger J., Whitesides G.M., A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance, *Anal. Chem.* (1996) **68** 490-497.
- Silverman L., Campbell R., Broach J.R., New assay technologies for high-throughput screening, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1998) **2** 397-403.
- Skerra A., Schmidt Th., Use of Strep-tag and Streptavidin for detection and purification of recombinant protein, *Methods Enzymol.* (2000) **326** 271-304.
- Smith P., Tripp B., DiBlaso-Smith A., Lu Z., LaVallie E., McCoy J., A plasmid expression system for quantitative in vivo biotinylation of thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli*, *Nucl. Acids Res.* (1998) **26** 1414-1420.
- Spinke J., Liley M., Schmitt F.-J., Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization, *J. Chem. Phys.* (1993) **99** 7012-7019.
- Sporeno E., Barbato G., Graziani R., Pucci P., Nitti G., Paonessa G., Production and structural characterization of amino terminally histidine tagged human oncostatin M in *E. coli*, *Cytokine* (1994) **6** 255-264.
- Stankova M., Lebl M., Library generation through successive substitution of trichlorotriazine., *Mol. Div.* (1996) **2** 75-80.
- Steward M.W., Steensgaard J., Antibody affinity: Thermodynamic aspects and biological significance, CRC Press, Boca Raton (1983).
- Stryer L. Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1990).
- Sundberg St.A., High-throughput and ultra-high-throughput screening: Solution- and cell-based approaches, *Curr. Opin. Biotech.* (2000) **11** 47-53.
- Tappe H., Helmling W., Mischke P., Rebsamen K., Reiher U., Russ W., Schläfer L., P. Vermehren, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A22, B. Elvers, S. Hawkins, W. Russey, G. Schulz Eds; 5th Edn, VCH, Weinheim, (1993) 651-663.
- Tahmasebbi D.C., Sasaki T., Synthesis of a Three-Helix Bundle Protein by Reductive Amination, *J. Org. Chem.* (1998) **63** 728-731.
- Tünnemann R., Synthese und spektroskopische Untersuchung Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen und deren Anwendung in der Sensorik, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (2000).

- Russey, G. Schulz Eds; 5th Edn, VCH, Weinheim, (1993) 651-663
- Wegner M., Einsatz von temperaturabhängigen RfS-Messungen zur Untersuchung der Hybridisierung von Oligonucleotiden, Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (2001).
- Wilchek M., Bayer E., The avidin-biotin complex in immunology, *Immunol. Today* (1984) **5** (2) 39-43.
- Wilchek M., Bayer E., The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications, *Anal. Biochem.* **171** (1988) 1-32.
- Winklmaier M., Weller M.G., Mangler J., Schlosshauer B., Niessner R., Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1997) **358** 614-622.
- Wulff G; Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen – auf dem Weg zu neuen Antikörpern, *Angew. Chem.* (1995) **107** 1958-1979.
- Yan M., Cai S.X., Wybourne M.N., Keana J.F.W., N-hydroxysuccinimide ester functionalised perfluorophenyl azides as novel photoactive heterobifunctional crosslinking reagents. The covalent immobilization of biomolecules to polymer surfaces, *Bioconj. Chem.* (1994) **5** 151-157.
- Yoshitake S., Imagawa M., Ishikawa E., Niitsu Y., Urushizaki I., Nishiura M., Kanazawa R., Kurosaki H., Tachibana S., Mild and efficient conjugation of rabbit Fab' and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay, *J. Biochem.* (1982) **92** 1413-24.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

α	anti- bzw. Antikörper
AMD	Aminodextran
ATP	Adenosin Triphosphat
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	Charge-coupled device
d	physikalische Schichtdicke
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	N,N-Dimethylsulfoxid
E13CME	Estron 3-carboxymethylether
EDC	Ethyl-N,N-dimethylaminopropylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Edipermaler Wachstumsfaktor
FIA	Fließinjektionsanalyse
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GA	Glutarsäureanhydrid
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GOPTS	Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin-tagged
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HTS	High-Througput Screening

IC-50	Inhibitorkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung führt
IMAC	Metallaffinitätschromatographie
k_a	Assoziationskonstante
k_d	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
k_s	Ratenkonstante
K	Affinitätskonstante
M	Molar
MTP	Mikrotiterplatte
n	Brechungsindex
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
p	poly-
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	isoelektrischer Punkt
PEG	Polyethylenglykol
poly-GT	poly-Glutaminsäure-Tyrosin
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
R	organischer Rest
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
scF(v)	single-chain-Antikörperfragment
SPA	Scintillation Proximity Assay
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
t	Zeit
TBTU	O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-Tetrafluoroborat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u-HTS	ultra-High-Throughput Screening

7.2 Veröffentlichungen

Birkert O., Haake H-M., Schütz A., Mack J., Brecht A., Jung G., Gauglitz, G., A Streptavidin Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction, *Anal. Biochem.* (2000) **282** 200-208.

Birkert O., Tünnemann R., Jung G., Gauglitz G., Label Free Parallel Screening of Combinatorial Triazine Libraries Using Reflectometric Interference Spectroscopy, (2001) eingereicht bei *Anal. Chem.*

Birkert O., Gauglitz G., Assay development for Label Free High Throughput Screening of Thrombin Inhibitors Using Reflectometric Interference Spectroscopy, *ABC*, im Druck.

Birkert O., Hadamovsky S., Birk G., Gauglitz G. Assay development for the Screening of Phosphotyrosin Kinase Inhibitors by HTS-Reflectometric Interference Spectroscopy, in Vorbereitung.

Birkert O., Gauglitz G., Markierungsfreie optische Detektion im High-Throughput Screening, *LaborPraxis* (2001) **4** 36-38.

Braun M., Camps X., Vostrowsky O., Hirsch A., Endreß E., Bayerl Th.M., Birkert O., Gauglitz G., Synthesis of a Biotinylated Lipofullerene as a New Type of Transmembrane Anchor, *Eur. J. Org. Chem.* (2000) 1173-1181.

7.3 Akademische Lehrer

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

7.4 Lebenslauf

Name	Oliver Birkert
Geburtstag	11. Mai 1972
Geburtsort	Öhringen
Schulbildung	1978 – 1982 Grundschule in Scheppach/Unterheimbach 1982 - 1991 Hohenlohe-Gymnasium in Öhringen 1991 Abitur
Wehrdienst	1991 – 1992 bei der Panzerbrigade 36, Bad Mergentheim
Studium	1992 – 1998 Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Oktober 1994: Vordiplom in Chemie WS 95/96 –Erasmus Stipendiat in Lyon/Frankreich an der "Université Lyon I"
Diplomprüfung	September 1998
Diplomarbeit	März - September 1998 bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen. Titel: „Entwicklung und Charakterisierung von Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung biotinylierter Liganden für die Affinitätsanalytik“
Promotion	Oktober 1998 – Oktober 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen. Titel: Dissertation über das Thema “ Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie ”