

Neue Ansätze zur Entwicklung eines Ganzzellbiosensors



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Vornholt

aus Olsberg

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen

am 26. März 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. C. Culmsee

Tag der mündlichen Prüfung am 29. März 2010

Für Ina und meine Familie

Ich habe keine besondere Begabung, ich bin nur leidenschaftlich neugierig.

Albert Einstein

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine unentwegte Unterstützung, die wissenschaftliche sowie persönliche Betreuung und für ein immer „offenes Ohr“ bei Problemen.

Herrn Prof. Dr. Culmsee danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates. Außerdem danke ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Frau Prof. Dr. Petersen und Herrn Prof. Dr. Kuschinsky.

Ich danke allen Arbeitskollegen der AG Keusgen für das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima und den Spaß während und nach der Arbeitszeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Anja Vogt für die Unterstützung bei den MS-Messungen.

Danken möchte ich auch Frau Eva Mohr aus der AG Kissel, die für mich die Zellen für die Versuche kultiviert hat und mir immer mit Rat und Tat bei aufkommenden Problemen zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Bakowsky für die Unterstützung bei den Liposomenformulierungen danken. Ein herzlicher Dank an die Mitglieder der AG Kissel und der AG Bakowsky, die immer einen guten Tipp hatten, falls „technologischer Rat“ gefragt war. Insbesondere danke ich Frau Nina Seidel für die Unterstützung bei den PEC-Versuchen und Herrn Johannes Sitterberg für die Messungen am AFM.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Torsten Wagner aus der AG von Herrn Prof. Dr. Schöning, Jülich für die sehr angenehme und interessante Zusammenarbeit im Bezug auf die LAPS Messungen, die in Jülich und in Marburg durchgeführt wurden.

Des Weiteren danke ich den Kollegen bei der Praktikumsbetreuung für die netten Tage und den Spaß, den wir hatten.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Freunde, die immer ein offenes Ohr bei Problemen hatten und die mich unentwegt unterstützt und motiviert haben. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonders danke ich Ina für ihre unendliche Geduld, ihre immerwährende Unterstützung sowie für das Korrekturlesen, die sehr guten, konstruktiven Diskussionen und das Vertrauen in mich.

Zuletzt möchte ich meiner Tochter Marie Fiona danken, denn durch ihr Dasein und unbeschwertes Lachen hat sie mich immer wieder motiviert. Jetzt hat Papa auch wieder mehr Zeit für dich.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOSENSOREN.....	1
1.1.1 Optische Biosensoren	2
1.1.1.1 Evaneszentfeldsensoren.....	2
1.1.1.2 Reflektometrische Interferenzsensoren	7
1.1.2 Feldeffektbasierte Biosensoren.....	10
1.1.2.1 Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor (LAPS).....	11
1.2 IMMOBILISIERUNG	14
1.3 IMMUNOLOGIE	15
1.3.1 Antikörper.....	17
1.3.2 Antigen-Antikörper Wechselwirkung	19
1.3.3 Makrophagen	20
1.4 BAKTERIEN.....	21
1.4.1 Aufbau der Bakterien.....	21
1.4.2 Gram-Färbung.....	21
1.4.3 Lipopolysaccharid (LPS)	22
1.4.3.1 Wirkung der Lipopolysaccharide im menschlichen Körper	22
1.4.4 Immunoassays zum Nachweis von Bakterien.....	24
1.4.5 Liposomen als Membranmodell	25
1.5 SÄUGETIERZELLEN	26
1.5.1 Zellmembran.....	26
1.5.1.1 Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran.....	26
1.5.1.2 Kohlenhydratänderung in Tumoren.....	27
1.5.2 Zelllinie	28
1.5.3 Apoptose	28
1.5.4 Apoptoseauslösende Faktoren.....	28
1.6 LEKTINE	29
1.6.1 Concanavalin A	31
1.6.2 Mistellektine.....	33
1.6.2.1 Natürliches Mistellektin I.....	33
1.6.2.2 Rekombinantes Mistellektin I.....	35
1.7 ENTWICKLUNG DER BIOSENSOREN	36
1.7.1 Warum Ganzzellbiosensoren?	36
1.7.2 Wie können Informationen von Zellen erhalten werden?.....	37

1.8	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	39
2	MATERIAL UND METHODEN.....	42
2.1	MATERIAL.....	42
2.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	42
2.1.2	Zelllinien.....	43
2.1.3	Lösungen und Puffer	44
2.1.4	Geräte und Materialien	45
2.2	METHODEN.....	46
2.2.1	Herstellung biosensitiver Schichten.....	46
2.2.1.1	Vorbereitung der Prismen.....	46
2.2.1.2	Erzeugung einer Aminooberfläche	46
2.2.1.3	Biotinylierung	46
2.2.1.4	Kohlenhydratbeschichtungen	47
2.2.1.5	Alkylierung	51
2.2.2	Modifizierung von Biomolekülen.....	51
2.2.2.1	Biotinylierung mittels einer Aminogruppe des Antikörpers.....	51
2.2.3	Assoziations- und Dissoziationskonstante nach Edwards und Leatherbarrow ...	52
2.2.4	Spektralphaseninterferenz (SPI)	53
2.2.5	Oberflächenplasmonresonanz (SPR).....	56
2.2.5.1	Arbeitsweise mit dem Plasmonic [®] SPR-Gerät	58
2.2.6	LAPS - Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor	58
2.2.6.1	Messeinheit und Elektronik.....	59
2.2.6.2	Charakterisierung des LAPS-Systems	60
2.2.6.3	LPS-Funktionalisierung von Magentic Beads.....	66
2.2.7	Liposomenherstellung	66
2.2.7.1	Präparation der Liposomenformulierungen	68
2.2.7.2	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	68
2.2.7.3	Funktionalisierung der Liposomen mit LPS.....	69
2.2.7.4	Liposomencharakterisierung	69
2.2.7.5	LPS-Quantifizierung	70
2.2.8	Zellkultur	71
2.2.8.1	Verwendete Zelllinien	71
2.2.8.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen und Makrophagen.....	71
2.2.9	Spin Coating	72
2.2.9.1	SPI-Versuche.....	73
2.2.9.2	SPR-Versuche	73
3	ERGEBNISSE.....	74
3.1	LEKTIN-SCREENING.....	74
3.1.1	Nachweis- und Bestimmungsgrenze des ConA-Mannan-Systems.....	78
3.1.2	Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante	80
3.2	KREBSZELLEN UNTER EINFLUSS VON CONCANAVALIN A.....	81

3.2.1	Immobilisierung von NCI-H125-Zellen	82
3.2.1.1	Immobilisierung von NCI-H125-Zellen ohne BSA Passivierung	82
3.2.1.2	Immobilisierung von NCI-H125-Zellen mit BSA Passivierung	86
3.2.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen.	93
3.2.2	Immobilisierung von Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC).....	94
3.2.2.1	Immobilisierung von LLC-Zellen ohne BSA Passivierung.....	94
3.2.2.2	Immobilisierung von LLC-Zellen mit BSA Passivierung.....	98
3.2.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Immobilisierung von LLC-Zellen	105
3.2.3	REM Aufnahmen der immobilisierten Zellen.....	106
3.3	ENTWICKLUNG EINES MISTELLEKTIN I-(MLI)-ASSAYS AUF SPR-BASIS	107
3.3.1	MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9	107
3.3.1.1	MNA4 als Fängerantikörper und MNA9 als Detektionsantikörper	109
3.3.1.2	MNA9 als Fängerantikörper und MNA4 als Detektionsantikörper	111
3.3.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des MLI-Assays mit den Antikörpern MNA4 und MNA9	112
3.3.2	MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8	113
3.3.2.1	5F5 als Fängerantikörper und 5H8 als Detektionsantikörper.....	115
3.3.2.2	5H8 als Fängerantikörper und 5F5 als Detektionsantikörper.....	115
3.3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des MLI-Assays mit den Antikörpern 5F5 und 5H8.....	116
3.3.2.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze des MLI-Assays.....	117
3.4	BIOABBAUBARKEITSSTUDIE VON POLYETHYLENCARBONAT DURCH MAKROPHAGEN	120
3.4.1	Makrophagen	120
3.4.2	Polyethylencarbonat (PEC)	120
3.4.2.1	Darstellung des PEC	120
3.4.2.2	Abbaumechanismus des PEC.....	121
3.4.3	Schichtdickenbestimmung des PEC-Polymerfilms	122
3.4.4	PEC-Polymerabbau auf der SPI-Messplattform.....	124
3.4.4.1	Immobilisierung von Makrophagen in situ auf einem PEC-Polymerfilm	124
3.4.4.2	Prä-Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-Polymerfilm	126
3.4.5	PEC-Polymerabbau auf der SPR-Messplattform	129
3.4.5.1	Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-Polymerfilm.....	129
3.4.5.2	Bilder von immobilisierten Makrophagen	132
3.4.5.3	Makrophagen mit Triggerfaktoren.....	133
3.5	BAKTERIENMEMBRAN-MODELLSYSTEM AUF BASIS VON LIPOSOMEN	143
3.5.1	Liposomenformulierung.....	143
3.5.1.1	ζ -Potential und Vesikelgröße.....	145
3.5.2	„Künstliche Bakterien“	145
3.5.2.1	Membranmodell für <i>Legionella pneumophila</i>	145
3.5.2.2	Membranmodell für <i>Salmonella typhimurium</i>	152
3.5.2.3	Quantifizierung des Lipopolysaccharids (LPS)	155
3.6	„MAGNETIC BEADS“ KOMBINIERT MIT LAPS	159

4	DISKUSSION	164
4.1	LEKTIN-SCREENING.....	164
4.2	KREBSZELLEN UNTER EINFLUSS VON CONCAVALIN A.....	174
4.2.1	Immobilisierung von NCI-H125-Zellen	175
4.2.2	Immobilisierung von Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC).....	180
4.3	ENTWICKLUNG EINES MISTELLEKTIN I-(MLI)-ASSAYS AUF SPR-BASIS.....	186
4.3.1	MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9	186
4.3.2	MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8.....	192
4.3.2.1	Nachweis- und Bestimmungsgrenze des MLI-Assays	193
4.4	BIOABBAUBARKEITSSTUDIE VON POLYETHYLENCARBONAT DURCH MAKROPHAGEN	194
4.4.1	PEC-Polymerabbau auf der SPI-Messplattform.....	194
4.4.2	PEC-Polymerabbau auf der SPR-Messplattform	196
4.5	BAKTERIENMEMBRAN-MODELLSYSTEM AUF BASIS VON LIPOSOMEN.....	206
4.5.1	Membranmodell für <i>Legionella pneumophila</i>	206
4.5.2	Membranmodell für <i>Salmonella typhimurium</i>	209
4.6	„MAGNETIC BEADS“ KOMBINIERT MIT LAPS.....	213
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	215
6	LITERATURVERZEICHNIS	219

Abkürzungsverzeichnis

3-APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AFM	atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
AG	Antigen
AK	Antikörper
AU	arbitrary unit
BDDG	1,4-Butandioldiglycidylether
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse
BPI Protein	bactericidal permeability-increasing protein
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C ₁₈	Octadecyltrimethoxysilan
c	Konzentration
CC	Konstantstrom
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
Da	Dalton
DCP	Dicetylphosphat
DI-Wasser	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Ethylencarbonat
EDAC	1-Ethyl-3- (3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIS	electrolyte-insulator-semiconductor (Elektrolyt-Isolator-Halbleiter)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	fragment antigen binding
FAK	Fängerantikörper
Fc	fragment crystallizable
FKS	Fetales Kälber-Serum
FPLC	fast performance liquid chromatography
FWHM	full width half maximum
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HPA	<i>Helix pomatia</i> Agglutinin
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase

IR-LED-Array	Infrarot-Leuchtdioden-Array
k_{ass}	Assoziationskonstante
kcps	Kilo counts per second
kDa	Kilodalton
K_{diss}	Dissoziationskonstante
kg	Kilogramm
KH	Kohlenhydrat
KO ₂	Kaliumhyperoxid
KOH	Kaliumhydroxid
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LAPS	Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor
LBP	LPS-Bindeprotein
LB-Technik	Langmuir-Blodgett Technik
LISA	Liposomen Immunosorbent Assay
LLC	Lewis Lung Carcinom
LPS	Lipopolysaccharid
m	Masse
M	Molarität, molar
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase
mbar	Millibar
MD	myeloid differentiation
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ML-I	Mistellektin I
MLV	multilamellar vesicle
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOS	metal-oxide-semiconductor (Metall-Oxid-Halbleiter)

MS	Massenspektrometrie
MTP Reader	Mikrotiterplatten-Reader
mV	Millivolt
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non small cell lung cancer (nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom)
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte-Salzlösung)
PEC	Polyethylencarbonat
pg	Picogramm
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMB	Polymyxin B
PMBN	Polymyxin B-Nonapeptid
pNA	p-Nitroanilin
PP	Polypropylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
rMLA	rekombinante Mistellektin A-Kette
rMLB	rekombinante Mistellektin B-Kette
rMLI	rekombinantes Mistellektin I
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SA	Stearylamin
SCLC	small cell lung cancer (kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SEC	size exclusion chromatography (Größenausschlusschromatographie)
Si-SiO ₂ -Si ₃ N ₄	Silicium-Siliciumdioxid-Siliciumnitrid
SKT	Skalenteile
SOD	Superoxiddismutase
SPI	Spektralphasen-Interferenz
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
SUV	small unilamellar vesicle
t	Zeit
Ta ₂ O ₅	Tantal(V)-oxid
TLR	„Toll-like“ Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSH	Thyroid stimulierendes Hormon
U	Umdrehung
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
VAA I	<i>Viscum album</i> Agglutinin I
vs.	versus
WGA	Wheat Germ Agglutinin
ZNS	Zentralnervensystem
ZZ	Zellzahl
μV	Mikrovolt
μW	Mikrowatt

1 Einleitung

1.1 Biosensoren

Ein Biosensor (Abb. 1.1) ist ein analytisches System, bei dem eine biologische Komponente mit einem Signalwandler (Transducer) kombiniert oder zumindest räumlich eng mit diesem verknüpft ist [Turner et al., 1987].

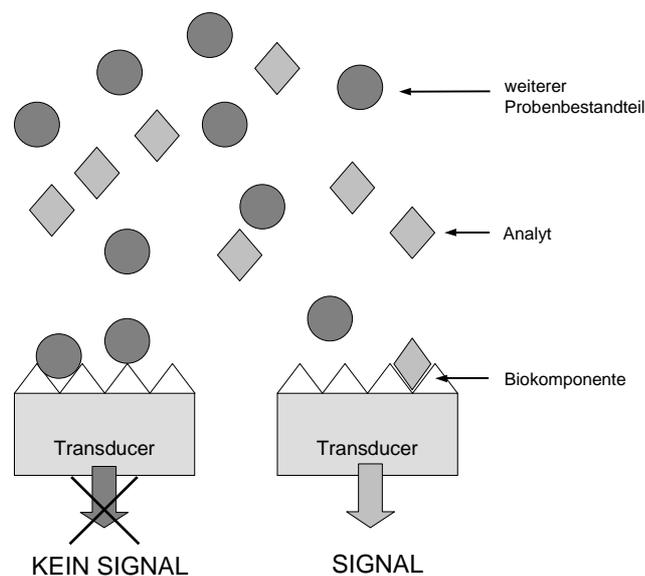


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Biosensors. Kommt es zu einer Interaktion des gesuchten Stoffes (Analyt) mit der biologischen Komponente, so entsteht zunächst ein biologisch-chemisches Signal, welches durch den Transducer in ein elektrisches oder optisches Signal umgewandelt wird, nach Keusgen (2002).

Mit Hilfe ihrer biologischen Komponente können Analyte aus komplexen Stoffgemischen spezifisch erfasst werden. Mittlerweile steht eine große Anzahl an Biosensoren zur Verfügung, mit denen einige hundert Analyten wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker, Cofaktoren von Enzymen detektiert werden können [Keusgen, 2002]. Biosensoren können entweder nach der Art der Wechselwirkung oder nach dem Funktionsprinzip des Transducers klassifiziert werden.

Bei der Klassifizierung nach dem Signalwandlerprinzip unterscheidet man im Wesentlichen elektrochemische, kalorimetrische, mikrogravimetrische und optische Biosensoren.

1.1.1 Optische Biosensoren

Die Gruppe der optischen Biosensoren kann nach ihrem physikalischen Prinzip in drei Untergruppen eingeteilt werden [Keusgen, 1999]:

- Evaneszenzfeldsensoren
- Reflektometrische Interferenzsensoren
- Indikatorsensoren

Näher eingegangen wird nur auf die Evaneszenzfeld- und Reflektometrischen Interferenzsensoren.

1.1.1.1 Evaneszenzfeldsensoren

Trifft Licht aus einem Medium mit großem Brechungsindex (optisch dichteres Medium, z.B. Glas) auf ein Medium mit kleinem Brechungsindex (optisch dünneres Medium, z.B. Luft, Flüssigkeit), wird ein Teil des Lichtes an der Grenzfläche reflektiert, ein anderer Teil gebrochen. Bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem Grenzwinkel der Totalreflexion, wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Ist der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel, erfolgt Totalreflexion des Lichtstrahls.

Obwohl es zu einer Totalreflexion an der Grenzfläche kommt, fällt die Lichtintensität hinter der Grenzfläche nicht schlagartig auf Null ab, sondern klingt exponentiell ab. Diesen einige nm großen Bereich jenseits der Phasengrenze bezeichnet man als evaneszentes Feld. Das evaneszente Feld kann zur Anregung und Detektion von Prozessen an der Grenzfläche genutzt werden [Eggins, 1996].

Neben dem Gitter- und Prismenkoppler (Abb. 1.2 und Abb. 1.3) gehört zu den Evaneszenzfeldsensoren die Oberflächenplasmonresonanz.

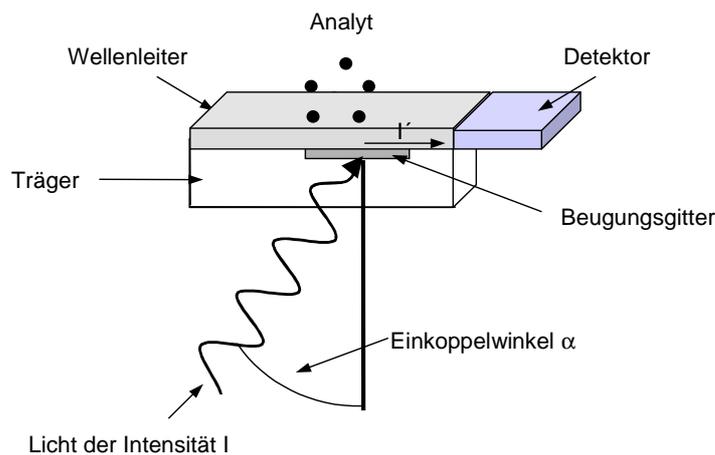


Abb. 1.2: Prinzip eines Gitterkopplers. Die Intensität des eingekoppelten Lichtes I ist vom Einkoppelwinkel α abhängig und bei einem bestimmten Winkel maximal. Durch Anlagerung von Analytmolekülen ändert sich der Einkoppelwinkel, bei dem die Intensität des eingekoppelten Lichtes I maximal ist. Die Verschiebung des Kopplungswinkels wird zur Auswertung herangezogen.

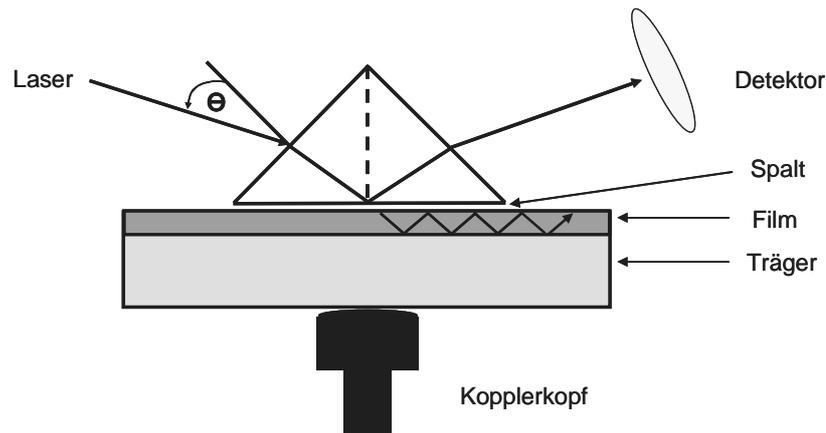


Abb. 1.3: Prinzip eines Prismenkopplers. Laserlicht wird auf einer der beiden kurzen Seiten eines Prismas eingestrahlt, an der Grenzfläche Prisma/Luft totalreflektiert und die Intensität der Strahlung auf der zweiten kurzen Seite detektiert. Bei einem bestimmten Einstrahlwinkel, der abhängig ist von der Dicke und dem Brechungsindex des Filmes, kann die Strahlung in den Film „tunneln“. Die Intensität des detektierten Lichtes nimmt ab. Wird die Dicke bzw. der Brechungsindex des Filmes durch Anlagerung von Biomolekülen verändert, ist ein anderer Einstrahlwinkel zum Einkoppeln der Strahlung in den Film notwendig.

Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Eine Technik, die ohne (Fluoreszenz-)Markierung auskommt und sich das evaneszente Feld zunutze macht, ist die Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR). Obwohl der zugrunde liegende quantenmechanische Effekt schon einige Jahrzehnte bekannt ist [Otto, 1968; Kretschmann und Raether, 1968], wurde erst 1983 die Möglichkeit zur Echtzeitbeobachtung von Affinitätsreaktionen beschrieben [Liedberg et al., 1983].

Trifft monochromatisches, p-polarisiertes Licht (elektrische Feldkomponente verläuft parallel zur Einfallsebene des Lichtes) auf die Grenzfläche zwischen Material mit großem Brechungsindex und Material mit kleinem Brechungsindex und ist diese Grenzfläche mit einem dünnen ($<$ Wellenlänge des monochromatischen Lichtes) Metallfilm beschichtet, so können die freien oszillierenden Elektronen der Metallschicht mit dem evaneszenten Feld wechselwirken [O'Shannessy et al., 1993]. Sofern die Resonanzbedingung erfüllt ist, können die Elektronen Licht absorbieren. Diese kollektive Anregung der Elektronen bezeichnet man als „(Oberflächen-)Plasmon“ (Abb. 1.4).

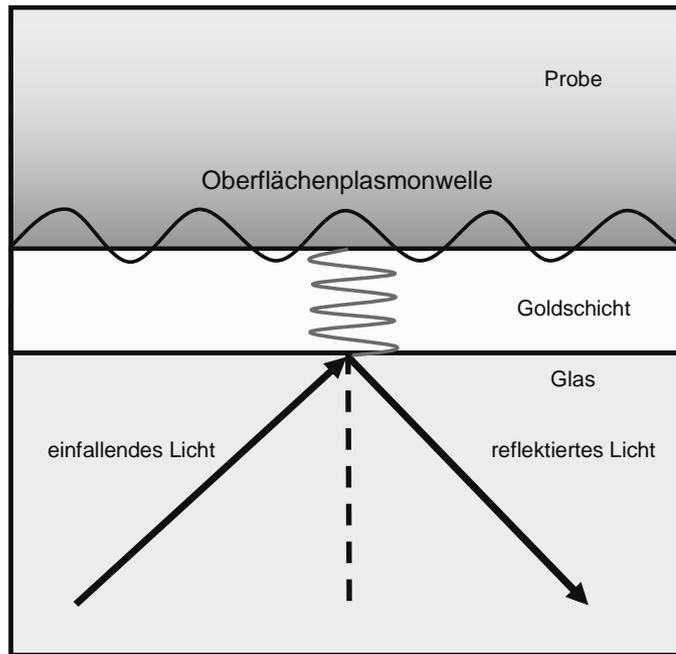


Abb. 1.4: Oberflächenplasmonwelle, die an der Grenzfläche Goldschicht/Probe entlang wandert. Als Plasmonen werden die Schwingungsmodi der Elektronen bezeichnet, die um die Metallionenkerne oszillieren. Erfüllt einfallendes Licht die Resonanz-Bedingung, so kann ein Teil der Lichtenergie in die Oberflächenplasmonwelle eingekoppelt werden. Dies führt zu einer Energieverminderung des reflektierten Lichtes.

Die Energieabsorption durch die Elektronen hat zur Folge, dass die Intensität des reflektierten Lichtes eines bestimmten Einstrahlwinkels (nämlich der, für den die Resonanzbedingung erfüllt ist) vermindert ist. Dieser Winkel wird als Resonanzwinkel bezeichnet. Er ist sowohl von der Dicke des (eventuell zusätzlich beschichteten) Metallfilms, der Wellenlänge des einfallenden Lichtes und dem Brechungsindex auf beiden Seiten der Grenzfläche abhängig. Da die Eigenschaften des Metallfilms, die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und der Brechungsindex des optisch dichteren Mediums konstant sind, kann eine Brechungsindexänderung in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche bestimmt werden. Durch Interaktionen von Analytmolekülen mit der Metall- bzw. der biosensitiven Metallschicht kommt es zu Brechungsindexänderungen an der Metallschicht, welche dazu führen, dass sich die Resonanzbedingung und somit auch der Resonanzwinkel ändert. Diese Winkelverschiebung ist proportional zum Belegungsgrad der Oberfläche und wird zur Auswertung herangezogen (Abb. 1.5).

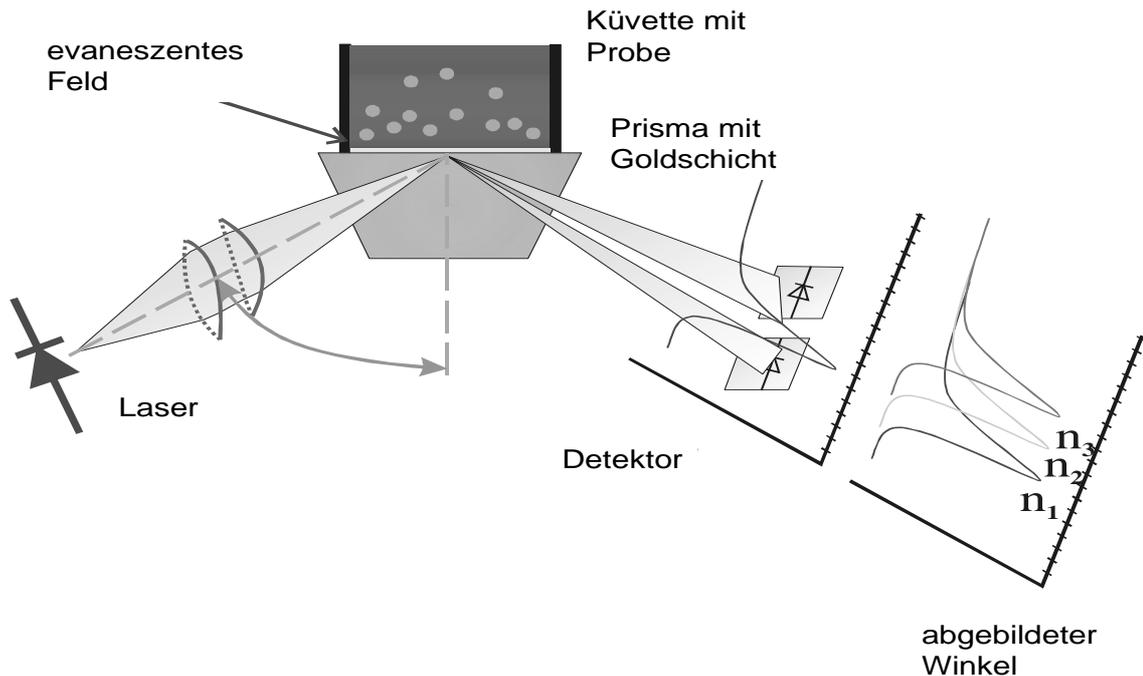


Abb. 1.5: Resonanzwinkeländerung bei der SPR durch Interaktion des Analyten mit der (biosensitiven) Metallschicht. Bedingt durch Energieabsorption der Elektronen in der Metallschicht weist die Intensität der reflektierten Strahlung eines bestimmten Einstrahlwinkels (der für den die Resonanzbedingung erfüllt ist) ein Minimum auf (n_1). Durch Anlagerung des Analyten an die biosensitive Metalloberfläche wird die Resonanzbedingung geändert, was dazu führt, dass das Minimum der reflektierten Strahlung bei einem anderen Einstrahlwinkel vorliegt (n_2 , n_3). Diese Winkelverschiebung wird bei der SPR zur Auswertung herangezogen. [Quelle: Plasmonic Biosensor AG]

Zur Herstellung des Metallfilms können Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium verwendet werden. Am häufigsten werden jedoch Gold und Silber genutzt. Gold zeigt bei gleicher Brechungsindexänderung eine größere Winkelverschiebung und ist chemisch stabiler als Silber. Silber liefert dagegen ein besseres Signal/Rauschverhältnis. In neuerer Zeit wird versucht, die positiven Eigenschaften beider Metalle in bimetallicen Schichten zu nutzen [Zynio et al., 2002]. Dabei wird Gold als äußere Schicht verwendet und verhindert so eine Oxidation des Silbers.

Die herausragenden Eigenschaften der SPR sind:

- Es ist keine Probenmarkierung notwendig. Dies hat den großen Vorteil, dass Biomoleküle keine strukturellen Veränderungen erleiden, die etwa durch Fluoreszenz-, Farbstoff-, Enzym- oder radioaktive Markierung vorkommen können.
- SPR arbeitet zerstörungsfrei, d.h. der Analyt kann einer weiteren, z.B. massenspektroskopischen Untersuchung zugeführt werden.
- Der Verlauf einer Affinitätsreaktion, wie z.B. einer Antigen-Antikörper Reaktion, kann in Echtzeit verfolgt und kinetische Parameter bestimmt werden [Green et al., 2000].

Der Nachteil der Methode, dass Moleküle < 500 Da nur schwer detektierbar sind, kann in vielen Fällen durch kompetitive oder „Sandwich-Techniken“ umgangen werden [Keusgen, 2002].

Die Oberflächenplasmonresonanz wird erfolgreich eingesetzt zur Analyse von Antigen-Antikörper, Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen, aber auch zur Detektion der Konformationsänderung immobilisierter Proteine oder zur Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion antibakterieller synthetischer Peptide [Homola et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasmonic[®] SPR-Gerät der Plasmonic Biosensor AG (Abb. 1.6) eingesetzt. Es wird mit einem Küvettensystem, d.h. nicht im Durchfluss, betrieben. Dieses System ermöglicht es, acht Messungen simultan auszuführen. Dabei kann eine Durchmischung des Küvetteninhaltes mit Hilfe der Pipettiereinheit auf mechanischem Wege erreicht werden. Das Plasmonic[®] verwendet als „optisch dichteres“ Medium ein Glasprisma, das goldbeschichtet ist.

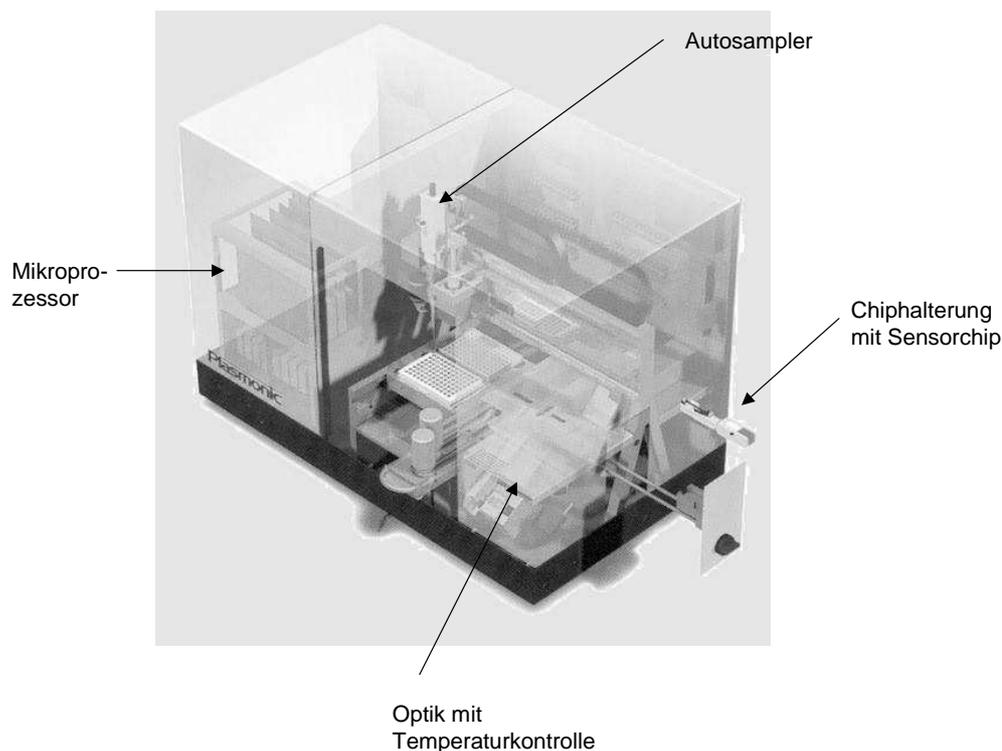


Abb. 1.6: SPR-Gerät Plasmonic[®]. [Quelle: Plasmonic Biosensor AG]

Das Plasmonic[®] arbeitet mit einer defokussiven Optik. Dabei wird die Strahlung unterschiedlicher Einstrahlwinkel auf verschiedene Stellen des Prismas geleitet (Abb. 1.7). Dies geschieht mit Hilfe einer Zylinderlinse, die sich zwischen der Lichtquelle und dem Prisma befindet.

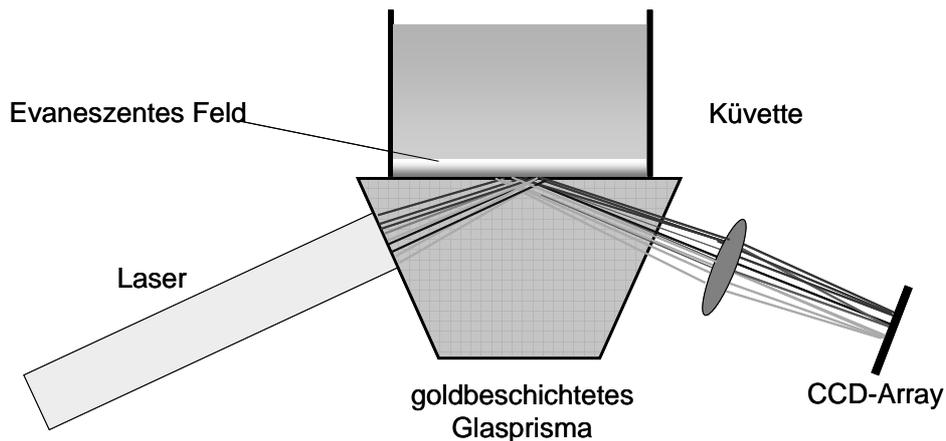


Abb. 1.7: Strahlengang der defokussiven Optik des Plasmonic® SPR-Gerätes. Die Strahlung unterschiedlicher Einfallswinkel wird auf verschiedene Stellen des Prismas geleitet.

Als Lichtquelle dient eine Laserdiode, die einen elliptischen Strahlenkegel aussendet. Durch die Zylinderlinse ist es möglich, die Strahlendivergenz in der Einfallsebene zu erhalten. Dabei werden alle zur Ermittlung des Resonanzwinkels in Betracht kommenden Einfallswinkel umfasst. Die Strahlendivergenz wird also im Plasmonic® dazu genutzt, ohne Strahlformungsoptik und ohne Änderung der Ausrichtung der Lichtquelle die reflektierende Schicht mit Licht verschiedener Einfallswinkel auszuleuchten. Dies ermöglicht eine kostengünstigere Bauweise. Auf der anderen Seite erfordert diese Technik eine hohe Präzision bei der Herstellung der Goldschicht sowie der Immobilisierung der biosensitiven Schicht. Grund hierfür ist, dass im Verlauf beispielsweise einer biomolekularen Interaktionsanalyse bei Fortschreiten der Prozesse an der Oberfläche unterschiedliche Messpunkte zur Auswertung herangezogen werden. Inhomogenitäten würden zu Ungenauigkeiten innerhalb einer Messung führen. Die Detektion der reflektierten Strahlung erfolgt mit Hilfe einer CCD-Kamera (vgl. dazu Kapitel 2.2.5).

1.1.1.2 Reflektometrische Interferenzsensoren

Reflektometrische Interferenzsensoren basieren darauf, dass auf transparente Schichten eingestrahktes Licht an Grenzflächen zum Teil reflektiert wird und die reflektierten Teilstrahlen miteinander interferieren können. Dabei entstehen charakteristische Interferenzspektren, die quantitativ ausgewertet werden können. Wird Licht auf einen transparenten Träger, beispielsweise Glas oder Glas mit einer biosensitiven Schicht, eingestrahkt, wird der Lichtstrahl an den Grenzflächen zum Teil transmittiert, zum Teil reflektiert (Abb. 1.8). Grenzflächen sind im einfachsten Fall der Übergang Luft/Glas mit biosensitiver Schicht und Glas mit biosensitiver Schicht/ Analytlösung. Die an den Grenzflächen reflektierten Teilstrahlen weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Weglängen eine Phasenverschiebung zueinander auf. Es kommt durch destruktive oder konstruktive Interferenz zur Entstehung eines charakteristischen Interferenzspektrums. Durch Anlagerung von Biomolekülen an die biosensitive Schicht des Glasträgers vergrößert sich dessen optische Dicke.

Als Folge legt der Teilstrahl, der an der Grenzfläche Glas mit biosensitiver Schicht und Analytlösung reflektiert wird, eine größere Wegstrecke zurück. Es kommt zu einer Phasenverschiebung und das Interferenzspektrum wird in charakteristischer Weise verändert. Diese Änderung ist proportional zur Änderung der optischen Schichtdicke und kann somit zur Auswertung herangezogen werden.

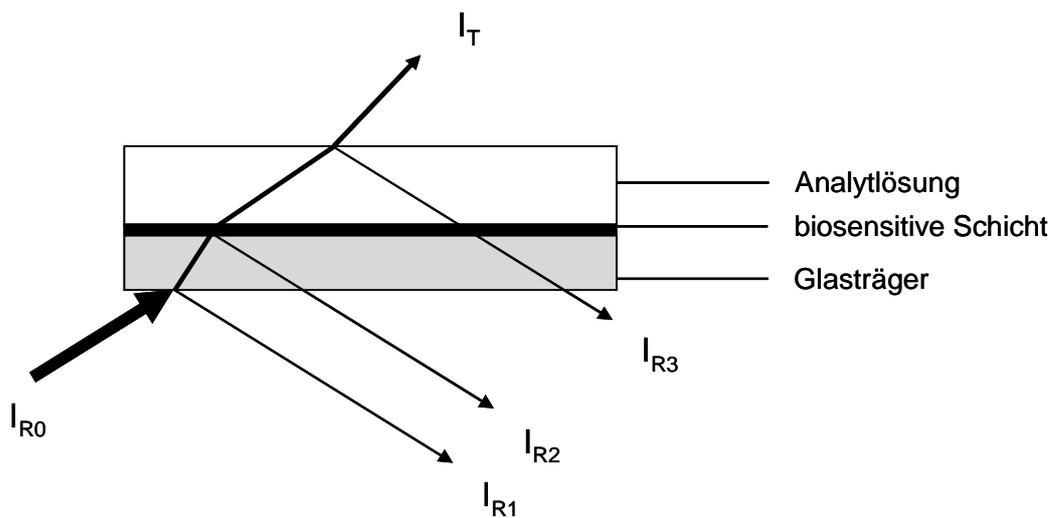


Abb. 1.8: Schema der Reflexion und Transmission an Grenzflächen.

Wie auch die Oberflächenplasmonresonanzsensoren können die Reflektometrischen Interferenzsensoren Affinitätsreaktionen an der Oberfläche einer biosensitiven Schicht in Echtzeit markierungs- und zerstörungsfrei verfolgen. Dabei sind sie, was den Geräteaufbau und auch die biosensitiven Träger angeht, in den meisten Fällen deutlich kostengünstiger als die SPR. Nachteilig ist, dass sie eine hohe Planarität der Oberfläche erfordern. Dennoch sind auch die Reflektometrischen Interferenzsensoren wichtige Werkzeuge für die biomolekulare Interaktionsanalyse. Die Reflektometrischen Interferenzsensoren können abhängig von der verwendeten Strahlungsquelle in Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) und Spektralphasen-Interferenz (SPI) (Abb. 1.9) unterschieden werden.

Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)

Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie dient als Strahlungsquelle eine Weißlichtquelle, d.h. alle Wellenlängen der Quelle liegen in einem breiten Spektrum im sichtbaren Bereich. Das Weißlicht wird auf einen mit einer sogenannten Interferenzschicht beschichteten Glasträger eingestrahlt. Ein solches Schichtsystem kann beispielsweise aus 10 nm Ta_2O_5 und 500 nm SiO_2 auf 1 mm Glassubstrat bestehen [Piehler, 1997]. Weitere Interferenzschichten finden sich bei Brecht (1993). Die Interferenzschicht trägt eine biosensitive Schicht mit einem sehr ähnlichen Brechungsindex, so dass beide Schichten als Einheit behandelt werden können. Gemessen wird die wellenlängenabhängige Intensität des reflektierten Lichtes. Zur

Auswertung wird die Verschiebung der Kurvenextrema (Auslöschung bzw. maximale Verstärkung des Lichtes durch Interferenz) des Interferenzspektrums genutzt. Sie ist proportional zu der z.B. durch die Anlagerung von Biomolekülen bedingten Schichtdickenänderung.

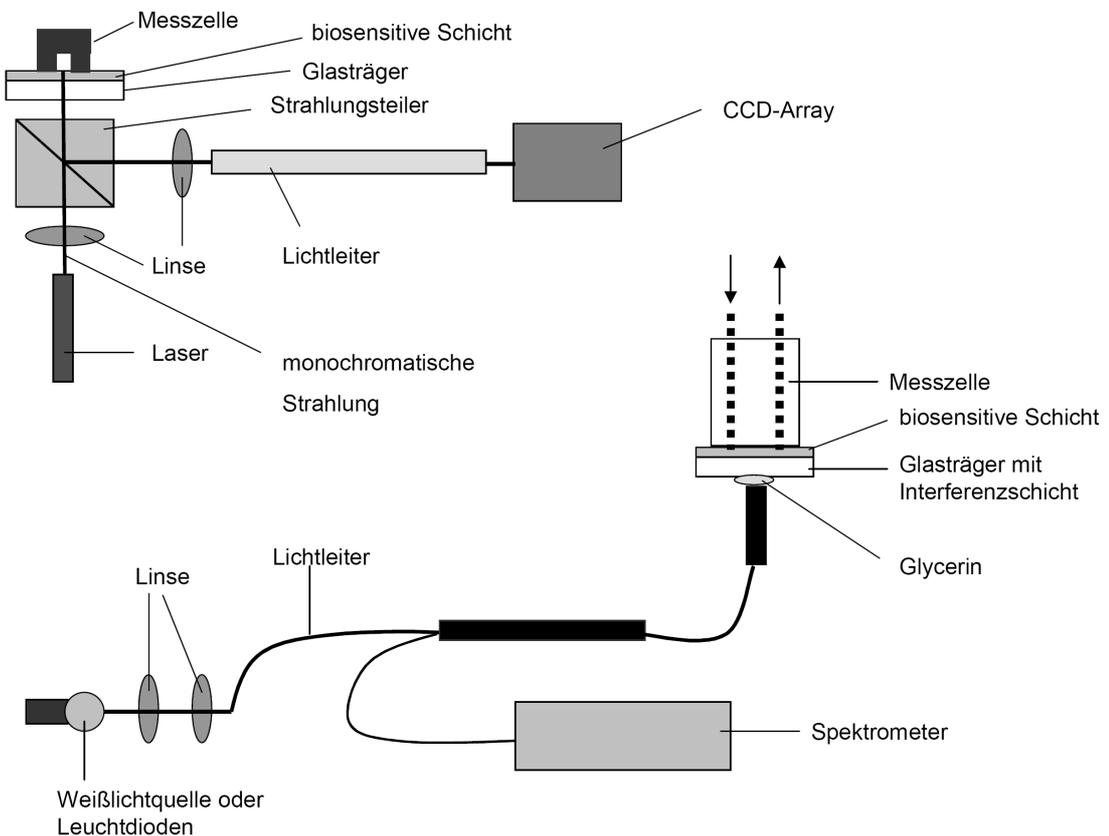


Abb. 1.9: Schema des apparativen Aufbaus der SPI (oben) und der RfS (unten). Bei der SPI wird als Strahlungsquelle ein Laser verwendet, bei RfS eine Weißlichtquelle oder bei kompakterer Bauweise Leuchtdioden. Während der SPI kostengünstige mikroskopische Deckgläschen als Träger der biosensitiven Schicht dienen, nutzt RfS eine zusätzliche Beschichtung der Glasträger mit einer Interferenzschicht [Hartmann, 2004].

In einer kompakteren und kostengünstigeren Version wurde RfS mittlerweile auch mit Leuchtdioden statt einer Weißlichtquelle realisiert. Weitere Details zur Reflektometrischen Interferenzspektroskopie finden sich bei Brecht (1993), Gauglitz et al., (1993) und Piehler (1997).

Spektralphasen-Interferenz (SPI)

Bei der Spektralphasen-Interferenz (SPI) (Abb. 1.9 und Abb. 2.33) wird im Gegensatz zu RIfS eine monochromatische Lichtquelle verwendet. Dies können Leuchtdioden, superlumineszente Dioden, Tunable-Laser oder insbesondere Halbleiter-Laser sein [Nikitin et al., 2000]. Das Licht wird mit Hilfe einer Linse gesammelt und auf einen Strahlenteiler geleitet. Von dort aus wird es im Winkel von 90° auf einen planparallelen Glasträger eingestrahlt, der im Unterschied zu RIfS keine Interferenzschicht besitzt. Vielmehr wird hier die biosensitive Schicht durch geeignete Verfahren direkt auf den Glasträger aufgebracht. Folgerichtig sind diese „Biochips“ deutlich kostengünstiger. An den Grenzflächen Luft/Glasträger, Glasträger/biosensitive Schicht und biosensitive Schicht/Analytlösung wird das eingestrahelte Licht teilweise reflektiert und teilweise transmittiert. Detektiert wird bei SPI das an den Grenzflächen reflektierte Licht. Dabei haben der Glasträger und die biosensitive Schicht einen sehr ähnlichen Brechungsindex und können daher als Einheit betrachtet werden. Die Reflexion an dieser Grenzfläche kann somit vernachlässigt werden [Nikitin et al., 2001]. Die reflektierten Teilstrahlen können miteinander interferieren, wodurch sich ein charakteristisches Interferenzspektrum ergibt. Eine durch Anlagerung von Biomolekülen bedingte Änderung der optischen Schichtdicke führt zu einer Phasenänderung der Interferenzstruktur, die ausgewertet werden kann. Die reflektierte Strahlung trifft wiederum auf den Strahlenteiler. Ein Teil der Strahlung wird mit Hilfe einer Linse in einen Lichtwellenleiter eingekoppelt. Er dient als flexible Verbindung zwischen Messkopf und Spektrometer. Das Spektrometer besteht seinerseits aus einem ersten Objektiv, einem Beugungsgitter, einem zweiten Objektiv und einem CCD-Array. Das Ausgangssignal des CCD-Arrays wird mit Hilfe eines Analog-Digitalwandlers digitalisiert.

1.1.2 Feldeffektbasierte Biosensoren

Die feldeffektbasierten Biosensoren gehören zur Gruppe der elektrochemischen Biosensoren. Das Prinzip des Feldeffekts wird bisher in der Biosensorik im Wesentlichen bei drei verschiedenen Sensorsystemen verwendet:

- Ionensensitiver Feldeffekttransistor (ISFET)
- Elektrolyt-Isolator-Halbleiter-Sensor (EIS)
- Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor (LAPS)

Alle drei Sensortypen basieren auf dem gleichen Messprinzip, haben aber durch ihren unterschiedlichen Aufbau und durch ihre unterschiedlichen elektrischen Sensorsignale verschiedene Vor- und Nachteile.

Eingegangen werden soll auf den LAPS Sensor, der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde.

1.1.2.1 Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor (LAPS)

LAPS Strukturen gehören zu den feldeffektbasierten Sensorsystemen und basieren auf EIS-Strukturen. Hierbei bildet die aus der Halbleiterelektronik bekannte MIS-Struktur (MIS: Metall/Isolator/Semiconductor) die Grundlage. Verwendet man als Isolator ein Oxid, so spricht man von einer MOS-Struktur (MOS: Metall/Oxid/Semiconductor) bzw. der MOS-Kapazität. Die MOS-Struktur besteht aus einem Halbleitermaterial (z.B. p-dotiertes Silicium), einem Isolator (z.B. SiO_2) und einem Metallkontakt (z.B. Al). Zur elektrischen Kontaktierung wird noch ein Metallkontakt auf der Rückseite des Halbleiters benötigt. Abb. 1.10 (links) zeigt den schematischen Aufbau einer MOS-Struktur. Entfernt man den metallischen Kontakt auf der Vorderseite (sog. Gate-Kontakt) und ersetzt diesen durch einen Elektrolyten und eine Referenzelektrode, kommt man zur EIS-Struktur, die in der Literatur auch häufig als EOS-Struktur (EOS: Elektrolyt/Oxid/Semiconductor) bezeichnet wird (Abb. 1.10, rechts). Mit dieser EIS-Struktur ist nun eine Ionenanalytik in Flüssigkeiten möglich.

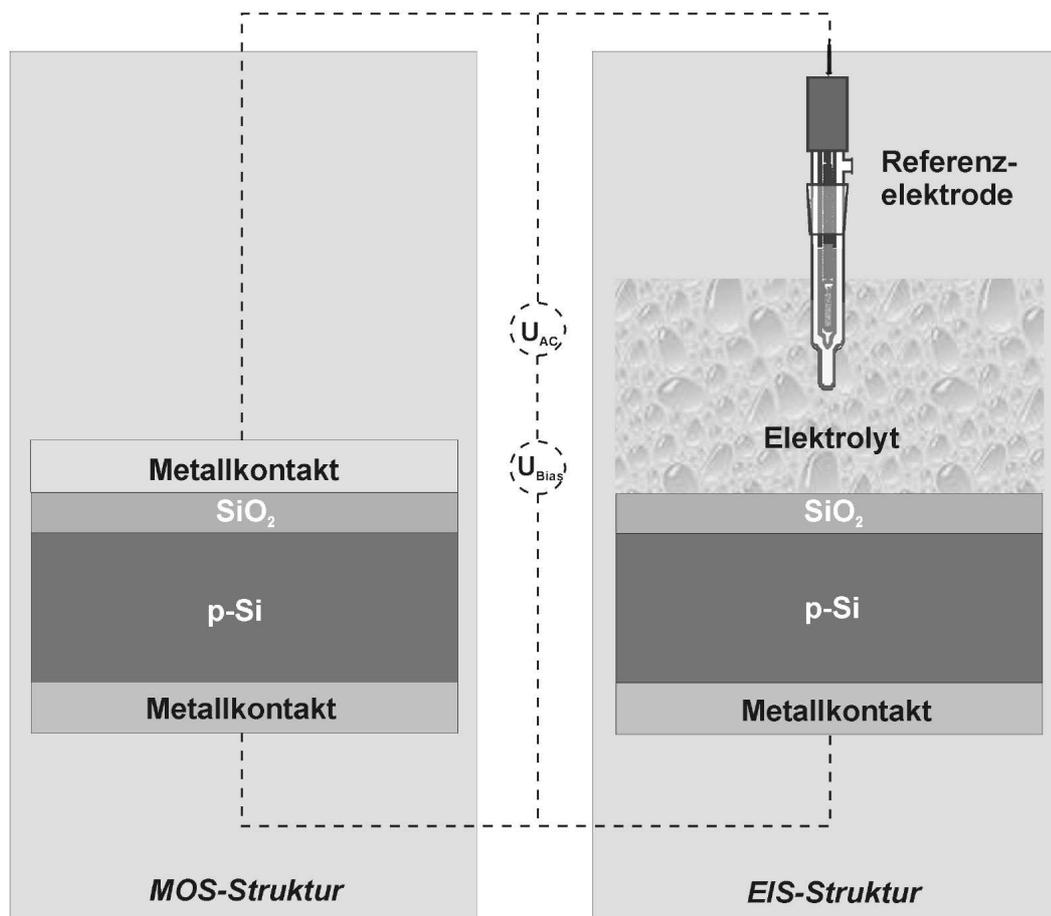


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der MOS-Struktur (links) und der EIS-Struktur (rechts) [Kloock, 2009].

Das 1988 von Hafeman et al. entwickelte Prinzip des LAPS basiert auf einer EIS-Struktur. Der Aufbau des Sensors besteht aus einem halbleitenden Substrat mit einem Isolator (z.B. SiO_2) als Kontaktmaterial zum Elektrolyten. Auf der Rückseite des halbleitenden Substrates befindet sich ein ohmscher Metallkontakt zur elektrischen Kontaktierung zum Messsystem. Das generierte SiO_2 eignet sich nur bedingt zur Detektion von Ionen (wie beispielsweise dem pH-Wert) in Flüssigkeiten. Zur Verbesserung der Sensitivität sowie der Stabilität der Sensorstruktur wird meist zusätzlich zum SiO_2 eine Schicht aus Si_3N_4 , Al_2O_3 oder Ta_2O_5 aufgebracht. Die elektrische Kontaktierung der Vorderseite des LAPS erfolgt über den Elektrolyten und die Referenzelektrode. Abb. 1.11 zeigt die schematische Darstellung für die Messung mit einem LAPS.

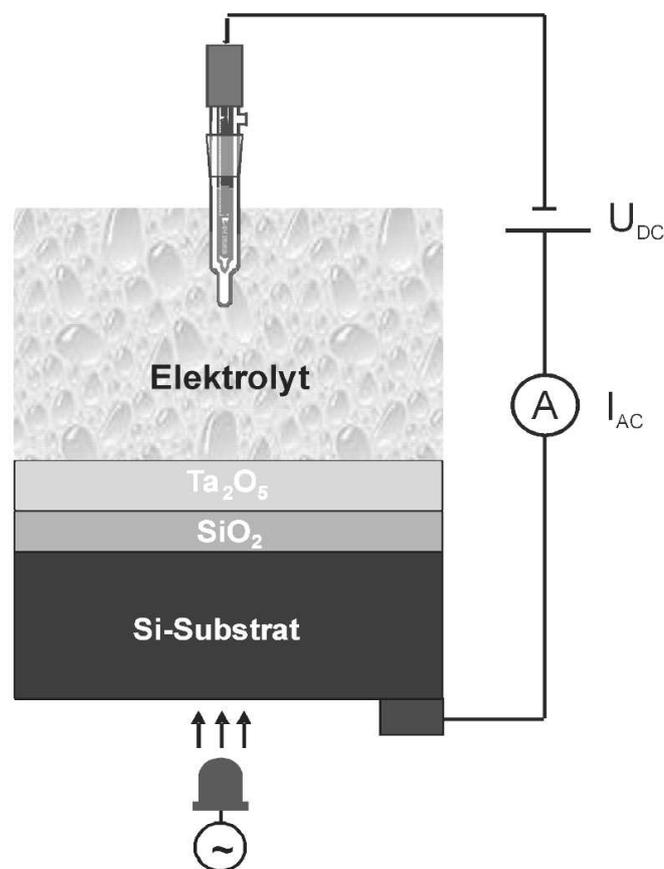


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der LAPS-Struktur [Kloock, 2009].

Für die Messung wird zunächst eine Bias-Spannung (U_{DC}) an die LAPS-Struktur angelegt. Wird z.B. an einen n-Halbleiter eine negative Spannung U_{DC} angelegt, so werden Elektronen von der Grenzfläche Isolator/Halbleiter ins Innere des Halbleiters zurückgedrängt. Das Interface verarmt somit an Majoritätsträgern (Elektronen) und es bildet sich eine Verarmungsschicht-Kapazität C_{dpl} aus. Für das Auslesen des Messsignals wird nun das Halbleitersubstrat lokal mit einem modulierten Lichtstrahl im Nahen-Infrarot (IR)-Bereich beleuchtet. Als Lichtquelle werden IR-LEDs (LED: Light

Emitting Diode) mit einer Wellenlänge von 810 nm verwendet. Die Energie liegt innerhalb des Bandabstands E_g . Wird nun der Halbleiter mit einer IR-Lichtquelle beleuchtet, so werden Elektron-/Loch-Paare generiert, die dann rekombinieren, diffundieren oder im elektrischen Feld getrennt werden können. Dieser sogenannte Photostrom I_{Photo} ist vom lokalen Oberflächenpotential an der beleuchteten Stelle abhängig. Ist I_P der Strom, der durch die Generation von Elektron-/Loch-Paaren entsteht und C_{iso} die Kapazität des Isolators sowie C_{dpl} die Kapazität der Verarmungsschicht, so kann der zu messende Photostrom I_{Photo} durch folgende Gleichung dargestellt werden [Grattarola und Massobrio, 1998]:

$$I_{Photo} = \frac{C_{iso}}{C_{iso} + C_{dpl}} \cdot I_P \quad (1.1)$$

Der generierte Photostrom I_{Photo} ist abhängig von der Ionenkonzentration der Elektrolytlösung. Als Messergebnis erhält man eine Photostrom/Spannungskurve, die ähnlich der Kapazitäts/Spannungs-Messung einen sigmoiden Verlauf hat.

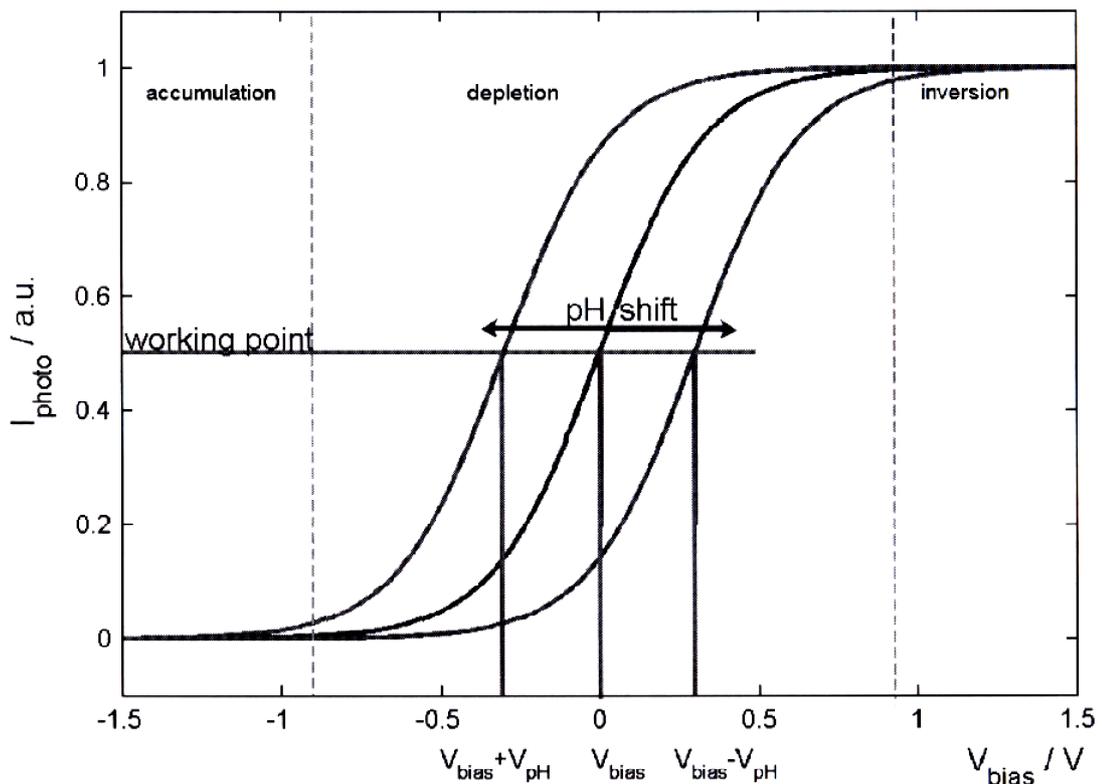


Abb. 1.12: Typische Strom/Spannungs-Kurve (I/V) für einen p -dotierten LAPS, mit $I_P=0$ für die Anreicherungsregion, $0 < I_P < I_{max}$ für die Verarmungsregion und $I_P=I_{max}$ für die Inversionsregion. Durch Änderungen im Oberflächenpotential verschiebt sich die I/V Kurve [Wagner und Schöning, 2007].

Abb. 1.12 gibt eine typische Strom/Spannungs-Kurve (I/V) wieder. Die Amplitude des Photostroms startet bei Null für die Anreicherungsregion (accumulation). Da keine Raumladungsregion entsteht, kann kein Gesamtsummenstrom gemessen werden. Mit Zunahme der Biasspannung nimmt die Verarmungsschicht (depletion) zu und demzufolge steigt auch die Amplitude des Photostroms. Letztlich ist der Photostrom gesättigt, weil die Biasspannung bis zur Inversion erhöht ist. Der LAPS-Sensor nutzt die Abhängigkeit des Photostroms von der Biasspannung aus, um die Änderung seines Grenzflächenpotentials zu detektieren. Für unterschiedliche pH-Werte verschiebt sich die Photostrom/Spannungs-Kurve entlang der Spannungsachse, wie es in der Grafik zu sehen ist (pH shift). Durch Messung der Verschiebung kann der pH-Wert oder die Ionenkonzentration quantitativ bestimmt werden. Die Verschiebung der Photostrom/Spannungs-Kurve wird oft durch Verfolgen des Potentials des Wendepunktes der Kurve gemessen (working point). An diesem Punkt ist der Photostrom am empfindlichsten gegenüber Änderungen im Oberflächenpotential.

Für das LAPS-System können IR-LEDs verwendet werden. Andere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einsatz von IR-Lasern (z.B. zur Verbesserung der Ortsauflösung), um Systeme für die „chemische Bildgebung“ zu entwickeln [Yoshinobu et al., 2005]. Weiterhin kann das Sensorsystem sowohl von der Rückseite (Abb. 1.11) als auch von der Elektrolytseite her beleuchtet werden. Die großen Vorteile des LAPS sind zum einen in der Ortsauflösung des Systems zu sehen, zum anderen brauchen keine weiteren lithographischen Schritte für die Herstellung von Leiterbahnen oder ähnlichem verwendet zu werden [Hafeman et al., 1988; Grattarola und Massobrio, 1998; Owicki et al., 1994; Bleicher, 1986; Adami et al., 1992; Parak, 1999; Ermolenko et al., 2004; Zhang, 2005].

1.2 Immobilisierung

Wie bereits in der Definition dargestellt, besteht ein Biosensor aus Biomolekülen, die in direktem Kontakt mit dem physikalischen Transducer stehen. Zu diesem Zweck muss die biologische Komponente auf der Oberfläche des Transducers immobilisiert werden. Bei diesem Vorgang ist wichtig, dass es keine signifikante Beeinflussung der Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität der immobilisierten DNA, Enzyme, Antikörper und sonstiger Proteine gibt [Keusgen, 2002]. Heute stehen zahlreiche Immobilisierungstechniken zur Verfügung, die diese Anforderungen erfüllen [Weetall, 1993; Turkova, 1999; Guilbault, 1988; Keusgen, 1999; Milka et al., 2000].

Allgemein können Biomoleküle durch kovalente Bindung, Komplexbildung, Adsorption, Zucker-Lektin oder Biotin-(Strept)Avidin Bindung sowie durch die Integration in Gele immobilisiert werden. Bei Antikörpern ist auch eine Bindung mit Hilfe von Protein A oder Protein G möglich.

Geeignete kovalente Immobilisierungsprotokolle wurden bisher zumeist empirisch ermittelt. In diesem Zusammenhang stellt die SPR ein zweckmäßiges Werkzeug dar,

um derartige Immobilisierungsprozesse entwickeln und beurteilen zu können. Hierbei ist die Aufnahme von Reaktionskinetiken (Bindungskinetiken) ein wesentlicher Bestandteil der Methode [Liedberg et al., 1983]. Durch eine ansonsten markierungsfreie Detektion können zusätzliche Veränderungen der immobilisierten Biokomponente vermieden werden.

Generell werden Trägermaterialien vor der Immobilisierung einer Biokomponente aktiviert, um eine möglichst hohe Zahl an Bindungsstellen zu generieren. Da die direkte Immobilisierung eines Biomoleküls auf einer Trägeroberfläche zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen kann, wird die Oberfläche in vielen Fällen nach der Aktivierung mit einem Spacer (Abstandshalter) versehen. Dies sind meist bifunktionale Moleküle, die sowohl eine Bindung mit den funktionellen Gruppen der Trägeroberfläche als auch mit dem Biomolekül eingehen können (Abb. 1.13).

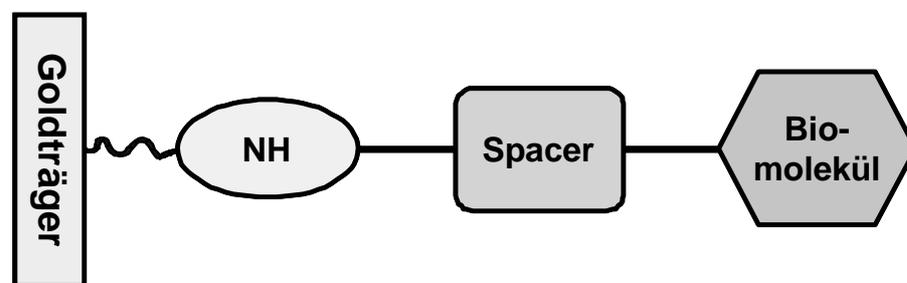


Abb. 1.13: Schema der Immobilisierung einer Biokomponente an einer aminofunktionalisierten Goldoberfläche. Um einen möglichen Aktivitätsverlust des Biomoleküls zu vermeiden, wird ein Spacer eingeführt.

1.3 Immunologie

Die Immunologie befasst sich mit der körpereigenen Abwehr von Infektionen. Die Gesamtheit der Abwehrsysteme wird als Immunsystem bezeichnet. Im Wesentlichen besteht das Immunsystem aus drei Komponenten: Der unspezifischen und spezifischen zellulären sowie der humoralen Immunabwehr [Janeway und Travers, 1995]. Die Leistung des Immunsystems besteht darin, die Integrität eines Individuums zu bewahren, indem ein Schutz gegen Angriffe von „außen“ (z.B. Bakterien, Viren) und von „innen“ (z.B. entartete Zellen) vermittelt wird. Dazu muss das Immunsystem zwei wesentliche Aufgaben übernehmen: Zum einen muss es in der Lage sein, zwischen „Eigen“ und „Fremd“ zu unterscheiden, also Pathogene erkennen; zum anderen muss es Fremdstoffe bzw. Pathogene effektiv beseitigen und einen stärkeren Schutz gegen erneuten Kontakt bieten. Die Ausführung dieser Aufgaben wird als Immunantwort bezeichnet, wobei die Art der Immunantwort abhängig ist von der Art des Krankheitserregers und von der Lokalisation der Infektion (intra- oder extrazellulär).

Eine Immunantwort kann grundsätzlich über zwei unterschiedlich organisierte immunologische Effektorsysteme vermittelt sein [Medzhitov und Janeway, 2000]:

1. Das *unspezifische*, angeborene Immunsystem
2. Das *spezifische*, erworbene Immunsystem

Keines der beiden Systeme ist allein in der Lage Pathogene zu beseitigen. Nur das Zusammenspiel von *spezifischer* und *unspezifischer* Immunantwort gewährleistet den Schutz vor Pathogenen und deren vollständige Beseitigung.

Bei der unspezifischen zellulären Immunabwehr werden eingedrungene Organismen durch Phagozytose (Makrophagen und Granulozyten) unschädlich gemacht. Die angeborene Erkennung der körperfremden Organismen basiert wahrscheinlich auf Kohlenhydratstrukturen an deren Oberfläche.

Die spezifische zelluläre Abwehr dient der Erregerbekämpfung im Inneren der Zellen und erfolgt durch T-Lymphozyten. Diese erkennen infizierte oder körperfremde Zellen und führen zu deren Abtötung.

In der Immunologie finden die Evaneszenzfeldsensoren in einem großen Bereich Anwendung. Sie ermöglichen biomolekulare Interaktionen in Echtzeit ohne vorherige Markierung der Reaktionspartner und sind, aufgrund der Visualisierung einzelner Bindungsschritte, besonders für komplexe Assays geeignet [Pathak und Savelkoul, 1997].

Für die Immunosensorik am interessantesten ist die humorale Immunabwehr auf Basis körpereigener Proteine, den Antikörpern. Anders als die spezifische zelluläre Abwehr dient die humorale der Beseitigung fremder Strukturen aus dem Blutplasma und extrazellulären Flüssigkeiten. Vereinfacht erklärt läuft die humorale Immunantwort wie folgt ab [Parkin und Cohen, 2001]: Das Knochenmark stellt B-Zellen in großer Zahl zur Verfügung. Jede B-Zelle verfügt über einen spezifischen Antigenrezeptor, der in die Membran der Zelle eingebaut ist (Zelloberflächenimmunoglobulin). Durch Kontakt der Zelle mit dem entsprechenden Antigen wird sie stimuliert und beginnt sich zu teilen. Dabei differenziert sich ein Teil der Tochterzellen zu Gedächtniszellen, der Rest zu Effektorzellen. Die Effektorzellen produzieren dann den Antikörper in großer Menge und sezernieren ihn (primäre Immunantwort). Der Antikörper bindet spezifisch an das Antigen und inaktiviert es hierdurch oder bereitet es für die Zerstörung durch Phagozyten vor. Die Gedächtniszellen dienen der sekundären Immunantwort. Sie verbleiben über Jahre im Körper und führen bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen innerhalb kürzester Zeit zu einer effizienten Immunantwort, da die Proliferation und Differenzierung der Gedächtniszellen unverzüglich einsetzt. Im Vergleich zur primären Immunantwort ist die Affinität des gebildeten Antikörpers sowie der Titer höher. Außerdem ist die Anstiegszeit des Titers verkürzt und sein Abfall verlängert. Diese erworbene Immunität bezeichnet man auch als adaptive Immunität. Sie unterscheidet sich von der angeborenen oder nicht-adaptiven Immunität dahingehend, dass sie auf der Selektion antigenspezifischer Lymphozytenklone beruht.

Die Auswahl der zu einem bestimmten Antigen „passenden“ B-Zelle aus einer großen Menge unreifer B-Zellen verschiedener Spezifität wird als Theorie der klonalen Selektion bezeichnet [Medzhitov und Janeway, 2000].

1.3.1 Antikörper

Antikörper sind Plasmaproteine, die spezifisch an Antigene binden. Jedes Antikörpermolekül besitzt eine einzigartige Struktur, die es ermöglicht, ein bestimmtes Antigen zu binden. Die Grundstruktur ist jedoch bei allen Antikörpern gleich; man fasst sie daher unter dem Oberbegriff Immunglobuline zusammen. Ein Antikörpermolekül (IgG) besteht aus jeweils zwei identischen leichten (je 25 kDa) und schweren (je 50 kDa) Peptidketten, welche zusammen die charakteristische Y-Form bilden (Abb. 1.14) [Diamandis und Christopoulos, 1996].

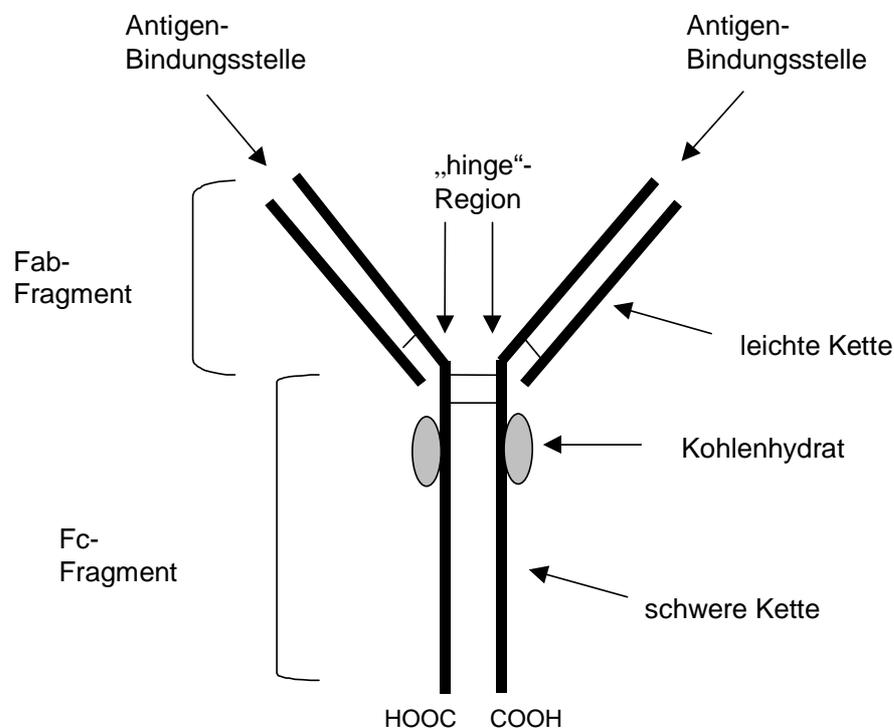


Abb. 1.14: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (IgG-Molekül).

Je eine leichte Kette ist über eine oder mehrere Disulfidbrücken an eine schwere Kette gebunden. Die beiden schweren Ketten sind ebenfalls durch eine oder mehrere Disulfidbrücken in der sogenannten „hinge“-Region miteinander verbunden. In dieser Region ist das Molekül beweglich, was eine Variation des Abstandes der Antigenbindungsstellen ermöglicht. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten besitzen Regionen mit konstanter und Bereiche mit stark variierender Aminosäuresequenz. Die konstanten Regionen der schweren Ketten bilden den „Fuß des Y“. Hier liegen auch die C-terminalen Enden der beiden Peptidketten.

Die variablen Regionen am Aminoende der leichten und schweren Ketten bilden zusammen die beiden Antigenbindungsstellen an den Enden der „Arme des Y“. Die Sequenzvariabilität ist in den variablen Regionen nicht überall gleich. Es gibt drei besonders variable Bereiche, die als hypervariable Regionen bezeichnet werden. Die Abschnitte zwischen diesen Bereichen sind hinsichtlich ihrer Sequenz relativ konstant und werden Gerüstregionen genannt. Diese Gerüstregionen bilden die strukturelle Basis der variablen Region (β -Faltblätter). Die hypervariablen Regionen erzeugen dabei drei Schleifen an einem Rand eines jeden Faltblattes, die sich im gefalteten Protein nebeneinander befinden. Ebenso liegen im Antikörpermolekül jeweils die hypervariablen Schleifen einer leichten und einer schweren Kette zusammen. Auf diese Weise entsteht eine hypervariable Oberfläche, die die antigenbindende Stelle bildet [Janeway und Travers, 1995]. Durch enzymatische Spaltung mit Papain in der „hinge“-Region erhält man zwei spezifische sogenannte Fab-Fragmente (Fragment antigen binding) mit der Antigenbindungsstelle und ein konstantes Fc-Fragment (Fragment crystallizable). Spaltung mit Pepsin führt zu einem $(\text{Fab})_2$ -Fragment, bei dem die „Arme“ des Antikörpermoleküls verbunden bleiben (Abb. 1.15).

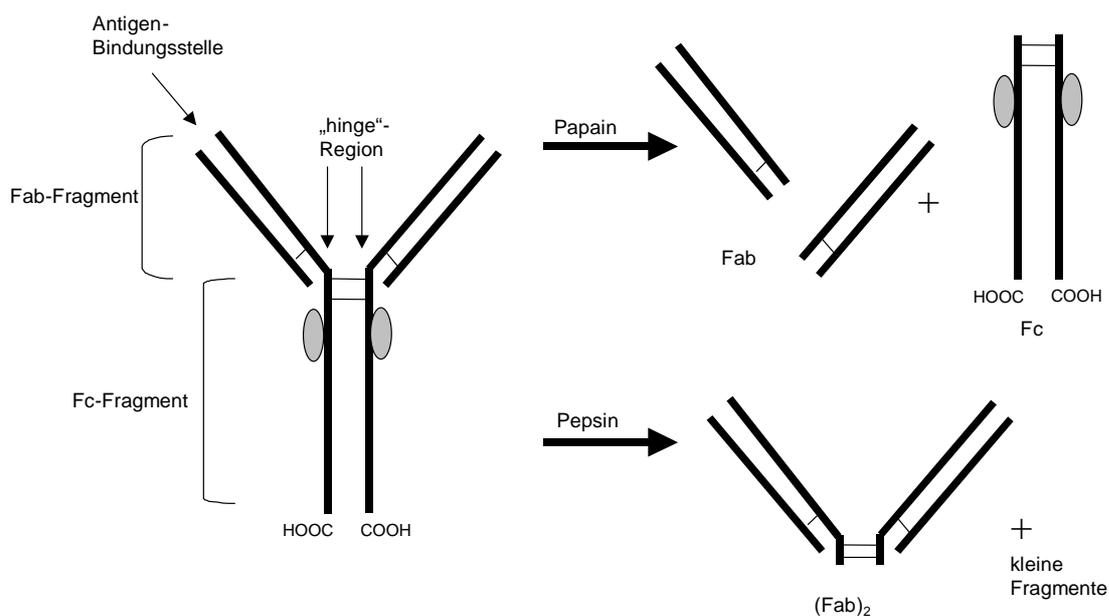


Abb. 1.15: Enzymatische Spaltung eines IgG-Moleküls. Spaltung mit Papain führt zu zwei Fab-Fragmenten, Spaltung mit Pepsin zu einem $(\text{Fab})_2$ -Fragment.

Das Fc-Fragment eines Antikörpers ist für die Abtötung bzw. Beseitigung antikörpermarkierter Antigene entscheidend. Für die Beseitigung durch Phagozytose sind Leukozyten zuständig, die die konstante Region (Fc) des Antikörpermoleküls mit Hilfe von Fc-Rezeptoren erkennen. Die Immunglobuline können in fünf Klassen eingeteilt werden: Immunglobulin M (IgM), G (IgG), A (IgA), D (IgD) und E (IgE) [Diamandis und Christopoulos, 1996]. Die Klassifizierung erfolgt nach der Anzahl Y-förmiger Einheiten und auf Basis struktureller Unterschiede in den schweren Ketten. Während es nur zwei

Typen von leichten Ketten gibt (κ und λ), sind es bei den schweren fünf (γ , α , μ , δ und ϵ). Das oben beschriebene IgG Molekül besitzt beispielsweise zwei schwere Ketten vom γ -Typ und ein Molekulargewicht von ~ 150 kDa. IgA- und IgM-Moleküle sind dagegen aus zwei (IgA) bzw. fünf (IgM) Einheiten aufgebaut. Dabei sind die Einheiten durch Peptidketten und Disulfidbrücken miteinander verbunden. Ein IgM-Molekül enthält im Unterschied zu IgG zehn statt nur zwei Antigenbindungsstellen (Abb. 1.16).

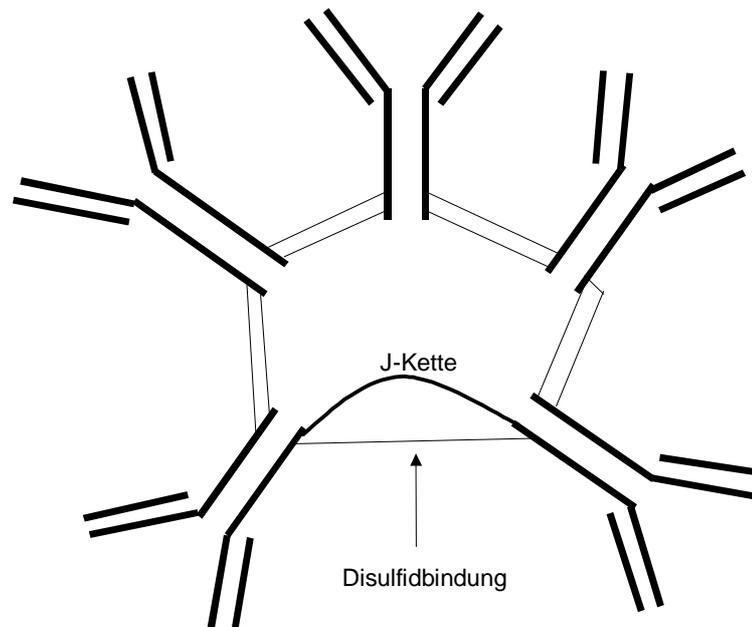


Abb. 1.16: Schema eines IgM-Moleküls. Fünf IgM Monomere sind über Disulfidbrücken und eine Polypeptidkette (J-Kette) miteinander verknüpft. Das IgM-Molekül verfügt somit über zehn Antigenbindungsstellen.

Die verschiedenen Immunglobulinklassen nehmen unterschiedliche Aufgaben im Körper wahr: IgA ist beispielsweise der Hauptantikörper in äußeren Sekreten (Speichel, Tränenflüssigkeit) und bildet die erste Abwehr gegen bakterielle und virale Antigene [Woof und Kerr, 2006], während IgG als vorherrschender Antikörper im Serum in zahlreiche Immunantworten durch Bindung des Antigens einerseits und Bindung an die Fc-Rezeptoren von Makrophagen andererseits eingebunden ist.

1.3.2 Antigen-Antikörper Wechselwirkung

Antigene sind Proteine, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder Kombinationen aus diesen, die eine Immunantwort in dem entsprechenden Wirt hervorrufen können und von den gebildeten Antikörpern erkannt werden [Wu, 2000]. Die Eigenschaft, eine Immunantwort auslösen zu können, nennt man Immunogenität. Dabei sind kleine Moleküle meist nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Sie werden erst durch Kupplung an ein Makromolekül immunogen.

Die Region eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt wird, bezeichnet man als Epitop oder antigene Determinante. Da ein Epitop nur einen sehr kleinen Teil eines Antigens umfasst, ist es möglich, dass ein anderes Antigen über ein gleiches Epitop verfügt. Dies ist dann die molekulare Basis für Kreuzreaktionen.

Die Bindung des Antigens an den Antikörper erfolgt durch eine Kombination verschiedener, nichtkovalenter Wechselwirkungen. Im Einzelnen sind dies Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen), van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die weitreichenden Kräfte wie ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind wichtig für die Bindungsrate des Antigen-Antikörper-Komplexes, die weniger weitreichenden sind wichtig für die Stärke der Bindung. Je stärker die Bindung des Antigens zum Antikörper ist, um so geringer ist die Dissoziationsrate. Typische Dissoziationskonstanten liegen bei Antigen-Antikörper-Komplexen bei 10^{-7} bis 10^{-9} M.

1.3.3 Makrophagen

Monozyten und die differenzierteren Makrophagen gehören zum mononukleären Phagozytensystem [van Furth et al., 1972]. Sie gehen im Organismus aus dem Knochenmark hervor. Nach kurzer Verweildauer verlassen sie das Knochenmark und gelangen in die Blutzirkulation. Auf diesem Weg erreichen die Monozyten die verschiedenen Organe, wo sie zu Makrophagen differenzieren können. Makrophagen können folglich in den verschiedensten Geweben identifiziert werden und weisen ihrer jeweiligen Umgebung und der Beteiligung an unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine funktionelle, morphologische und phänotypische Heterogenität auf (z.B. Alveolarmakrophagen, Kupffer-Zellen der Leber).

Längst weiß man, dass Makrophagen nicht nur als Phagozyten agieren, sondern auch die Fähigkeit der Chemotaxis, der Antigenprozessierung und -präsentation sowie der Sekretion einer Fülle verschiedener Substanzen (Enzyme, Komplementfaktoren, reaktive Sauerstoffverbindungen, Zytokine usw.) besitzen. Damit sind Makrophagen in der Lage, zahlreiche wichtige Funktionen zu erfüllen. Sie sind von besonderer Bedeutung bei der Abwehr infektiöser Partikel und der Beseitigung beschädigter oder alternder Zellen. Makrophagen sind beteiligt an der Induktion der Akute-Phase-Reaktion, der Regulation von Hämatopoese und Hämostase, dem Schutz des Organismus gegen Tumoren und der Wundheilung. Jedoch sind Makrophagen auch bei pathologischen Vorgängen, wie Atherosklerose, Autoimmun- oder ZNS-Erkrankungen, involviert. Es gibt zudem deutliche Belege dafür, dass Monozyten/Makrophagen an der Angiogenese beteiligt sind [Moldovan, 2002].

1.4 Bakterien

Bakterien besitzen keinen echten Zellkern und werden daher als Prokaryoten bezeichnet. Unter diesen unterscheidet man heute die Archaea von allen übrigen Bakterien (Eubakterien).

1.4.1 Aufbau der Bakterien

Bakterien besitzen als Prokaryoten keinen von einer Membran umgebenen Zellkern, sondern weisen ein Kernäquivalent (Nucleoid) auf.

Außer einem echten Zellkern fehlen auch Organellen, wie z.B. Mitochondrien. Die ringförmige DNA liegt frei im Zytoplasma und ist nicht wie bei den Eukaryoten in Chromosomen lokalisiert. Die Zellwand enthält als Grundgerüst Murein, ein Heteropolymer (aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure), das für Prokaryoten charakteristisch ist.

Bakterien können ein unterschiedliches Erscheinungsbild haben, das sich in drei Grundformen Kugeln (Kokken), Stäbchen (*Bacillus*, *Pseudomonas*) und gekrümmte Stäbchen (Vibrionen, Spirillen) einteilen lässt.

1.4.2 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung ist die von dem dänischen Bakteriologen und Pathologen H. C. J. Gram (1853–1938) 1884 veröffentlichte Färbemethode zur Differenzierung von Bakterien. Die Gram-Färbung ist der erste Schritt zur Identifizierung eines unbekanntem Keims. Die auf einem Objektträger aufgetrockneten Bakterien werden zunächst mit Gentianaviolett oder Kristallviolett angefärbt, dann mit Lugols Lösung behandelt, wobei sich im Murein-Gerüst der Zellwand ein Farblack bildet.

Bei Gram negativen Bakterien (z.B. Enterobakterien, Essigsäurebakterien, *Pseudomonas*), deren Murein-Anteil etwa 10 % der Trockenmasse ausmacht, kann die Farbe mit Ethanol wieder herausgelöst werden. Nach der „Gegenfärbung“ mit Karbol-Fuchsin-Lösung oder Safranin erscheinen die Gram negativen unter dem Mikroskop rosa bis rot.

Die Gram positiven Bakterien (z.B. Milchsäurebakterien, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*) enthalten etwa 30–50 % Murein, das nicht mit Ethanol herausgelöst werden kann. Gram positive erscheinen nach der Gegenfärbung blauviolett [Schlegel, 1992].

Dem unterschiedlichen färberischen Verhalten Gram negativer und Gram positiver Bakterien liegen Strukturunterschiede der Bakterienzellwand und dadurch bedingte Permeabilitätsunterschiede bei der Aufnahme bzw. Abgabe von Farbstoffen zugrunde. Gram negative Bakterien verfügen über eine äußere Membran, welche als Permeabilitätsbarriere den Zutritt von Gentianaviolett zum Murein verhindert. Die Gram-Färbung ist somit ein wichtiges systematisches Merkmal.

1.4.3 Lipopolysaccharid (LPS)

LPS, auch Endotoxin genannt, ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram negativer Bakterien. Der Name Lipopolysaccharid verweist auf die chemische Struktur von LPS; es besteht aus einem Polysaccharidanteil (hydrophil) und dem Lipid A Teil (hydrophob) (Abb. 1.17). Aufgrund ihres amphiphilen Charakters lagern sich die LPS-Moleküle in wässrigen Lösungen, wie z.B. Serum, zu supramolekularen Aggregaten zusammen und bilden sogenannte Mizellen [Seydel et al., 1993]. Eine Untereinheit des LPS, das Lipid A, wurde in den 50er und 60er Jahren chemisch charakterisiert und später als der biologisch aktive Anteil des LPS erkannt. Das Lipid A ist die am wenigsten variable Komponente im LPS und verankert in der bakteriellen Zellmembran [Westphal et al., 1954; Gmeiner et al., 1969; Rietschel et al., 1994]. Inzwischen ist die Gesamtstruktur von LPS verschiedener Bakterienarten aufgeklärt [Brade et al., 1985; Imoto et al., 1985; Beutler et al., 2003].

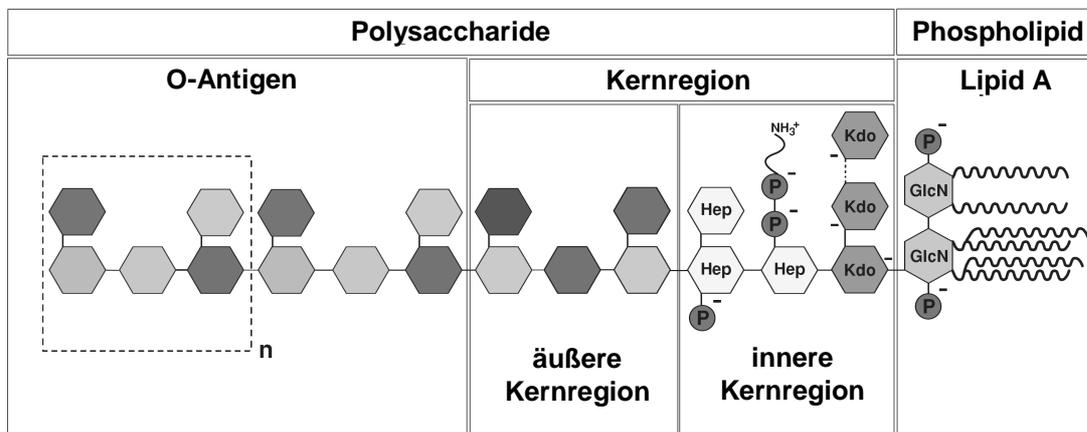


Abb. 1.17: Schematische Darstellung von Lipopolysaccharid. LPS besteht aus dem O-Antigen, der äußeren und inneren Kernregion, welche zusammen den Polysaccharidanteil darstellen, und dem Lipid A. Das O-Antigen wird aus bis zu 50 Oligosacchariden, die sich aus drei bis acht verschiedenen Einzelzuckern zusammensetzen, gebildet. Der äußere Kern enthält die häufig vorkommenden Saccharide Glucose, Galactose, Glucosamin und Galactosamin, während der innere Kern den in der Natur selten synthetisierten Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste (Hep), die phosphoryliert (P) sein können, enthält. Das Grundgerüst des Lipid A ist ein phosphoryliertes Glucosaminodisaccharid (GlcN), welches vier Fettsäurereste trägt, von denen zwei wiederum sekundär acyliert sind [Alexander und Rietschel, 2001].

1.4.3.1 Wirkung der Lipopolysaccharide im menschlichen Körper

Nach Eintritt Gram negativer Bakterien in die Blutbahn werden bei Zerstörung der Zellwand Lipopolysaccharide (LPS) freigesetzt und können ihre toxische Wirkung entfalten. LPS bindet an das LPS-Bindeprotein (LBP) [Tobias et al., 1989]. Dieser LPS/LBP-Komplex kann dann an das CD14 Protein (auf Makrophagen) binden, das löslich bzw. an der Oberfläche von Makrophagen vorkommt [Wright et al., 1990; Wright, 1995] und aktiviert den Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4). Dieser erkennt den CD14/LBP/LPS-Komplex, allerdings erst nachdem er mit einem weiteren Protein,

MD-2, im Komplex vorliegt [Shimazu et al., 1999]. Letztlich führt dieses zur Aktivierung des Nuklear-Faktors κB (NF- κB) [Ulevitch und Tobias, 1995], der in den Zellkern wandert und eine transkriptionelle Aktivierung proinflammatorischer und immunmodulatorischer Gene induziert. Es folgt die Freisetzung von Zytokinen, u.a. IL-1, IL-8 und TNF- α , der CD14 tragenden Zelle. Anschließend wandern neutrophile Granulozyten unter dem Einfluss von IL-8 (Chemokin) ins betroffene Gewebe ein. Die vermehrt an den Infektionsort eingewanderten Zellen werden aktiviert, um den Erreger abzutöten bzw. zu beseitigen. Hier spielt das Zytokin TNF- α die essentielle Rolle. TNF- α führt in diesem Zusammenhang zu einer Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten und verstärkt zytotoxische Faktoren (wie ROS und NO) zu produzieren (Abb. 1.18).

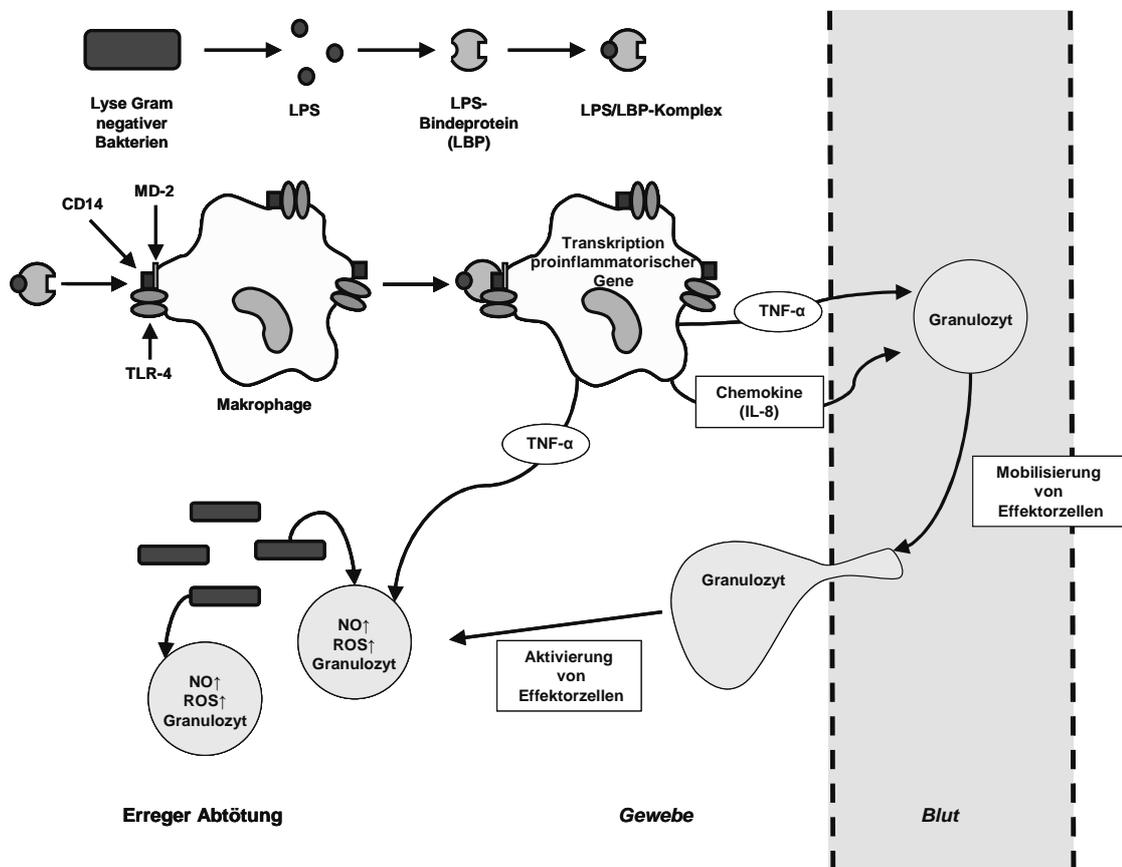


Abb. 1.18: Schema der zellulären Reaktion bei LPS-Kontakt. Aktivierte Toll-like Rezeptoren (TLR-4) auf phagozytierenden Makrophagen bewirken die Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere TNF- α und Chemokine (IL-8), was zur Endothelaktivierung und Mobilisierung von weiteren Effektorzellen in das infizierte Gewebe führt. Makrophagen-Zytokine stimulieren dann wiederum Effektorzellen, mit den Erregern auf unterschiedlichste Art fertig zu werden. Insbesondere TNF- α spielt hierbei eine wichtige Rolle.

1.4.4 Immunoassays zum Nachweis von Bakterien

Bakterielle Erreger können häufig mit Immunoassays nachgewiesen werden. Unter Immunoassays sind Testsysteme zu verstehen, die auf der Verwendung von Antikörpern beruhen. Zum Nachweis eines bestimmten Bakteriums können sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet werden, die sich nur gegen Oberflächenstrukturen des zu bestimmenden Bakteriums richten. Solche Strukturen können beispielsweise im Falle Gram negativer Bakterien O-Antigene (Lipopolysaccharide auf der Außenseite der Zellwand) oder H-Antigene (Proteine der Bakteriengeißeln) sein. Die Antikörper können spezifisch über diese Strukturen an das Bakterium binden. Diese Bindung ist Grundlage für einen Immunoassay. Sie ermöglicht einerseits eine Separation des Bakteriums aus einem Probengemisch und andererseits eine Detektion durch antikörpervermittelte Markierung. Die zur Detektion verwendeten Antikörper können z.B. mit einem Farbstoffmolekül, einem Enzym oder einer Fluoreszenz- bzw. radioaktiven Markierung versehen sein. Zur Separation des nachzuweisenden Bakteriums werden die spezifischen Antikörper auf einer Festphase (meistens aus einem Polymermaterial) immobilisiert. Anschließend wird die Probe aufgegeben und das Bakterium durch die immobilisierten Antikörper gebunden. Nach einem Spülprozess wird der markierte Antikörper hinzugegeben. Abhängig von der Art der Markierung erfolgt die Detektion zumeist photometrisch oder durch Ermittlung der Radioaktivität. Eine derartige Ausführung eines Immunoassays bezeichnet man als Sandwichassay (Abb. 1.19). Alternativ kann ein Immunoassay auch kompetitiv durchgeführt werden. Hierbei konkurriert das nachzuweisende Antigen mit gleichartigem aber markiertem Antigen um den immobilisierten Antikörper. Eine Detektion mit einem markierten Antikörper ist in diesem Fall nicht erforderlich. Für den Nachweis von Bakterien spielt diese Form des Immunoassays im Vergleich zu anderen Antigenen nur eine untergeordnete Rolle, da sie die Existenz markierter Bakterien voraussetzt.

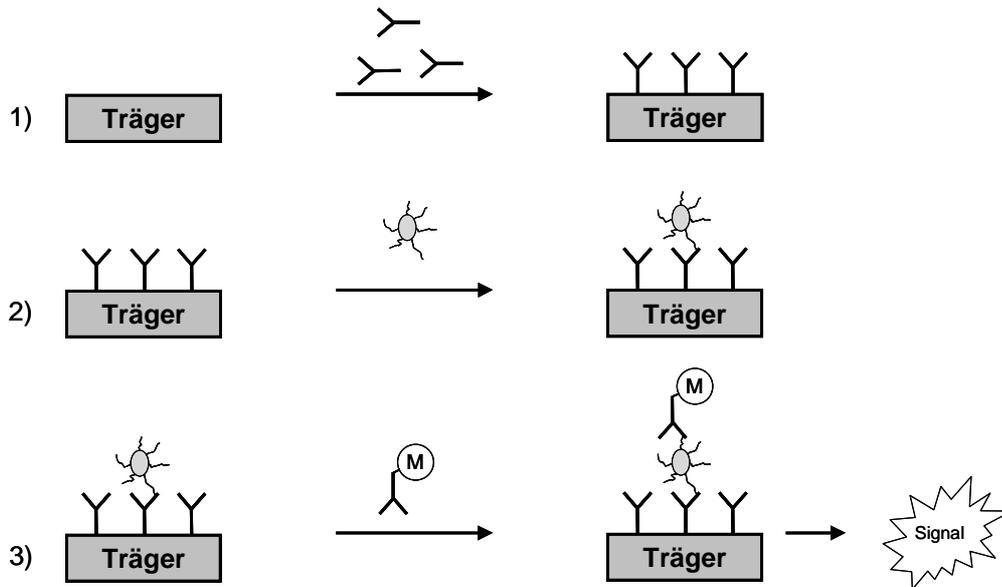


Abb. 1.19: Ablauf eines Sandwich-Immunoassays zum Nachweis eines Bakteriums. Nach Immobilisierung der Fängerantikörper (1) können Bakterien gebunden werden (2). Diese werden wiederum vom markierten (M) Detektionsantikörper erkannt. Im Detektionsfall kann ein Signal bestimmt werden.

1.4.5 Liposomen als Membranmodell

Liposomen wurden erstmalig von Bangham im Jahre 1965 beschrieben [Bangham et al., 1965]. Dabei handelt es sich um kugelförmige kolloidale Vesikel, die einen wässrigen Innenraum mit einer oder mehreren Lipiddoppelschichten (ca. 5 nm dicke Bilayer, [Huang, 1969]) umschließen und deren Größe im Bereich von einigen Dutzend Nanometern bis einigen Mikrometern liegen kann. Sie entstehen durch spontane Selbstassoziation von Amphiphilen (i.d.R. Phospholipiden) im wässrigen Milieu.

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit biologischen Membranen bieten Liposomen vielseitige Einsatzmöglichkeiten als Modellsysteme zur Untersuchung von Membranprozessen [Sessa und Weissmann, 1968]. Bereits in den 70er Jahren wurde das Potential der Liposomen als Arzneistoffträger erkannt [Gregoriadis, 1976], da man sowohl hydrophile Stoffe im wässrigen Innenraum und in den Bilayerzwischen-schichten als auch lipophile Stoffe innerhalb der Bilayer inkorporieren kann. Dadurch kann ein Arzneistoff separiert verpackt, stabilisiert und einer von seinen physikochemischen Eigenschaften unabhängigen in vivo Verteilungskinetik unterworfen werden, die wiederum dann von den durch Änderung der Lipidzusammensetzung variierbaren Eigenschaften der Liposomen abhängt [Allen und Everest, 1983; Storm et al., 1987]. Zudem bedingt die Tatsache, dass die Hauptkomponenten von Liposomen, Phospholipide und Cholesterol, natürliche Bestandteile von Säugerzellmembranen sind, eine geringe in vivo Toxizität sowie Immunogenität, gute Biokompatibilität und Metabolisierung.

1.5 Säugetierzellen

Säugetierzellen (Eukaryoten) sind Organismen, deren Zellen einen echten Zellkern mit Kernhülle und membranbegrenzte Organellen aufweisen. Sie besitzen Chromosomen, in denen die DNA mit Proteinen vergesellschaftet ist. Die biochemischen Abläufe (z.B.: der Stoffwechsel) sind im Gegensatz zu den Prokaryoten wesentlich komplexer.

1.5.1 Zellmembran

Die Zellmembran stellt eine geschlossene flexible Struktur dar, die die Zelle umgibt. Hierbei handelt es sich um eine 6-10 nm dicke Phospholipid-Doppelmembran (Abb. 1.20).

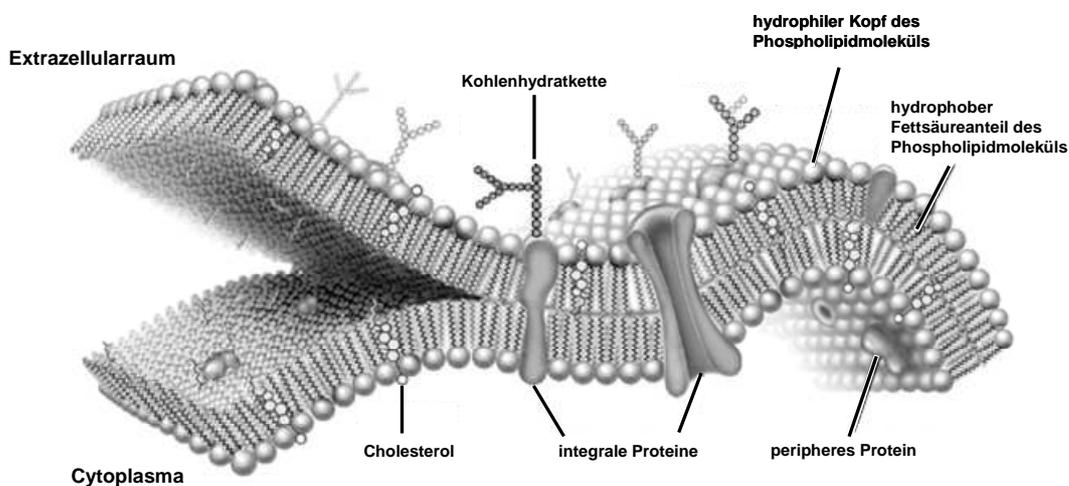


Abb. 1.20: Schematische Darstellung einer Zellmembran.
[Bildquelle: <http://concise.britannica.com>]

Diese Doppelmembranen grenzen das Cytoplasma jeder Zelle nach außen und gegebenenfalls auch nach innen gegen Vakuolen ab. Sie bilden bei Eukaryoten die Grenzschichten von Zellorganellen.

1.5.1.1 Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran

Die Zellmembran eukaryotischer Zellen enthält Kohlenhydrate, die kovalent an Lipide und Proteine gekoppelt sind (Abb. 1.20). Je nach Spezies und Zelltyp variiert der Kohlenhydratanteil der Plasmamembran zwischen 2 und 10 Gewichtsprozent. Die meisten Kohlenhydrate der Membran sind O- oder N-glykosidisch mit Proteinen verknüpft und bilden somit Glykoproteine; die übrigen Kohlenhydrate sind O-glykosidisch an Lipide gebunden und bilden Glykolipide (Abb. 1.20). Alle Kohlenhydrate der Zellmembran sind zum Extrazellulärraum hin ausgerichtet.

Glykoproteine sind mit einem Anteil von 80 % an den Glykokonjugaten die dominierende Kohlenhydratstruktur. Es wird angenommen, dass alle

membrangebundenen Proteine glykosiliert sind. Bei den Membranlipiden ist es nur 1 von 10 Molekülen. Diese Kohlenhydrat-Einheiten haben eine asymmetrische Verteilung auf der Zellmembranoberfläche. Trotz ihres relativ kleinen Anteils am Gewicht der Plasmamembran können die Oberflächenkohlenhydrate die komplette Zelloberfläche bedecken und so die erste Schicht der Wechselwirkung mit anderen Zellen bilden [Montreuil et al., 1983].

Die vorherrschenden Monosaccharide in den Glykokonjugaten der Zellmembran sind die neutralen Zucker Mannose, Galactose und Fucose, die Aminozucker Glucosamin und Galactosamin sowie deren acetylierten Derivate N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin, einschließlich der negativ geladenen Sialinsäuren. Weiterhin vorhanden sind C9 Zucker mit verschiedenen Substitutionen an den Amino- und Hydroxylgruppen.

Die Oligosaccharide der Glykoproteine werden abhängig von ihrer Zucker-Aminosäure-Bindung in zwei Gruppen eingeteilt, den N-glykosidischen- und den O-glykosidischen Typ. Die N-glykosidischen Kohlenhydrate können weiter in den sogenannten komplizierten und einfachen Typ unterteilt werden. Oberflächenkohlenhydrate können somit wichtige Determinanten der chemischen Identität der Zelle sein [Kornfeld und Kornfeld, 1980]. Es gibt viele Berichte über die Beteiligung von Oberflächenkohlenhydraten in Prozessen der spezifischen Zellerkennung [Lloyd, 1975; Kobata, 1979]. Dieser Bereich umfasst die Spezies spezifische Aggregation von Schwammzellen [Müller et al., 1977] bis zum Abfangen von Glykoproteinen aus dem Blutkreislauf durch Leberzellen [Kawasaki und Ashwell, 1976] und Rezirkulation von Lymphozyten in höheren Organismen [Stoolman und Rosen, 1983]. Darüber hinaus sind verschiedene Pflanzenlektine bekannt, die Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche mit einer hohen Spezifität erkennen [Lis und Sharon, 1981].

1.5.1.2 Kohlenhydratänderung in Tumoren

Das Phänomen der veränderten Oberflächenkohlenhydrat-Zusammensetzung in transformierten Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen ist in einer Vielfalt von Zellsystemen beobachtet worden. Modifizierungen in den Oberflächenkohlenhydraten kommen unabhängig des histogenetischen Ursprungs von Zellen und dem beteiligten Transformier-Prinzip vor. Diese Aussage, die bereits von Debray (1979) und Järnefelt et al. (1978) untersucht wurde, lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Erscheinen von größeren Oberflächen-Glykoproteinen eine allgemeine Begleiterscheinung der kanzerogenen Transformation ist. Bryant et al. (1974) verglichen die Zusammensetzung von proteingebundenem Kohlenhydrat in Normal- und Tumor-Gewebe der menschlichen Lunge. Hierbei stellten sie eine fortschreitende Zunahme in der Gesamtmenge der Kohlenhydrate, besonders bei den terminalen Zuckern Galactose und Sialinäure beim Übergang von Normal- zum neoplastischen Gewebe, fest. In Versuchen mit dem Maus B16 Melanom wurde ein charakteristischer Unterschied zum Kontrollgewebe sowohl in vivo als auch in vitro beobachtet

[Warren et al., 1975]. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Glick et al. (1976) mit menschlichen Neuroblastom-Tumoren erhalten.

1.5.2 Zelllinie

Zelllinien sind permanent *in vitro* wachsende Zellen mit definiertem Ursprung und charakteristischen Eigenschaften. Zahlreiche Zelllinien wurden von den verschiedensten Tumoren etabliert. Zelllinien sind meist einheitlich in ihrer Morphologie und in ihren funktionellen Eigenschaften. Bestimmte Zelllinien zeichnen sich durch selektive Wachstumseigenschaften aus, die bestimmte Zellkulturmedien mit definierten Wachstumsfaktoren erfordern. Zelllinien sind deshalb für die Untersuchung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen einschließlich der Prozesse der malignen Transformation wertvolle Untersuchungsobjekte. Zelllinien, die natürlicherweise oder nach zelltechnischer oder gentechnischer Veränderung bestimmte Substanzen (wie z.B. monoklonale Antikörper, Interleukine, Hormone) synthetisieren, haben ihren festen Platz in der Biotechnologie gefunden. Im Gegensatz zur Primärzelle und diploiden Dauerzellen haben kontinuierliche Dauerzelllinien einen heterogenen Chromosomensatz, der ein Vielfaches des normalen Chromosomensatzes ausmachen kann [Römpp, 2008].

1.5.3 Apoptose

Jede Zelle im Körper besitzt ein genetisches Programm, das sie absterben lässt. Dieses Programm wurde Apoptose genannt. Vermutlich erkennen die Zellen das auslösende Signal und reagieren darauf mit „Selbstmord“. Das bedeutet aber auch, dass die Apoptose ein aktiver, von der Zelle gesteuerter Prozess sein muss. Der programmierte Zelltod gilt daher als besonderer, terminaler Differenzierungsprozess [Grimm, 2003].

Caspasen sind (Cystein)Proteasen, die bestimmte Substrate in der Zelle verdauen, womit der Prozess der Selbstzerstörung eingeleitet wird. Dieser Prozess wird durch spezifische Stimuli (z.B. durch Lektine) ausgelöst. Bei diesem Vorgang, der etwa in einer Stunde abläuft, kommt es zu einem immer wiederkehrenden Bild der sterbenden Zellen. Ursprünglich wurde Apoptose daher nur aufgrund rein morphologischer Veränderungen der Zellen definiert. Dabei nimmt die optische Dichte der Zellen zu, da sich die Zellmembran unter Verlust von Wasser zusammenzieht. Durch den Abbau des Cytoskeletts bilden sich Blasen in der Cytoplasmamembran aus. Kleine, membranumschlossene Abschnürungen treten auf. Es handelt sich hierbei um die apoptotischen Körperchen (vgl. Abb. 3.92).

1.5.4 Apoptoseauslösende Faktoren

Proapoptotische Stimuli existieren in einer großen Vielfalt. Sie können zum Beispiel sowohl von benachbarten Zellen gebildet werden, als auch in den betroffenen Zellen selbst. Sie können aus einem positiven Signal, wie der Aktivierung von

Oberflächenrezeptoren bestehen, aber auch aus einem negativen, beispielsweise einem fehlenden Überlebensfaktor im Medium der Zellen.

Externe Apoptose auslösende Faktoren (Signale) sind z.B. ultraviolette Strahlen, Röntgenstrahlen, Gammastrahlen, Oxidation, Hitzeschock (heat-shock-response), cytotoxische Drogen (Cytotoxine) und Schwermetalle [Elmore, 2007]. Viele Faktoren (externer oder interner Natur), die oxidativen Streß auslösen, sind gleichzeitig Apoptosesignale, so dass Sauerstoffradikalen (freie Radikale) eine entscheidende Bedeutung bei der Apoptoseinduktion zukommt [Harman, 1992; Ozawa, 1995]. Radikalfänger und Chelatoren von Metallionen hemmen häufig die Apoptose. Des Weiteren wirkt Glutamat über die Erhöhung des intrazellulären Glutathionspiegels (Glutathion, γ -Glutamylzyklus) der Apoptose entgegen. Zum Schutz lebenswichtiger Proteine werden von der Zelle als Stressantwort Chaperone (Polypeptidkettenbindende Proteine) gebildet. Ihre Konzentration darf aber nicht zu hoch sein, da sie sehr wahrscheinlich selbst Auslöser für Apoptose sind.

Interne physiologische Stimuli sind ebenso zahlreich und können hier nur beispielhaft aufgeführt werden. Für die Entscheidung, welche Zellen eliminiert werden, spielen Signale von anderen Zellen eine wichtige Rolle. Zum Beispiel gehen "nerve growth factor-(NGF-)" abhängige sympathische Neuronen in Apoptose, wenn ihnen dieser Faktor vorenthalten wird. Wechselnde Hormonspiegel sind für eine solche Entscheidung ebenfalls verantwortlich [Elmore, 2007]. Hormonentzug bewirkt in vielen Geweben eine Gewebsatrophie durch Apoptose.

1.6 Lektine

Bei Lektinen handelt es sich um Glykoproteine, die bevorzugt in Pflanzen vorkommen (auch tierische Lektine sind bekannt). Ihre charakteristische Eigenschaft besteht in einem spezifischen Bindungsvermögen gegenüber Kohlenhydraten (lat. legere auswählen).

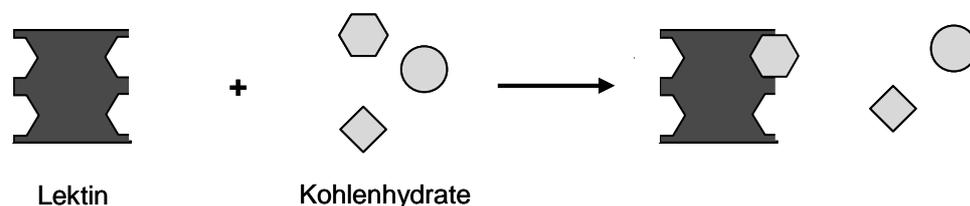


Abb. 1.21: Schema der Lektinspezifität. Lektine binden nur Kohlenhydrate, die ihrer Spezifität entsprechen.

Dabei muss das Protein oder Glykoprotein drei Voraussetzungen erfüllen [Rüdiger und Gabius, 2001]:

1. Es muss Kohlenhydrate binden. Mit dieser Anforderung werden andere Substanzen wie Tannine und bestimmte Lipide, die ebenfalls in der Lage sind Zellen zu agglutinieren, ausgeschlossen.
2. Es ist kein Antikörper. Antikörper können auch gegen Kohlenhydrate gerichtet sein und an diese binden. Im Unterschied zu Lektinen werden Antikörper jedoch auf einen Reiz hin gebildet, wohingegen Lektine organismenspezifische Inhaltsstoffe sind.
3. Lektine führen zu keiner biochemischen Modifikation der gebundenen Kohlenhydrate. Diese Definition schließt Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Enzyme, die eine funktionelle Gruppe in das Kohlenhydratmolekül einfügen, aus.

Lektine kommen in Pflanzen (z.B. Leguminosen), Tieren (z.B. Schnecken) aber auch in Mikroorganismen vor [Lis und Sharon, 1991]. Bei Pflanzen findet man sie vorwiegend in den Samen und den Speicherorganen, wobei ihr Gehalt von Pflanzenart zu Pflanzenart stark variieren kann [Rüdiger und Gabius, 2001]. So enthalten die Samen von *Canavalia ensiformis* (Jackbohne) durchschnittlich 2100 mg Lektin/100 g Samen, während es bei *Pisum sativum* (Gartenerbse) 140 mg Lektin/100 g sind.

Aufgrund ihrer Spezifität und ihrer Biosynthese können nach Rüdiger und Gabius (2001) die pflanzlichen Lektine in Leguminosen-Lektine (bspw. Concanavalin A, Sojabohnenagglutinin), Lektine von Solanaceae (bspw.: Kartoffelknollen-Lektin) und Euphorbiaceae (bspw.: *Ricinus communis* Agglutinin), sowie von Monocotyledonen (bspw.: Wheat Germ Agglutinin) eingeteilt werden. Des Weiteren gibt es eine Gruppe, die sich von den genannten darin unterscheidet, dass das endgültige Ziel nach der (Teil)Synthese im Endoplasmatischen Retikulum nicht wie sonst Speichervakuolen sind. Diese Lektine gehen beispielsweise eine lockere Assoziation mit der Zellwand ein. Bei den Leguminosen-Lektinen erfolgt eine weitere Einteilung in Lektine, deren Untereinheiten gleich oder verschiedenartig aufgebaut sind.

Die tierischen Lektine lassen sich in den meisten Fällen in C- und S-Typ-Lektine eingruppiert [Drickamer, 1988]. C-Typ Lektine benötigen zur Kohlenhydratbindung Ca^{2+} , S-Typ-Lektine nicht. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass bei den C-Typ-Lektinen Cysteinmoleküle Disulfidbrücken bilden, während bei dem S-Typ freie Thiole vorliegen. Darüber hinaus binden S-Typ-Lektine in den meisten Fällen nur β -Galactoside. Die Kohlenhydratspezifität bei den C-Typ-Lektinen ist dagegen sehr variabel. Alle tierischen Lektine, die nach dieser Klassifizierung nicht C- oder S-Typ sind, gehören dem N-Typ an (abgeleitet von not C or S). Eine neuere Einteilung differenziert stärker und kommt zu über zehn Strukturfamilien [vgl. Kilpatrick, 2002].

Die Klärung der biologischen Funktion der Lektine dauert an. Dabei werden bei pflanzlichen Lektinen zwei wesentliche Ansätze verfolgt:

1. Schutz vor tierischen Fressfeinden, Bakterien und Pilzen.
2. Wirkungen innerhalb der Pflanze, wie etwa Interaktionen mit Speicherproteinen oder Enzymen.

Denkbar ist auch, dass Lektine bei symbiotischen Prozessen (z.B. Symbiose mit Knöllchenbakterien bei Leguminosen) eine Rolle spielen [Rüdiger und Gabius, 2001]. Lektine können spezifisch an Zuckerbestandteile von Zellmembranen oder Zellwänden binden. Durch dieses spezifische Bindungsverhalten kommt es zu Veränderungen des Metabolismus innerhalb der Zelle [Sharon und Lis, 1989]. Eine derartige Interaktion kann aber auch zu direkten Veränderungen an der Zellmembran oder der Zellwand führen. Diese Änderungen können sich z.B. auf die Permeabilität, den elektrischen Widerstand oder auf Bindungseigenschaften der Zelle auswirken. Einige pflanzliche Lektine sind in der Lage, das Immunsystem durch eine Aktivierung der T-Lymphozyten zu stimulieren. So führt zum Beispiel ConA aus *Canavalia ensiformis* nach Bindung an verschiedene Membranrezeptoren von Lymphozyten zu einer Proliferation dieser Zellen. Andere Lektine wiederum bewirken eine Agglutination von Zellen und können deshalb zur Blutgruppenbestimmung eingesetzt werden [Khan et al., 2002]. Lektine sind allgemein in der Lage, Glucokonjugate zu präzipitieren [Dwek, 1996]. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von mehr als einer Zuckerbindungsstelle.

Anwendung finden Lektine in der Medizin beispielsweise zur Blutgruppenbestimmung oder Zellmarker für diagnostische Zwecke. Des Weiteren werden sie in der Affinitätschromatographie zur Trennung und Reinigung von Glykoproteinen und -lipiden, Polysacchariden, Enzym-Antikörper Konjugaten und Membranvesikeln verwendet [Amersham Biosciences, affinity chromatography handbook, 2001]. In der Zellbiologie dienen sie etwa zur Zellkulturfraktionierung und zur Regulation der Zellproliferation [Rüdiger und Gabius, 2001].

1.6.1 Concanavalin A

Das Lektin ConA ist ein Metalloprotein aus *Canavalia ensiformis* (Jackbohne), das bereits 1919 kristallisiert werden konnte [Sumner, 1919]. ConA ist aus vier identischen monomeren Untereinheiten aufgebaut, wobei jedes Monomer aus 237 Aminosäuren besteht, ein Molekulargewicht von 26 kDa besitzt und über eine Kohlenhydratbindungsstelle verfügt (Abb. 1.22) [Cunnigham et al., 1975]. Darüber hinaus besitzt jede monomere Untereinheit ein Ca^{2+} - und ein Mn^{2+} -Ion, die für die Kohlenhydratbindung essentiell sind [Jack et al., 1971]. Unter pH 5,5 liegt ConA als Dimer, ab $\text{pH} \geq 7,0$ vorwiegend als Tetramer vor (Abb. 1.22) [Senear und Teller, 1981]. ConA ist im Gegensatz zu den meisten anderen Lektinen kein Glykoprotein und enthält darüber hinaus kein Cystein [Olson und Liener, 1967]. Es bindet mit hoher Affinität spezifisch an α -D-mannose- und α -D-glucosehaltige Kohlenhydrate, weist aber auch in gewissem Umfang Affinität zu weiteren Zuckern auf [Kanellopoulos et al., 1996_a].

Zur Kohlenhydratbindung sind unmodifizierte Hydroxylgruppen an den Positionen C-3, C-4 und C-6 der D-Glyko- oder D-Mannopyranose essentiell [Goldstein et al., 1965]. Eine Hydroxylgruppe am C-2 Atom ist nicht erforderlich; allerdings kommt es bei einer D-Manno-Konfiguration zu einer stärkeren Bindung als bei einer D-Gluco-Konfiguration. Die Affinität des Lektins ist zu oligomeren bzw. polymeren Kohlenhydraten größer als zu monomeren. Bei polymeren Zuckern erfolgt darüber hinaus die Bindung bevorzugt an den Kettenenden [Goldstein et al., 1965]. ConA ist in der Lage, spezifisch an die Membranen von Erythrozyten zu binden und die Zellen dadurch zu agglutinieren [Clarke und Denborough, 1971]. Außerdem wirkt es mitogen für T-Lymphozyten und führt so zu einer Proliferation dieser Zellen [Ruscetti und Chervenick, 1975; Novogrodsky und Katchalski, 1971]. Eingesetzt wird ConA vor allem in der Affinitätschromatographie [Amersham Biosciences, affinity chromatography handbook, 2001]. Es dient aufgrund seiner Kohlenhydratbindungseigenschaften häufig als Modellprotein zu Forschungszwecken in der Biologie und Biochemie [Bittiger und Schnebli, 1976].

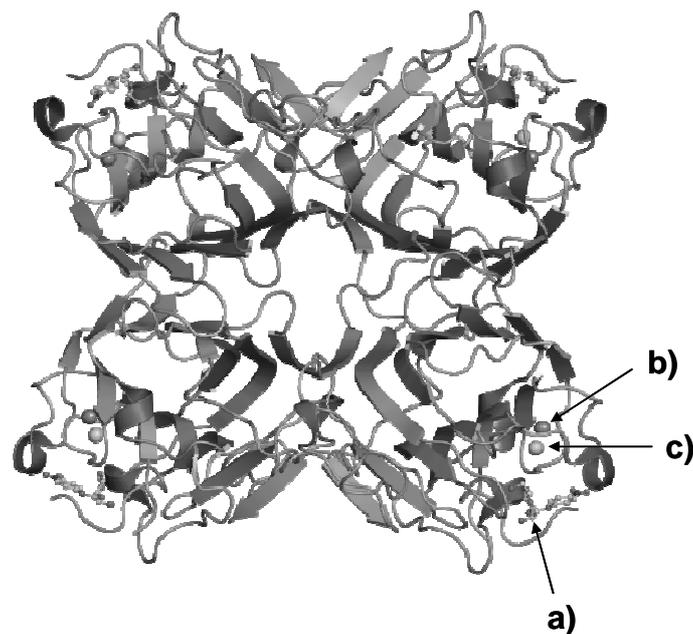


Abb. 1.22: Grafische Darstellung von ConA als Tetramer; a) Kohlenhydratbindungsstelle mit gebundenem Kohlenhydrat, b) Mn^{2+} -Ion und c) Ca^{2+} -Ion der monomeren Einheit [Kanellopoulos et al., 1996_b; PDB-Code: 1vam].

1.6.2 Mistellektine

Die Mistellektine (*Viscum album* Agglutinin I, II, III) finden Anwendung in der Krebstherapie. Es wurde ein zytotoxischer und immunstimulierender Effekt *in vitro* nachgewiesen; jedoch konnte bislang keine klinische Studie eine direkte Antitumorwirkung oder einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. die Überlebensrate beweisen [Stauder und Kreuser, 2002]. Dagegen gibt es Hinweise darauf, dass eine zusätzliche Misteltherapie eine Verbesserung der Lebensqualität bewirken kann [Heiny, 1991]. In Stauders und Kreusers Analyse wurden nur Studien zugrunde gelegt, die einer rationalen Misteltherapie genügen; Untersuchungen mit homöopathischen oder anthroposophischen Präparaten wurden nicht berücksichtigt. Im Handel befindliche Präparate sind beispielsweise abnobaVISCUM®, Iscucin®, Iscador®, Lektinol® oder Helixor®. Die Mistelpräparate unterscheiden sich erheblich in der Herstellung und damit in ihren Inhaltsstoffen und deren Konzentration.

Zur Therapie bzw. Stimulation des Immunsystems werden Mistelextrakte mit standardisiertem Lektinegehalt im Konzentrationsbereich von 1 ng/kg Körpergewicht eingesetzt [Hajto et al., 1989]. Nachweislich steigt die Zahl der T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen im peripheren Blut an [Hajto et al., 1989; Beuth et al., 1992]. Außerdem führt die Gabe von MLI zu einer verstärkten Ausschüttung von Interleukin 1, Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor α [Hajto et al., 1990] und bewirkt die Konzentrationserhöhung von β -Endorphin im Blut, welches zu einer verbesserten Lebensqualität von Tumorkranken beiträgt [Beuth et al., 1992]. Bisher sind die Mechanismen der immunmodulatorischen Wirkung von MLI weitgehend unverstanden. Es bestehen jedoch Hinweise, die belegen, dass die Lektinkomponente für die Reaktionen der Immunzellen verantwortlich ist [Gabius et al., 1991].

1.6.2.1 Natürliches Mistellektin I

Beim MLI handelt es sich um ein Ribosomen inaktivierendes Protein (RIP) des Typs II, welches aus zwei verschiedenen Ketten besteht (Abb. 1.23) [Franz, 1985]: Einer katalytischen A-Kette (29 kDa), welche die Proteinsynthese inhibiert, und einer B-Kette (34 kDa), welche an Galactosereste von Zelloberflächen bindet, wodurch die Internalisierung des MLI in die Zelle ausgelöst wird. Die beiden Ketten sind durch eine Disulfidbrücke (Cys 260A und Cys 5B) miteinander verbunden. Die B-Kette ist in allen Lektinen unterschiedlich aufgebaut, wohingegen die A-Ketten untereinander vergleichbar sind [Olsnes et al., 1982; Niwa et al., 2003]. Natürliches Mistellektin I ist identisch mit *Viscum album* I Agglutinin (VAA I), Viscumin und hat 25 Isolektine. In Lösung liegt MLI als konzentrationsabhängiges Gemisch aus Dimeren (ca. 60 kDa) und nicht-kovalent verbundenen Tetrameren (ca. 115 kDa) vor.

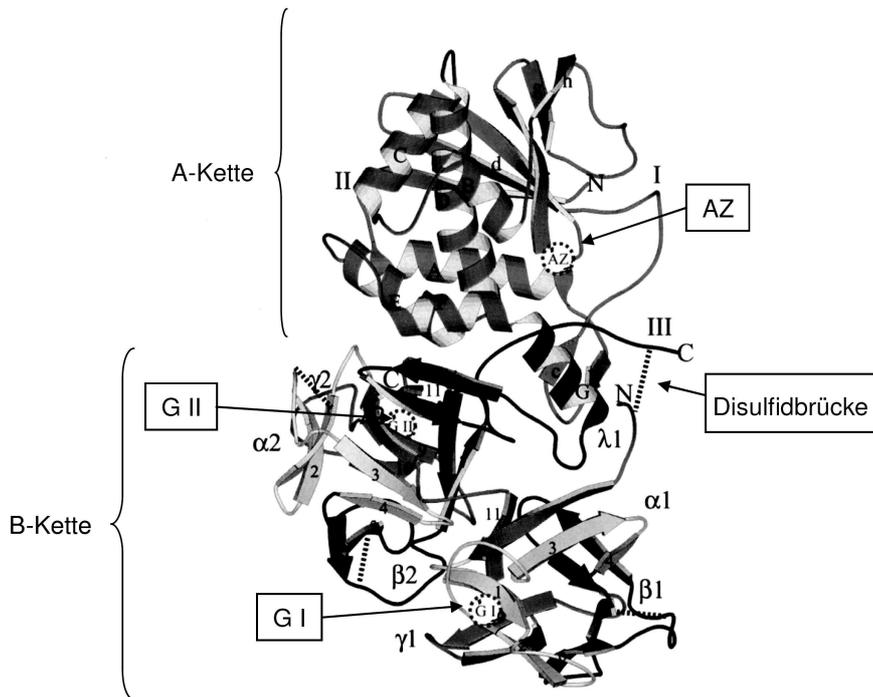


Abb. 1.23: Faltung des Mistellektins I mit Darstellung der Disulfidbrücken (gestrichelte Linien), des aktiven Zentrums (AZ) der A-Kette und der Galactosebindungsstellen (G I und G II) der B-Kette [Krauspenhaar et al., 1999].

In Typ I der RIPs ist eine einzelne Polypeptidkette, die die gleiche Sequenz und Strukturhomologie aufweist wie die A-Kette der Typ II RIPs. Die geringe Zytotoxizität der Typ I RIPs ist auf das Fehlen der Fähigkeit der Zell-Internalisierung zurückzuführen, die von den B-Ketten der Typ II RIPs ausgeübt wird [Barbieri et al., 1993; Van Damme et al., 2001; Peumans et al., 2001]. Nach der Endozytose eines Typ II RIPs wird es zum Golgi Apparat und dann weiter zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert [Sandvig und van Deurs, 1996]. Letztlich ist das Toxin jenseits der Membran des ERs in Richtung des Cytosols lokalisiert, um seine katalytische Wirkung auf die Ribosomen auszuüben. Studien unter Verwendung des MLI [Agapov et al., 1999_{a,b}] wiesen darauf hin, dass die Disulfidbindung zwischen den beiden Ketten aufgehoben wurde und die A-Kette ungefalteter ist, bevor sie ins Cytosol übergeht.

Die A-Kette stellt somit die zytotoxisch aktive Komponente des Mistellektins dar. Sie inhibiert die Proteinbiosynthese durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung des Adenosins A 4324 in eukaryotischer 28S rRNA, was schließlich zur Apoptose der Zelle führt [Franz et al., 1981; Endo et al., 1988; Büssing und Schietzel, 1999; Krauspenhaar et al., 1999; Mikeska et al., 2005].

Zur Entfaltung des toxischen Potentials muß MLI in die Zielzelle aufgenommen werden. Hierbei fungieren eine Reihe von Glykoproteinen und Glykolipiden mit terminalen Galactoseresten als Rezeptoren für die Internalisierung in die Zelle. Die Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen begünstigt diesen Prozess. Wie an Zellkulturexperimenten

gezeigt werden konnte, unterscheiden sich im Falle von MLI die Art und die Zahl der Rezeptoren je nach Zelllinie [Stirpe et al., 1982].

1.6.2.2 Rekombinantes Mistellektin I

Rekombinantes Mistellektin I (rMLI) besteht aus einer A-Kette (ca. 26 kDa) und einer B-Kette (ca. 30 kDa), die über eine Disulfidbindung miteinander verbunden sind (Abb. 1.24). Rekombinantes Mistellektin I ist im Gegensatz zum natürlichen Mistellektin I (MLI) nicht glykosyliert. Die relative Molekülmasse des reassozierten Proteins beträgt 56 kDa [Eck et al., 1999_{a,b}; Schöffski et al., 2004]. Neben prokaryotischen Zellen können auch eukaryotische Zellen als Wirt dienen. Vorzugsweise sind dies neben dem Bakterium *Escherichia coli*, eine *Aspergillus*-Zelle oder eine *Spodoptera frugiperda*-Zelle [Lentzen et al., 1998]. Bei einem pH-Wert von 7 – 9 ist das rMLI stabil. Für rMLI zeigt sich eine einheitliche Mobilität in der IEF, während sich für das MLI Protein aufgrund einer Vielzahl von Molekülvarianten eine Heterogenität ergibt [Eck et al., 1999_{a,b}; Lentzen et al., 1998].

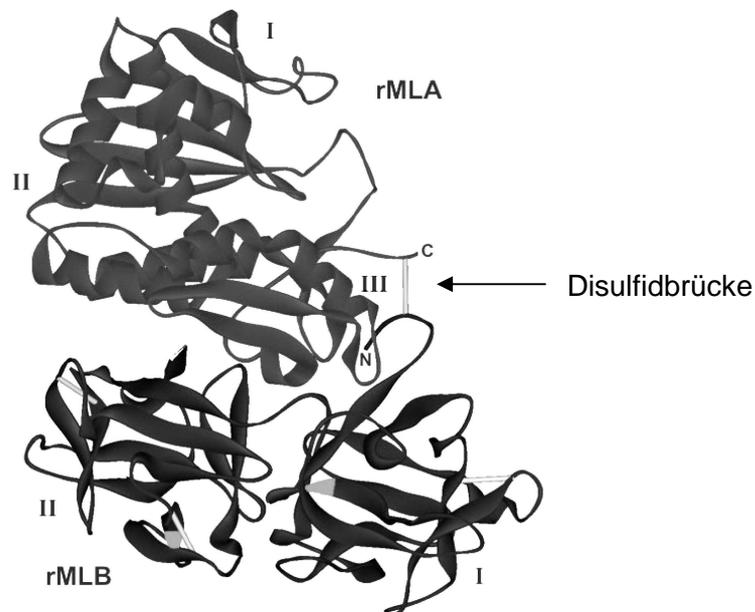


Abb. 1.24: Struktur des rekombinanten Mistellektins I; I-III: Domänen der Monomere; C: Carbonsäure-Ende, N: Amino-Ende [Baars-Hibbe, 2007].

1.7 Entwicklung der Biosensoren

Über die letzten 20 Jahre ist das Interesse an Biosensoren für Anwendungen in der Umwelt [Rogers, 1995], der Medizin [Wilkins und Atanasov, 1996] und der Toxikologie [Bousse, 1996] gestiegen. Für Ingenieure und Wissenschaftler, die an der Entwicklung der neuen Generation von Sensoren beteiligt waren, gab es zwei faszinierende Eigenschaften an Biosensoren:

1. Biosensor-Erkennungselemente haben eine natürlich entwickelte Selektivität zu biologisch oder biologisch aktiven Analyten.
2. Biosensoren haben die Fähigkeit, auf physiologische Art und Weise mit dem Analyten zu interagieren.

Mit Biosensoren besteht die Möglichkeit, Bioanalyten mit einer hohen Empfindlichkeit schnell und kostengünstig zu untersuchen. Das Hauptproblem, warum die Technologie der Biosensoren keine weitverbreitete Akzeptanz fand, war die Stabilität und die Reproduzierbarkeit [Meusel und Vering, 1998]. Eine wünschenswerte Eigenschaft eines Biosensors ist das kontinuierliche Monitoring und die Mehrfachverwendung mit einem Minimum an Regeneration. Weitere Eigenschaften sind kurzes Ansprechverhalten (kurze response Zeit), Automatisierung und Miniaturisierung des Gerätes [Paddle, 1996].

1.7.1 Warum Ganzzellbiosensoren?

Die anfängliche Frage, die gestellt werden muss ist: Warum sollen ganze Zellen in einem Messsystem genutzt werden? Es gibt viele mögliche Komplikationen, die mit dem Gebrauch von ganzen Zellen verbunden sein können. Zum einen verlangt es gutes Wissen über die Mikrobiologie und die Zellkultur der zu verwendenden Zellen, zum anderen ist die Lebensdauer von Zellen wesentlich kürzer als von Enzymen. Und doch gibt es einige zwingende Beweggründe, die es sehr attraktiv machen, um mit lebenden Zellen zu arbeiten.

Der erste und wichtigste ist, dass nur unter Verwendung einer lebenden Komponente funktionale Informationen erhalten werden können, zum Beispiel Informationen über den Effekt eines Stimulus auf ein lebendes System. Diese Information kann analytischen Informationen gegenübergestellt werden, um die Frage zu beantworten, wieviel einer gegebenen Substanz vorliegt. In vielen Fällen wird eine funktionale Information gefordert; jedoch erbringen analytische Tests nur Abschätzungen der funktionalen Folgen der untersuchten Substanzen. In diesen Fällen ist eine Messmethode mit einem lebenden System besonders vorteilhaft, weil es direkt die funktionale Information erbringt.

Hier einige Fragestellungen bei denen ein funktionales Wissen erforderlich ist:

- Welchen Effekt haben Pharmaka auf das verwendete physiologische System?

- Wirkt die Substanz als Agonist oder Antagonist an einem bestimmten Rezeptor?

Dies ist eine zentrale Frage bei Wirkstoffentdeckungen, da ein großer Anteil der Pharmazeutika Agonisten bzw. Antagonisten an zellulären Rezeptoren darstellen.

- Wirkt die Substanz toxisch auf die Zellen?

Dies kann durch Monitoring von Bakterienzellen beantwortet werden. Jedoch werden auch immer mehr Säugetierzellen dafür benutzt [Broner et al., 1991; Bagley et al., 1992 und Catroux et al., 1993]. Der Vorteil von Säugetierzellen bzw. eukaryotischen Zellen ist im Allgemeinen die Tatsache, dass diese Zellen einen besseren Vertreter für die Toxizität gegenüber Menschen darstellen als bakterielle Zellen.

Der zweite Grund lebende Komponenten zu benutzen liegt darin, analytische Informationen qualitativer und quantitativer Natur zu erhalten. Im einfachsten Fall erhält man eine Aussage darüber, mit welcher Konzentration eine gegebene Substanz vorliegt. Zellen mit einem bestimmten Rezeptortyp können als „Agonisten-Sensor“ betrachtet werden mit einer Empfindlichkeit, die durch die Bindungskonstante des Rezeptor-Liganden-Komplexes bestimmt wird [Bousse et al., 1994 und Shear et al., 1995]. Ein weiterer Bereich der Biosensorik nutzt genetisch veränderte Bakterien, um das Ansprechverhalten auf spezifische Substanzen zu beobachten. Mit Hilfe der amperometrischen Detektion ist es möglich, Herbizide [Rawson et al., 1989], Benzol [Tan et al., 1994], Alkohol [Kitagawa et al., 1987] und Trimethylamingas zu erfassen.

Ein weiterer Vorteil für den Gebrauch von lebenden Zellen besteht darin, dass statt der Messung der freien Form, die Messung der Gesamtbioverfügbarkeit eines Schadstoffes möglich ist [Lelie et al., 1994; Heitzer et al., 1994 und Selifonova et al., 1993]. Ein Biolumineszenz-Bakterien-Detektor, der spezifisch für Kupfer ist, kann auch unlösliches Kupfersulfid erfassen [Lelie et al., 1994]. Das bedeutet, dass die analytische Fragestellung tatsächlich eine funktionale bekommt, und zwar wie bioverfügbar eine gegebene Substanz ist.

1.7.2 Wie können Informationen von Zellen erhalten werden?

Die nächste Frage, die sich stellt, ist: Wie überwache ich den Zustand der Zellen um Informationen daraus zu gewinnen?

Hier soll auf die Gruppe der Messsysteme eingegangen werden, die den Energiemetabolismus der Zellen nutzen. Dieser ist Grundlage für alle Zellen und stellt eine empfindliche Messmethode für einen großen Bereich von zellulären Ereignissen dar [Owicki und Parce, 1992]. Eine sichtbare Auswirkung auf den Energieverbrauch der Zellen wird immer zu verzeichnen sein, egal ob es sich um Zellwachstum, Toxizität oder um das Ansprechen auf Neurotransmitter oder Wachstum handelt.

Dieser Energiemetabolismus kann auf verschiedene Weise detektiert werden:

- Messung des Sauerstoffverbrauchs und der CO₂ Produktion. Die Verwendung einer Sauerstoffelektrode mit einer Bakterienmembran ist mehrfach in der Literatur beschrieben [Karube et al., 1989; Tan et al., 1994 und Li et al., 1994], teilweise in Verbindung mit der Mikrokolorimetrie [Backman und Wadsö, 1991].
- Messung des Redoxpotentials: Dies wurde zur Messung der bakteriellen Atmung verwendet [Rawson et al., 1989; Gaisford et al., 1991 und Richardson et al., 1991].
- Messung der Laktatproduktion: Dies ist eine Methode zur Erfassung des glykolytischen Metabolismus und fokussiert auf in vivo und klinische Anwendungen.
- Mikrokolorimetrie ist ebenfalls eine übliche Methode zur Bestimmung des Metabolismus.
- Messung des pH-Wertes: Der Gebrauch eines schnellen und rauscharmen pH-Sensors, dem lichtadressierbaren potentiometrischen Sensor (LAPS), wurde von Hafeman et al. (1988) eingeführt. Die Vorteile sind durch Owicki et al. 1994 beschrieben worden. Unter Verwendung des pH-Wertes als metabolischen Indikator werden sowohl der glykolytische Metabolismus als auch die Atmung der Zellen erfasst.

Die Messung des Metabolismus mit einer der beschriebenen Methoden benötigt in jedem Fall Zellen, die durch eine Kammer oder Membran abgegrenzt sind. Im Fall von eukaryotischen Zellen muß das Nährmedium regelmäßig gewechselt werden, um die Zellen am Leben zu erhalten. Es bestehen prinzipiell zwei mögliche Arbeitsmethoden:

1. Es wird mit einem langsamen konstanten Fluss gearbeitet.
2. Es wird die Start-Stopp Methode verwendet.

Es werden durch kontinuierliche Messung, die durch den Metabolismus hervorgerufenen chemischen Veränderungen erfasst. Die erste Methode ist sehr empfindlich gegenüber Fluktuationen in der Flussrate, die zweite gibt verlässliche Hinweise über die metabolische Rate in der Stopp-Phase. Jedoch ist die Zeitauflösung begrenzt durch die Gesamtzeit für einen Zyklus und hängt stark von der Empfindlichkeit des Detektors ab. Die Zeitauflösung ist ein bedeutender Vorteil des LAPS Sensors, der ein Rauschen im Bereich von 20 µV aufweist und genaue Messungen der Raten der pH-Wertänderung in weniger als 10 Sekunden ermöglicht.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten als wesentliches Ziel die Übertragbarkeit zellbasierter Testsysteme auf die Messplattform eines verbesserten lichtadressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS) haben. Der lichtadressierbare potentiometrische Sensor (LAPS) gehört zu den halbleiterbasierten Sensoren. Er hat neben einem einfachen Sensoraufbau den Vorteil der messtechnischen Erfassung eines orts- und konzentrationsabhängigen Sensorsignals in Form eines Photostroms. Dafür wird die Sensor-Struktur lokal begrenzt mit einer Lichtquelle angeregt; Form und Größe des Lichtpunkts definieren den Messspot, durch den ein, von der Analytenkonzentration abhängiger, Photostrom erzeugt wird. Durch Änderung der Position der Lichtquelle kann an verschiedenen Messspots auf der LAPS-Struktur die Konzentration des Analyten lokal erfasst werden.

Zunächst sollten verschiedene Modellapplikationen auf der Technologie-Plattform der Surface Plasmon Resonance (SPR) etabliert werden. Das Plasmonic[®] SPR-Gerät nutzt das bekannte Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz, arbeitet jedoch zur Plasmonanregung mit einer defokussiven Optik. Diese verwendet zur Einstrahlung des Lichtes verschiedener Einstrahlwinkel nicht nur einen Punkt eines goldbeschichteten Glasträgers, sondern verschiedene Stellen.

Um ein erstes Verständnis über das Verhalten von eukaryotischen Zellen auf der SPR-Plattform zu erlangen, sollten Krebszellen auf Zuckeroberflächen charakterisiert werden. Basis dafür sind selbstorganisierende Zucker-Lektin Bindungen. Über diese können einerseits Glykoproteine [Keusgen, 1999], andererseits aber auch Zellen effizient immobilisiert werden [Keusgen et al., 2003]. Um dies zu erreichen, sollte auf der Goldoberfläche des SPR-Sensors ein Zucker-Lektin-Sandwich erzeugt werden, um ganze, lebende Zellen zu immobilisieren. Dabei erfolgt die Immobilisierung der Zellen über die Glykostrukturen an der Außenseite der Zellmembran. Eine direkte Immobilisierung der Zellen über Glykoproteinstrukturen der Zellmembran auf der Zuckeroberfläche sollte ebenfalls untersucht werden. Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens dienen NCI-H125- sowie Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC).

Um ein geeignetes Zucker-Lektin-System festlegen zu können, wurde zunächst ein Lektin-Screening unter Zuhilfenahme der SPR durchgeführt. Hierzu wurde das Bindungsverhalten verschiedener Lektine zu unterschiedlich kohlenhydratbeschichteten Goldoberflächen des SPR-Sensors untersucht.

Im Hinblick auf Mistellektinbestimmungen in Fertigarzneimitteln sollte zusätzlich ein Testsystem für Mistellektin I (MLI) auf der SPR-Technologie-Plattform etabliert werden. Klinisch relevante Untersuchungen zur immunmodulatorischen Potenz von Mistelextrakten [Beuth et al., 1992; Hajto et al., 1989] beziehen ihre Aussagen auf das MLI, das als isolierte Standardsubstanz eingesetzt wird. Daraus wurde ein Krebs-Therapiekonzept mit Mistelextrakten abgeleitet, das auf diesen experimentellen Dosis-Wirkungsbeziehungen des gereinigten MLI basiert [Beuth et al., 1993;

Hajto et al., 1990]. Voraussetzung dafür ist die differenzierte Erfassung des Gehaltes an MLI, MLII und MLIII in therapeutisch angewendeten Mistelextrakten. Die Anwendung von polyklonalen Mistellektin-spezifischen Antikörperpräparationen zur Bestimmung der Mistellektine in Mistelextrakten mit dem Enzym-Immuno-Assay [Ziska und Franz, 1985] bzw. mit einem Lektinbindungs-Enzym-Immuno-Assay [Vang et al., 1986] haben diese Forderung nicht erfüllt.

In einem Zwei-Seiten-Bindungsassay sollten die zwei monoklonalen Anti-MLI-Antikörper, welche bevorzugt mit der A-Kette des MLI reagieren und an unterschiedliche Epitope binden, wechselseitig als Fänger- und Detektionsantikörper eingesetzt werden.

Der Schichtdickenabbau eines bioabbaubaren Polymers (Polyethylencarbonat, PEC) sollte durch murine Makrophagen der Zelllinie J774A.1 visualisiert werden. PEC wird nicht enzymatisch, sondern radikalisch über Superoxidradikalanionen ($O_2^- \cdot$), welche durch Makrophagen produziert werden, abgebaut. Die Visualisierung des Abbaus sollte in Abhängigkeit von der Zeit, der Zellzahl und von Triggerfaktoren erfolgen. Als Trigger sollten Concanavalin A und Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella typhimurium* bzw. *Escherichia coli* eingesetzt werden. Durch das Triggern werden die Makrophagen stimuliert, dass heißt der Abbau des Polymers wird beschleunigt. Bei LPS handelt es sich um das Oberflächenantigen der Bakterienmembran Gram negativer Bakterien.

Um dem natürlichen Triggermodus (lebende Gram negative Bakterien) nahezukommen, sollten die Makrophagen mit „künstlichen Bakterien“ getriggert werden. Zu diesem Zweck sollte ein Bakterienmembranmodell auf Basis von Liposomen etabliert werden, welches die äußere Membran Gram negativer Bakterien simuliert. Dabei wird das LPS aus *Legionella pneumophila* bzw. *Salmonella typhimurium* in die Membranen von Liposomen inkorporiert und mittels SPR jeweils durch den spezifischen Antikörper detektiert. Ein solches Bakterienmembranmodell hat folgende Vorteile: Keine Verwendung von lebenden Bakterien, der Fokus ist nur auf einen bestimmten Teil der Zelloberfläche gerichtet; in diesem Fall auf das LPS. Interaktionen zwischen LPS und dem spezifischen Antikörper können ohne störende Einflüsse anderer Oberflächenantigenstrukturen untersucht werden.

Eine weitere Form des Triggers der murinen Makrophagen sollte mit LPS modifizierten Magnetic Beads auf der LAPS Messplattform erfolgen. Um die Auswirkung des Triggers auf die metabolische Aktivität der Makrophagen nachzuvollziehen, sollten die Magnetic Beads mit Hilfe eines Magneten über den Sensor gezogen werden. Der dabei entstehende pH-Gradient sollte gemessen werden.

Zusammenfassend lässt sich die Arbeit in folgende Bereiche einteilen:

- Entwicklung eines Lektin-Screenings als Basis für die Untersuchungen des Bindungsverhaltens von Krebszellen auf der SPR-Plattform. Außerdem die Entwicklung eines Mistellektin-Assays.

-
- Bioabbaubarkeitsstudie von Polyethylencarbonat (PEC), insbesondere der reale Schichtdickenabbau des Polymers durch murine Makrophagen. Auswirkungen von Triggerfaktoren auf die Abbaugeschwindigkeit des Polymers. Entwicklung und Funktionalisierung „künstlicher Bakterien“ als weitere Möglichkeit der Makrophagenstimulation.
 - Metabolische Aktivitätsmessung von getriggerten Makrophagen auf der LAPS Messplattform. Trigger sind LPS modifizierte Magnetic Beads.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Die Chemikalien, die für die Versuchsvorbereitung und –durchführung verwendet wurden, sind in Tab. 2.1 und Tab. 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle

Chemikalie	Bezugsquelle
3-Aminopropyltriethoxysilan, purum D(+)-Biotin-NHS, ≥95% 1,4-Butandiol diglycidylether Dimethylsulfoxid, puriss. N-Hydroxysuccinimid (NHS), purum Natriumacetat, wasserfrei, puriss. p.a. Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, puriss. p.a. Natriumtetraborat-Decahydrat, puriss.p.a. Natriumborhydrid, purum p.a. Octadecyltrimethoxysilan, techn.	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumcarbonat, wasserfrei, reinst	KMF, Bonn
Aceton, SupraSolv Acetonitril, hypergrade für LC-MS LiChrosolv® N,N-Dimethylformamid, SupraSolv Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst 1,4-Dioxan Dichlormethan für die Gaschromatographie SupraSolv® Ethanol für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® Magnetic Beads BM 0,86, streptavidinbeschichtet (Estapor®) Methanol für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® Natriumchlorid, p.a. Salzsäure, 32%, p.a. Schwefelsäure, 95-97%, p.a. Toluol, SupraSolv Wasser, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Polyethylencarbonat (PEC)	Novartis, Basel (Schweiz)
Kaliumhydroxyd, puriss. Salpetersäure, 65%	Riedel-de Haen, Buchs (Schweiz)
(±)-3-Hydroxydecansäure ≥98% (±)-3-Hydroxydodecansäure ≥98% (±)-3-Hydroxyhexadecansäure ≥98% (±)-3-Hydroxytetradecansäure ≥98% Bronidox L, >99% Cholesterol, ≥99% DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) DMPG (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phospho-rac-(1-Glycerol) Natriumsalz), ≥98.0% PMB (Polymyxin B Sulfat) PMBN (Polymyxin B Nonapeptid Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 2.2: Verwendete Biochemikalien und deren Bezugsquelle

Biochemikalie	Bezugsquelle
rabbit anti- <i>salmonella</i> sp., IgG Fraktion, polyklonaler Antikörper, SAL 007-82026	Capricorn Products, Scarborough (USA)
Concanavalin A aus <i>Canavalia ensiformis</i> , Type V Fucoidan aus <i>Fucus vesiculosus</i> Hyaluronsäure (Na-Salz) aus <i>Streptococcus equi</i> sp. Maisstärke Mannan aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-Acetyl-D-Galactosamin Lektin aus <i>Helix pomatia</i> Lektin aus <i>Lens culinaris</i> Lektin aus <i>Triticum vulgare</i> Lektin aus <i>Ulex europaeus</i> (UEA I) Lektin aus <i>Viscum album</i> (I)	Fluka, Buchs (Schweiz)
BSA (Albumin fraction V)	Merck KGaA, Darmstadt
MLI spezifische monoklonale Antikörper MNA4 und MNA9 rekombinantes Mistellektin I (MLI)	Probiogen, Berlin
Streptavidin, SA 10	ProZyme, San Leandro (USA)
MLI spezifische monoklonale Antikörper 5F5 und 5H8 rekombinantes Mistellektin I (MLI)	Sifin, Berlin
Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella enterica</i> Serotyp typhimurium Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Legionella pneumophila</i> -spezifischer monoklonaler Antikörper, LP-F-003 <i>Legionella pneumophila</i> -Lysat	Strecker Diagnostica, Witten

Das Wasser für die Versuchsansätze wurde mit der Purelab plus Anlage der Firma Millipore (Eschborn) entmineralisiert.

2.1.2 Zelllinien

Für die Zellversuche wurden die in Tab. 2.3 aufgeführten Zelllinien verwendet.

Tab. 2.3: Verwendete Zelllinien und deren Bezugsquelle

Zelllinie	Bezugsquelle
LLC1 (Lewis Lung Carcinom Zellen) NCI-H 125 (Adenokarzinom) J774A.1 (Mausmakrophagen)	ATCC, (USA)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.4: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Boratpuffer 0,2 M pH 10,0	Natriumtetraborat-Decahydrat 76,27g	zu 1,0 l H ₂ O lösen, pH 10,0 mit Natronlauge einstellen, sterilfiltrieren
Carbonat-/Hydrogen- carbonatpuffer 0,1 M, pH 8,6	Natriumhydrogencarbonat 8,4g	zu 1,0 l H ₂ O lösen, pH 8,6 mit 0,1 M Natriumcarbonatlg. einstellen, sterilfiltrieren
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	DMEM Pulver 13,38g 4mM L-Glutamin 0,58g 1mM Natriumpyruvat 0,11g Natriumbicarbonat 1,5g Glucose 4,5g	Pulver und weitere Substanzen zu 1,0 l mit bidestilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FKS	DMEM Pulver 13,38g 4mM L-Glutamin 0,58g 1mM Natriumpyruvat 0,11g Natriumbicarbonat 1,5g Glucose 4,5g FKS 100g	Pulver und weitere Substanzen zu 1,0 l mit bidestilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren
RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute)	RPMI Pulver 10,43g 2mM L-Glutamin 0,29g Natriumbicarbonat 1,5g Glucose 4,5g 10mM HEPES 2,38g 1mM Natriumpyruvat 0,11g FKS 10g	Pulver und weitere Substanzen zu 1,0 l mit bidestilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren
Galctose, 50 mM	Galactose 9,0g	zu 1,0 l mit PBS Puffer pH 7,3 lösen, vortexen, sterilfiltrieren
PBS-Puffer pH 7,3 mit 0,5% Bronidox	Natriumchlorid 7,0g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 4,27g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,94g Bronidox L 5g	in 1,0 l H ₂ O lösen, pH 7,3 mit Natronlauge einstellen, sterilfiltrieren
PBS-Puffer pH 7,3 mit 0,12% Bronidox	Natriumchlorid 7,0g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 4,27g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,94g Bronidox L 1,2g	in 1,0 l H ₂ O lösen, pH 7,3 mit Natronlauge einstellen, sterilfiltrieren

Die Kalibrierung des pH-Meters erfolgte mit den Pufferlösungen pH 4,01, 7,00 und 10,00 der Firma Merck (Darmstadt).

2.1.4 Geräte und Materialien

Tab. 2.5: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Amicon Ultra tubes	Millipore, USA
Analysenwaage CP225D-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage H11W	Mettler, Giessen
Biofuge pico	Kendro, Langenselbold
CO ₂ Inkubator Thermo Class 100	Thermo Waltham, MA, USA
Einmalküvetten für die SPR	Plasmonic Biosensor AG, Wallenfels
FPLC Anlage	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
goldbeschichtete Prismen für die SPR	Plasmonic Biosensor AG, Wallenfels
HPLC Säule: Nucleodur C18-Pyramid RP Säule (2 x 250 mm, 4mm)	Macherey-Nagel, Düren
HPLC-MS: Shimadzu LC 20 HPLC System, QTrap 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems) mit ESI und APCI Ionenquelle	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg Applied Biosystems, USA
Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids Inc.(USA)
PD 10 Säule, Sephadex G-25M	Amersahm Biosciences, Uppsala (Schweden)
pH-Meter CG 701	Schott, Mainz
Pumpschlauch 2-Stopp Tygon2075	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-4100	Hitachi, Krefeld
Rasterkraftmikroskop NanoWizard	JPK Instruments AG, Berlin
Röhrchen aus PP, 14 und 50 ml mit Schraubverschluß	Greiner, Nürtingen
Schlauchpumpe MC-MS CA418	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spektralphasen-Interferometer (SPI)	General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moskow (Russland)
Spektrometer, Uvikon 810	Kontron, Trappes (Frankreich)
Spin Coater	LOT Oriel
SPR-Gerät Plasmonic	Plasmonic Biosensor AG, Wallenfels
Sterilfilter, 0,2µm und 0,45µm	Schleicher und Schuell, Dassel
Trockenschrank T6030	Heraeus, Hanau
Tubo-O-Dialyzer	G-Biosciences, St.Louis (USA)
Ultraschallbad Bransonic 12 Typ B16	PCE-Group oHG, Meschede
Vakuumpumpe	KNF Neuberger Laboport, Freiburg
Variomag Electronicrührer Poly 15	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	Janke + Kunkel, Staufen
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Herrenberg

Für die Quantifizierungsversuche des LPS in Liposomen wurden pyrogenfreie Materialien eingesetzt. Pyrogenfreiheit wurde durch Erhitzen auf 300 °C für 4 Stunden erreicht.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung biosensitiver Schichten

2.2.1.1 Vorbereitung der Prismen

Reinigung der Goldprismen

Die Reinigung der Goldprismen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden sie 5 Minuten in Aceton (10 ml pro Goldprisma) bei 300 U/min auf dem Schüttler vorgereinigt. Im zweiten Schritt erfolgte der Hauptreinigungsschritt, bei dem die Prismen für 20 min bei 60 – 65 °C in einer Lösung aus 0,1 M Kaliumhydroxid und Wasserstoffperoxid (30 %) im Verhältnis 1:1 (V/V) gereinigt wurden. Im Anschluss wurde für 60 s dreimal mit je 20 ml Millipore® - Wasser, dreimal mit je 20 ml Methanol und zum Schluss drei weitere Male mit je 20 ml Toluol unter Schütteln gereinigt.

Die Goldprismen wurden ungetrocknet zur Beschichtung eingesetzt.

2.2.1.2 Erzeugung einer Aminooberfläche

Zur Aminofunktionalisierung wurden die gereinigten Goldprismen sechs Stunden lang in einer Lösung aus 1 Massenprozent 3-Aminopropyltriethoxysilan in Toluol (10 ml/Goldprisma) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300 U/min) aminosilanisiert. Anschließend wurde dreimal mit je 20 ml Toluol für 60 s unter Schütteln gespült und, abhängig von der weiteren Beschichtungsstrategie, mit weiteren Lösungsmitteln bzw. Millipore® - Wasser gespült.

Die aminosilanisierten Prismen wurden zur weiteren Beschichtung wiederum ungetrocknet verwendet.

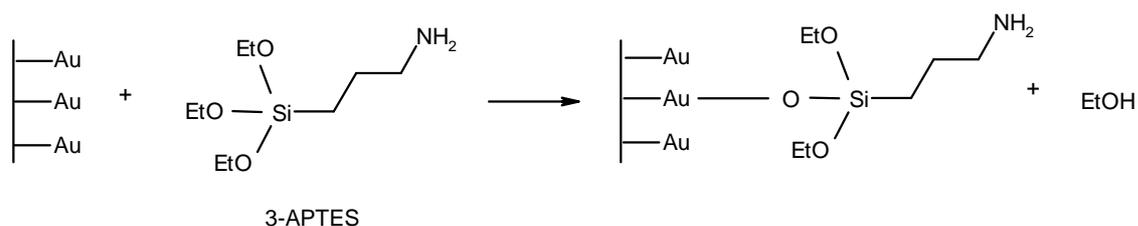


Abb. 2.25: Aminosilanisieren einer Goldoberfläche mit 3-APTES.

2.2.1.3 Biotinylierung

Zur Biotinylierung wurden die aminosilanisierten, ungetrockneten Goldprismen zunächst mit DMF gespült. Im Anschluss daran wurden sie in einer Lösung von D(+)-Biotin-NHS in DMF (c=1 mg/ml, 10 ml pro Goldprisma) zwölf Stunden bei RT auf einem Schüttler (300 U/min) inkubiert. Danach wurde mit DMF, dann mit Millipore® - Wasser gespült. Die so behandelten Träger wurden einer Vakuumtrocknung unterzogen, direkt zur Messung eingesetzt oder im Exsikkator gelagert und später

verwendet. Alle Spülprozesse wurden durch dreimaliges Inkubieren in je 20 ml des jeweiligen Lösungsmittels durchgeführt.

2.2.1.4 Kohlenhydratbeschichtungen

Die Abb. 2.26 zeigt schematisch den Aufbau eines kohlenhydratbeschichteten Goldprismas.

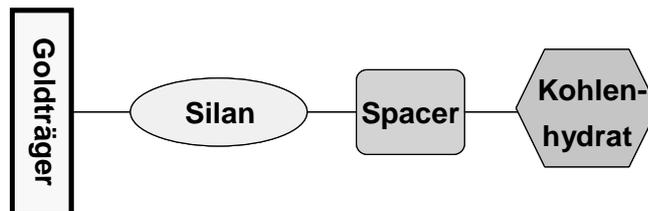


Abb. 2.26: Schema des Schichtaufbaus eines kohlenhydratbeschichteten Goldprismas.

Zur Beschichtung der Goldprismen wurden folgende Kohlenhydrate verwendet:

Stärke

Stärke besteht aus unverzweigter Amylose und aus verzweigtem Amylopektin. Amylose ist linear aus Glucosemolekülen aufgebaut, die α -1 \rightarrow 4 glykosidisch verknüpft sind. Amylopektin besitzt außer den α -1 \rightarrow 4-glykosidischen noch α -1 \rightarrow 6-glykosidische Bindungen und ist daher verzweigt (Abb. 2.27).

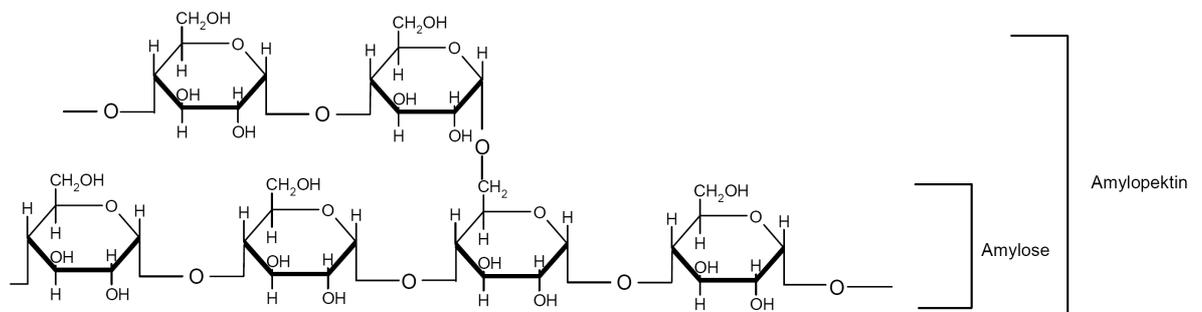


Abb. 2.27: Chemische Struktur von Stärke.

Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae*

Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* besteht im Wesentlichen aus α -Mannose-Einheiten, die 1 \rightarrow 6-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Verzweigungen ergeben sich hier durch α -1 \rightarrow 2 und α -1 \rightarrow 3-glykosidische Bindungen zwischen Mannosemolekülen (Abb. 2.28) [Antalis et al., 1973].

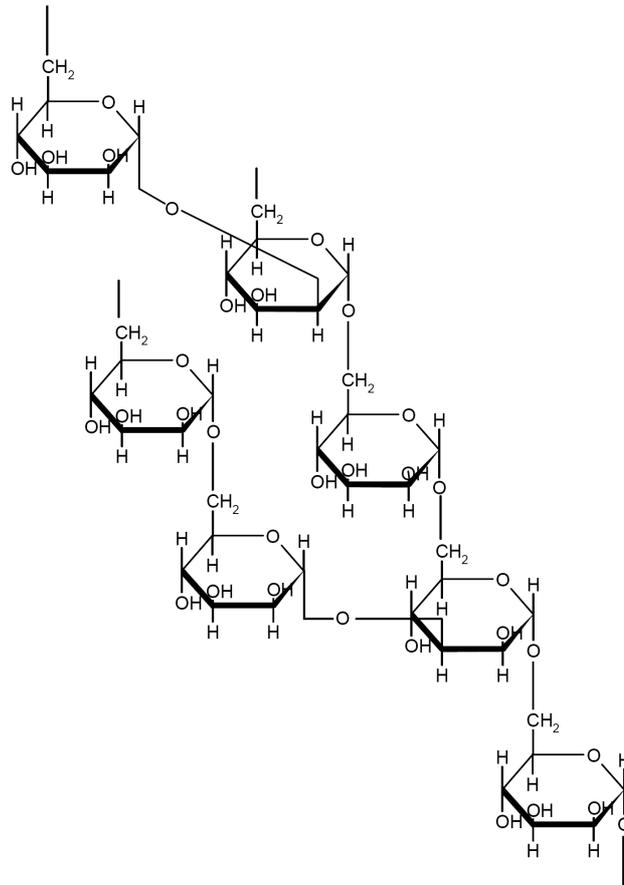


Abb. 2.28: Chemische Struktur von Mannan.

Fucoidan aus *Fucus vesiculosus*

Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* ist ein sulfatiertes Polysaccharid mit verzweigter Struktur. Es besteht hauptsächlich aus α -L-Fucose und sulfatierter α -L-Fucose, die 1 \rightarrow 3 miteinander verbunden sind (Abb. 2.29). Eine Verzweigung erfolgt an jedem dritten Fucosemolekül am C2-Atom. Fucoidan enthält Spuren von Glucuronsäure, Galactose, Mannose und Xylose [Beitze-Breyhan, 2000].

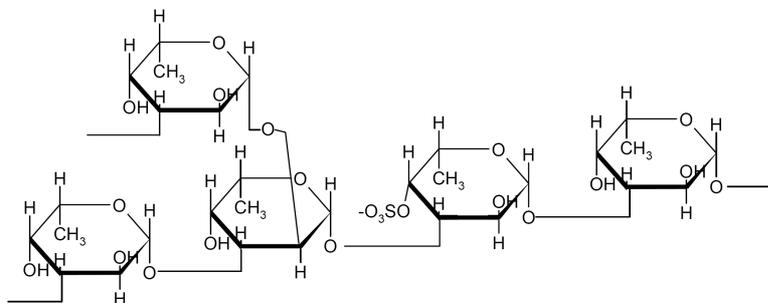


Abb. 2.29: Chemische Struktur von Fucoidan.

N-Acetyl-D-Galactosamin

N-Acetyl-D-Galactosamin ist ein Baustein von Glykolipiden und –proteinen sowie von Knorpel, Bindegewebe und Sehnen.

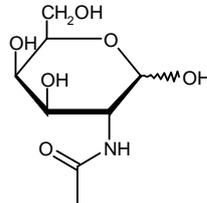


Abb. 2.30: Chemische Struktur von N-Acetyl-D-Galactosamin.

Hyaluronsäure aus *Streptococcus equi*

Hyaluronsäure aus *Streptococcus equi* gehört zur Gruppe der Glykosaminoglykane, d.h. die Grundbausteine sind Disaccharideinheiten aus Glucuronsäure und einem Aminozucker. Der Aminozucker ist bei der Hyaluronsäure das N-Acetyl- β -D-Glucosamin, welches 1 \rightarrow 3-glykosidisch mit der D-Glucuronsäure verknüpft ist. Es handelt sich also um ein lineares Molekül (Abb. 2.31).

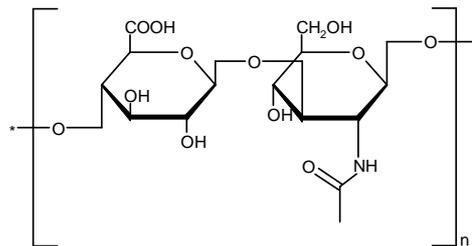


Abb. 2.31: Chemische Struktur von Hyaluronsäure.

Die Beschichtung erfolgte bei allen Kohlenhydraten in analoger Weise. Unterschiede gab es lediglich in den eingesetzten Konzentrationen und bei den Inkubationszeiten und –temperaturen (Tab. 2.6).

Fucoidan wurde zur Erhöhung der Löslichkeit leicht erwärmt, während Stärke bei ca. 70 °C verkleistert wurde.

Tab. 2.6: Konzentrationen, Inkubationszeiten und Temperaturen der zur Beschichtung eingesetzten Kohlenhydrate.

Kohlenhydrat	Konzentration [mg/ml]	Inkubationszeit [h]	Temperatur [°C]
Stärke	2	24	4
Mannan	5	24	RT
Fucoidan	1,5	24	4
Hyaluronsäure	5	24	RT
N-Acetyl-D-Galactosamin	5	24	RT

Ausgangspunkt waren die ungetrockneten, aminosilanisierten Goldprismen. Zunächst wurde über die Aminogruppe der Prismen das bifunktionale Epoxid 1,4-Butandiolglycidylether (BDDG) als Spacer eingeführt (Abb. 2.32). Vorbereitend wurde nach dem Spülen mit Toluol erst mit Methanol und anschließend mit Millipore®-Wasser gespült (jeweils dreimal mit je 20 ml). Anschließend erfolgte die Kupplung des Spacers unter reduktiven Bedingungen. Die aminofunktionalisierten Goldprismen wurden 12 h in 10 ml einer Lösung von BDDG (3 ml / 10 ml Boratpuffer) und Natriumborhydrit ($c_{\text{NaBH}_4} = 6 \text{ mg/ml}$) in 0,2 M Natriumtetraboratpuffer pH 10,0 bei RT unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit je 20 ml Millipore® - Wasser gereinigt. Im folgenden Schritt erfolgte die Veretherung der freien Epoxidgruppe mit der Kohlenhydratkomponente (Abb. 2.32). Dazu wurden die Prismen in 10 ml einer Lösung des jeweiligen Kohlenhydrats in 0,2 M Natriumtetraboratpuffer pH 10,0 unter Schütteln (300 U/min) inkubiert.

Nach der Kupplung der Kohlenhydratkomponente wurden die Goldprismen dreimal mit je 20 ml Millipore® - Wasser gespült und anschließend einer Vakuumtrocknung unterzogen. Die so behandelten Prismen konnten direkt zur Messung eingesetzt oder im Exsikkator gelagert werden.

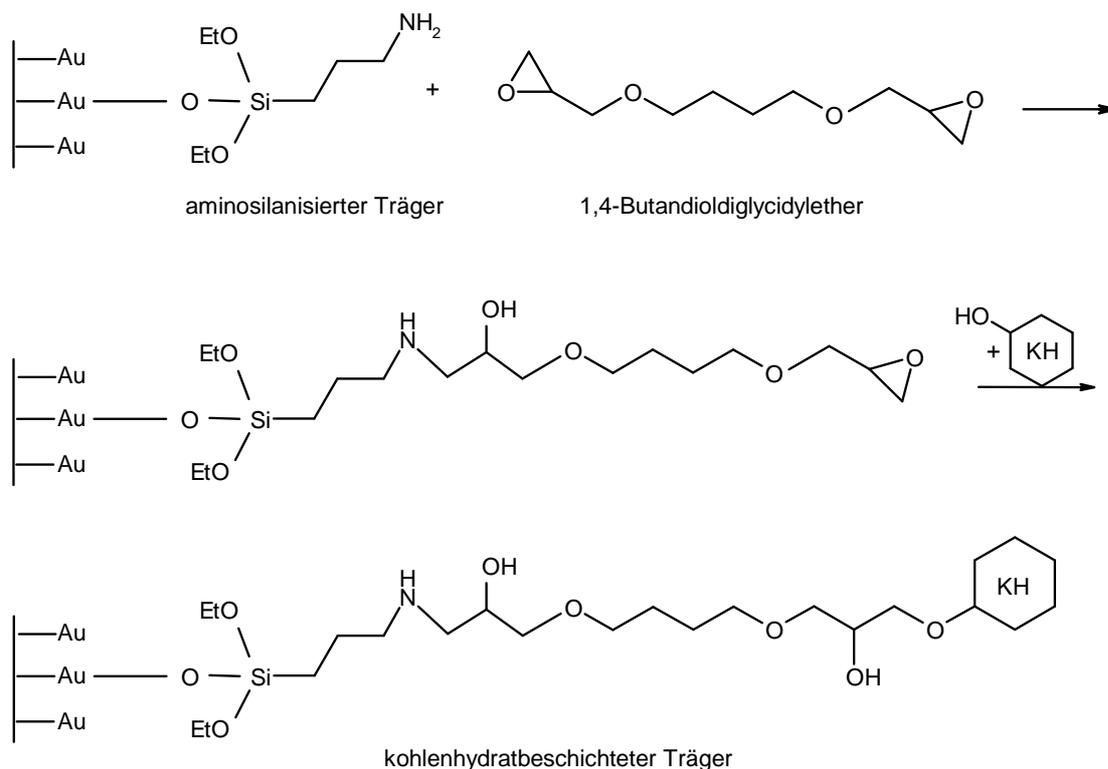


Abb. 2.32: Oberflächenchemie während der Kohlenhydratbeschichtung (KH=Kohlenhydrat).

2.2.1.5 Alkylierung

Ausgangspunkt der Alkylierung waren die gereinigten, ungetrockneten Goldprismen. Die mit Toluol gespülten Prismen wurden 6 h bei RT in 10 ml einer Lösung von 1 % (m/m) Octadecyltrimethoxysilan in Toluol unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Im Anschluss an diese Behandlung erfolgten Spülschritte mit Toluol, Methanol und zuletzt mit Millipore® - Wasser. Dazu wurden die Prismen nacheinander in jeweils drei mit 20 ml Toluol, 20 ml Methanol und zum Schluss in drei mit 20 ml Millipore® - Wasser gefüllten Bechergläsern für jeweils 60 s unter Schütteln gewaschen. Während des Spülens mit Millipore® - Wasser wurde die Benetzbarkeit der Oberfläche visuell geprüft. Das gesamte Prisma musste hydrophob sein, andernfalls wurde es verworfen. Nach einer Vakuumtrocknung konnten die octadecylsilanisierten Goldprismen verwendet oder im Exsikkator gelagert werden.

2.2.2 Modifizierung von Biomolekülen

2.2.2.1 Biotinylierung mittels einer Aminogruppe des Antikörpers

Zunächst erfolgte ein Austausch des Antikörperpuffers gegen den Biotinylierungspuffer. Dazu wurde ein Tube-O-Dialyzer™ kurz mit Millipore® Wasser gespült. Die Dialysierkappe wurde mit 1-2 ml 0,1 M Carbonat-/Hydrogencarbonatpuffer pH 8,6 gewässert. Es wurde so lange gewartet, bis der Puffer fast komplett durch die Membran gesickert war. Bis zum Gebrauch musste darauf geachtet werden, dass die Dialysiermembran feucht gehalten wurde und nicht austrocknet. Ein Austrocknen der Membran führt zu einem Funktionsverlust und ein Austauschen der Dialysiermembrankappe müsste vorgenommen werden. Direkt vor der Benutzung wurde der Überschuss an Puffer vorsichtig mit einer Pipette von der Membran genommen. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die Membran nicht berührt und evtl. zerstört wurde. Die Probe (1 ml Antikörperlösung) wurde dann in den Tube-O-Dialyzer™ gegeben und mit der Membrankappe dicht verschlossen. Der Tube-O-Dialyzer™ wurde umgedreht, so dass sich das Volumen der Probe auf der Dialysiermembran befand. Falls die Probe relativ viskos war, wurde das Dialysierröhrchen für 5-6 Sekunden (mit der Membran nach unten zeigend) vorsichtig zwischen den Händen gerollt. Die Zeit des Rollens sollte nicht länger als angegeben sein, da ansonsten die Membran reißen kann. Der Tube-O-Dialyzer™ wurde mit einem Schwimmer versehen und für 18 Stunden bei 4 °C unter Rühren in einem Liter 0,1 M Carbonat-/Hydrogencarbonatpuffer pH 8,6 umgepuffert.

Danach wurde die eigentliche Biotinylierung durchgeführt. Dazu wurde die Antikörperlösung in ein PP-Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und bezogen auf die Antikörpermenge Biotinylierungsreagenz hinzugefügt. Dies waren 60 µl einer D(+)-Biotin-NHS-Lösung mit $c=0,9785$ mg/ml in DMSO bei einer Antikörpermenge von 1 mg. Die Inkubation mit dem Biotinylierungsreagenz erfolgte drei Stunden lang im Dunkeln bei RT unter Schütteln.

Anschließend wurde eine Aufreinigung mit einer PD-10 Fertigsäule (Sephadex G-25M) durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit PBS-Puffer (pH 7,3 und 0,12 % Bronidox L) konditioniert. Danach wurde die Antikörperlösung aufgegeben und der Ablauf verworfen. Der biotinylierte Antikörper konnte dann mit 3,5 ml PBS-Puffer (pH 7,3 und 0,12 % Bronidox L) eluiert werden. Um eine Antikörperkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten, wurden die 3,5 ml aus der PD-10 Säule in einem Amikon Tube aufkonzentriert. Eine Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch bei 280 nm nach Warburg und Christian durchgeführt [Warburg und Christian, 1942]. Abschließend wurde noch das Restvolumen zu 1 ml mit einer 20 %igen BSA Lösung aufgefüllt. Der so biotinylierte Antikörper konnte direkt verwendet oder bei 4 °C einige Wochen gelagert werden.

2.2.3 Assoziations- und Dissoziationskonstante nach Edwards und Leatherbarrow

Nach der Methode von Edwards und Leatherbarrow kann sowohl die Assoziationskonstante k_{ass} als auch die Dissoziationskonstante k_{diss} aus den experimentellen Bindungsdaten, die mit der Oberflächenplasmonresonanz erhalten werden, ermittelt werden [Edwards und Leatherbarrow, 1997]. Aus den beiden Konstanten kann dann der K_D -Wert nach der Gleichung 2.2 berechnet werden.

$$K_D = k_{diss} / k_{ass} \quad (2.2)$$

Zur Ermittlung der Assoziationskonstante werden die initialen Bindungsraten der zu vermessenden biomolekularen Interaktion bestimmt. Bei Auftragung der konzentrationsabhängigen initialen Bindungsraten gegen die zugehörige Konzentration des Liganden ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die Ausgleichsgerade enthält als Steigung das Produkt aus k_{ass} und der maximal möglichen Bindung R_{max} . Auch R_{max} kann experimentell ermittelt werden, wodurch die Assoziationskonstante k_{ass} aus der Steigung der Ausgleichsgerade berechnet werden kann. Bei der Bestimmung von R_{max} handelt es sich um eine Näherung; diese wird erreicht wenn eine Konzentrationserhöhung des Liganden zu keinem weiteren Anstieg des Messsignals führt. Zur Ermittlung der initialen Bindungsrate wurden die ersten fünf Sekunden der biomolekularen Interaktion herangezogen. Die Einheit der Initialrate ist AU/s, die der Konzentration des Liganden nM.

Assoziationskonstante

Zur Ermittlung der Assoziationskonstante (k_{ass}) wird die maximale Signaländerung (R_{max}) bestimmt. Die Berechnung erfolgte mit der Gleichung 2.3:

$$k_{ass} = \frac{m}{R_{max}} \quad (2.3)$$

m = Steigung der Ausgleichsgeraden, R_{max} = maximale Signaländerung

Dissoziationskonstante

Diese wird aus dem Abschnitt der Bindungskurve ermittelt, in dem der Ligand gegen Puffer ersetzt wird. Nach der Gleichung von Edwards und Leatherbarrow gilt

$$R_t = (R_0 - R_\infty)^{-k_{diss} * t} + R_\infty \quad (2.4)$$

R_t = Signal zum Zeitpunkt t , R_0 = Anfangssignal (Beginn der Dissoziation), R_∞ =Endsignal

Durch Umformen der Gleichung 2.4 erhält man Gleichung 2.5

$$-k_{diss} * t = \frac{\ln(R_t - R_\infty)}{(R_0 - R_\infty)} \quad (2.5)$$

Wird die Gleichung 2.5 nach k_{diss} umgestellt, folgt daraus Gleichung 2.6

$$k_{diss} = -\frac{\ln(R_t - R_\infty)}{(R_0 - R_\infty) * t} \quad (2.6)$$

Somit kann die Dissoziationskonstante k_{diss} zum Zeitpunkt t (Beginn der Dissoziation) mithilfe von Gleichung 2.6 berechnet werden. Als Endsignal R_∞ wurde der stabile Endwert des Messsignals nach mehrmaligem Spülen der Messküvette mit Puffer bestimmt.

2.2.4 Spektralphaseninterferenz (SPI)

Die Spektralphaseninterferenz gehört zur Gruppe der Reflektometrischen Interferenzsensoren. Hier dient, wie auch bei RIfS, die Interferenz des an Grenzflächen (teil)reflektierten Lichtes als Messsignal. Die SPI ermöglicht es, biomolekulare Interaktionen zwischen Biomolekülen und einer biosensitiven Schicht, die auf einem Glasträger aufgebracht ist, in Echtzeit zu detektieren. Der Unterschied zur RIfS besteht darin, dass zur Messung keine extra Interferenzschicht aufgebracht wird. Es kann direkt die biosensitive Schicht auf dem Glasträger immobilisiert werden. Eine schematische Darstellung des SPI Aufbaus ist in Abb. 2.33 zu sehen.

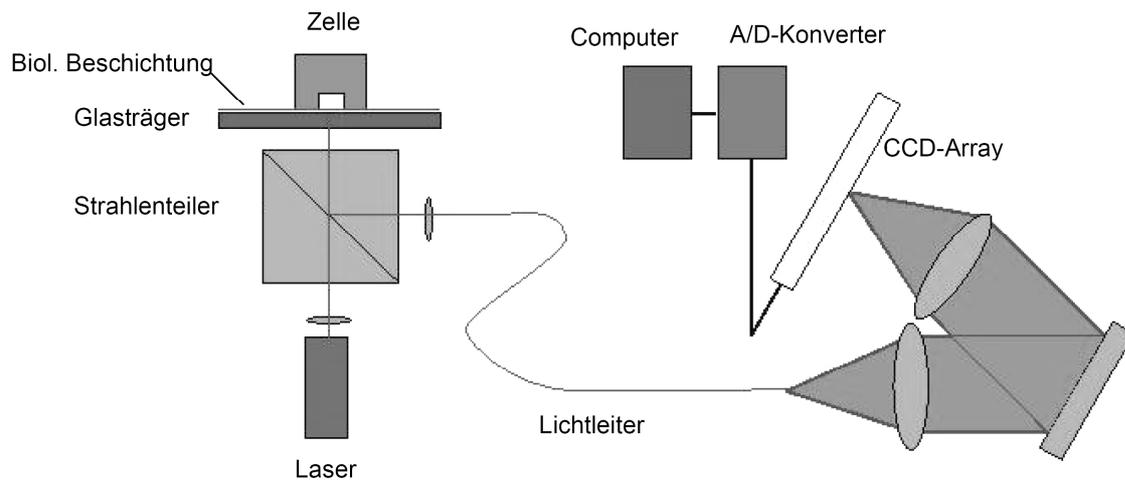


Abb. 2.33: Schematischer Aufbau der SPI.

Die Messkammer ist in Abb. 2.34 zu sehen. Bei der Strahlungsquelle handelt es sich um eine superlumineszente Laserdiode, die Licht der Wellenlänge von 850 nm emittiert. Das Emissionsband beträgt 30 nm (FWHM), die Leistung der Diode liegt bei weniger als 100 μW . Das Licht wird mit Hilfe einer Linse gesammelt und auf einen Strahlenteiler geleitet. Ein Teil der Strahlung wird senkrecht auf einen planparallelen Glasträger (in der Form eines Deckgläschens für ein Mikroskop mit einer definierten Schichtdicke von 100 μm) eingestrahlt. Dieser Träger ist für die BIA mit einer biosensitiven Schicht versehen.

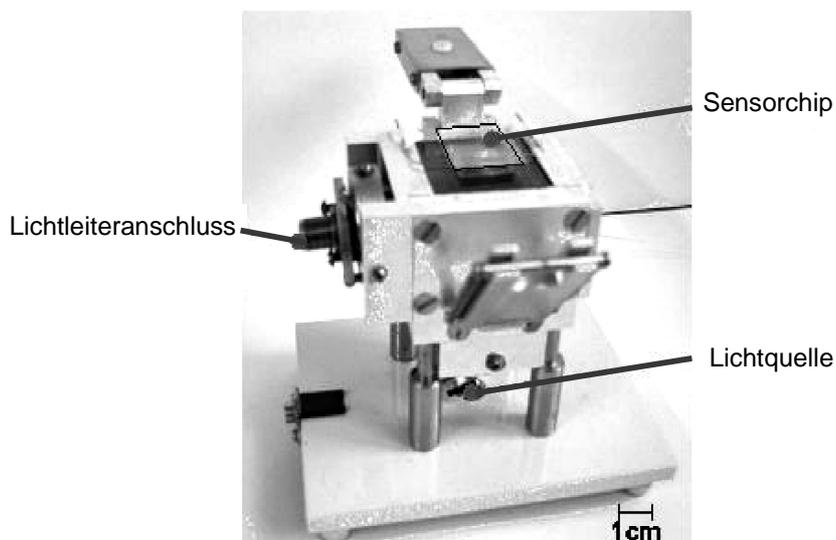


Abb. 2.34: Messkammer der SPI. [Bildquelle: Nikitin et al., 2000]

An den Grenzflächen Luft/Glas bzw. Glas/biosensitive Schicht und biosensitive Schicht/Analytlösung wird das eingestrahlte Licht teilweise reflektiert und teilweise transmittiert. Dabei haben der Glasträger und die biosensitive Schicht einen sehr ähnlichen Brechungsindex und können daher als Einheit betrachtet werden. Die Reflexion an dieser Grenzfläche kann somit vernachlässigt werden [Nikitin et al., 2000]. Somit ist für das Messsignal die reflektierte Strahlung an den Grenzflächen Luft/Glasträger und Glasträger/Analytlösung von Bedeutung (Abb. 2.35).

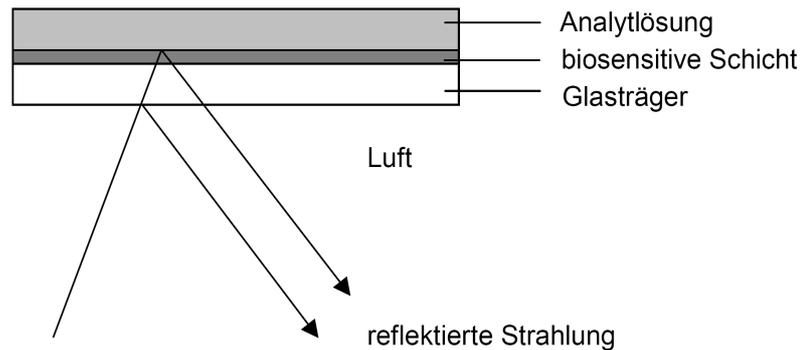


Abb. 2.35: Für die SPI entscheidenden an Grenzflächen reflektierten Teilstrahlen. Zur vereinfachten Darstellung wurde ein von 90° abweichender Einstrahlwinkel gewählt. Real beträgt der Einstrahlwinkel jedoch 90° .

In der Realität entspricht der Einfallswinkel genau 90° . Zur besseren Verständlichkeit wurde in dem Schema ein von 90° abweichender Winkel gewählt. Die reflektierten Strahlen können interferieren, wodurch sich ein charakteristisches Interferenzspektrum ergibt (Abb. 2.36). Durch die Anlagerung von Biomolekülen an die biosensitive Schicht nimmt die Dicke der Einheit aus Glasträger und biosensitiver Schicht zu. Dies führt dazu, dass der reflektierte Teil der Strahlung der Grenzfläche Glasträger/Analytlösung nun eine größere Wegstrecke zurücklegen muss. Dadurch wird eine Phasenverschiebung dieses reflektierten Teilstrahls im Vergleich zu jenem bewirkt, der an der Grenzfläche Luft/Glasträger reflektiert wird. Eine solche Phasenverschiebung hat hinsichtlich des Interferenzspektrums eine Verschiebung der Maxima und Minima zur Folge (Abb. 2.36). Darüber hinaus vermindert sich deren Abstand zueinander. Da die Verschiebung der Maxima und Minima umfangreicher ist als die Änderung des Abstands wird sie zur Ermittlung der Schichtdickenänderung herangezogen. Eine Verringerung der Schichtdicke z.B. durch Dissoziation der Biomoleküle von der biosensitiven Schicht führt entsprechend zu einer Verschiebung der Maxima und Minima in entgegengesetzter Richtung sowie zu einer Zunahme des Abstands.

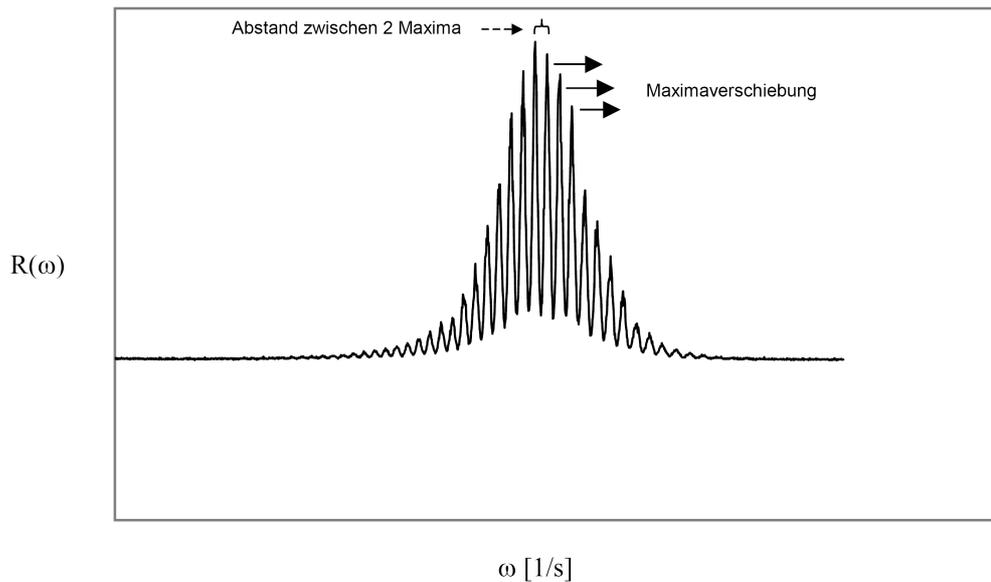


Abb. 2.36: SPI-Interferenzspektrum. Eine Anlagerung von Biomolekülen an den Glasträger bewirkt eine Verschiebung der Maxima und Minima sowie eine Verringerung des Abstands zueinander. Aufgrund der Größe der Verschiebung wird diese zur Auswertung herangezogen.

Die reflektierte Strahlung trifft wiederum auf den Strahlenteiler. Ein Teil der Strahlung wird mit Hilfe einer Linse in einen Multimodewellenleiter eingekuppelt. Dieser besitzt einen Durchmesser von 50 μm und eine numerische Apertur von 0,22. Er dient als flexible Verbindung zwischen Meßkopf und dem Spektrometer. Das Spektrometer bestehend aus einem ersten Objektiv, einem Beugungsgitter, einem zweiten Objektiv und einem CCD Array mit 2048 Pixel und einer Pixelgröße von 14 x 14 μm . Das Ausgangssignal des CCD Arrays wird mit Hilfe eines zwölfstelligen Digital/Analogwandlers digitalisiert und mit einem PC als Auswerteeinheit verarbeitet. Die berechneten Werte werden als Sensorgramm in Form der Abhängigkeit der Schichtdickenänderung von der Zeit aufgezeichnet. Die berechneten Schichtdickenänderungen stellen Mittelwerte der Dickenänderung innerhalb einer definierten Messfläche dar.

Die Intensität des Lasers wurde so gewählt, dass das Signalmaximum zwischen 3000 und 3500 AU lag. Der Belichtungswert wurde nie geändert und lag bei 440.

Für die Immobilisierungsversuche von Makrophagen auf einem bioabbaubarem Polymer (PEC) wurde das SPI-Gerät sowohl im Durchfluss als auch als statisches System eingesetzt. Hierbei erfolgte die Probenzufuhr über ein six port Ventil, welches mit einer Schlauchpumpe (Peristaltikpumpe) betrieben wurde.

2.2.5 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die SPR-Sensoren gehören zur Gruppe der Evaneszentfeldsensoren. Solche Sensoren nutzen zur Analyse biomolekularer Interaktionen ein sogenanntes evaneszentes Feld. Es entsteht, wenn Licht aus einem optisch dichteren Medium auf

ein optisch dünneres trifft und der Einstrahlwinkel oberhalb des Grenzwinkels der Totalreflexion liegt. In diesem Fall ist die Lichtintensität jenseits der Grenzfläche trotz Totalreflexion der Strahlung nicht Null, sondern klingt exponentiell ab. Sofern das optisch dichtere Medium mit einem dünnen Edelmetallfilm beschichtet ist, können die Elektronen des Metallfilms unter bestimmten Umständen mit diesem evaneszenten Feld interagieren. Diese Interaktion wird durch Anlagerung von Biomolekülen auf der Metalloberfläche in charakteristischer Weise beeinflusst und kann daher zur Auswertung herangezogen werden.

Für die Oberflächenplasmonresonanzversuche wurde das Plasmonic[®] SPR-Gerät der Plasmonic Biosensor AG verwendet. Eine Laserdiode, die ein Licht der Wellenlänge von 786 nm emittiert, dient als Lichtquelle. Die Detektion der reflektierten Strahlung erfolgt durch eine CCD-Kamera (760 x 560 Pixel). Dabei wird das CCD-Array so aufgeteilt, dass gleichzeitig die reflektierte Strahlung aller acht Messkavitäten winkelabhängig detektiert werden kann. Das CCD-Array ersetzt somit acht Detektoren, was zu einer kostengünstigen Herstellung der Plasmonic[®] Geräte beiträgt.

Die Probenzugabe im SPR-Gerät erfolgt über einen Autosampler. Hierbei handelt es sich um eine computergesteuerte Pipette, die die Proben aus der jeweiligen Kavität der Mikrotiterplatte entnimmt. Die Temperaturkontrolle der Messspots wird durch Peltierelemente sichergestellt (Temperaturstabilität 100 mKelvin). Die Aufnahme-frequenz liegt zwischen 0,01 und 2 Hz und kann variabel gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen in der Regel bei einer Temperatur von 22 °C und 1 Hz Aufnahme-frequenz durchgeführt. Als optisch dichteres Medium wurden goldbeschichtete (50 nm Goldschicht) Glasprismen verwendet (Maße der Oberseite der Goldprismen: 0,9 x 2,4 cm). Für die Messung wurden die mit einer biosensitiven Schicht versehenen Goldprismen mit einer Kunststoffkuvette mit acht Kanälen in die dafür vorgesehene Halterung gebaut (Abb. 2.37). Goldbeschichtete Glasprismen, Einmalküvetten und Chiphalterungen wurden von der Plasmonic Biosensor AG bezogen.

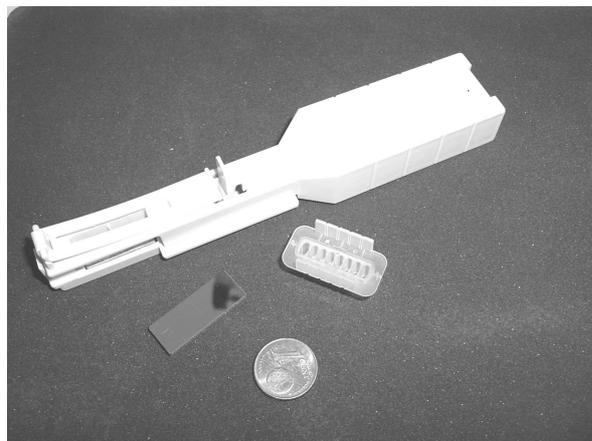


Abb. 2.37: Goldprisma, Kunststoffkuvette und Halterung. Zur Messung werden das modifizierte Goldprisma und die Kuvette in die Halterung eingebaut und mittels eines Schlittens in das SPR-Gerät eingeführt.

2.2.5.1 Arbeitsweise mit dem Plasmonic® SPR-Gerät

Im Allgemeinen wurden die Reagenzien wie folgt auf die modifizierten (beschichteten) Goldprismen aufgetragen: Die entsprechende Kavität wurde mit 20 µl PBS-Puffer gefüllt und die Messung nach Erreichen der Soll-Temperatur gestartet. Pro Kavität wurden 10 µl des Puffers gegen 10 µl des jeweiligen Reagenzes ausgetauscht. Diese 20 µl wurden in der Kavität 6 Minuten lang unter Mischen inkubiert. Nach jeder Inkubation eines Reagenzes wurde fünfmal mit PBS-Puffer gewaschen. Jeder einzelne Spülschritt erfolgte analog der Reagenzienaufgabe. Hierbei wurden 10 µl Lösung der jeweiligen Kavität entnommen und durch 10 µl PBS-Puffer ersetzt. Die Kavität wurde daraufhin für 1 Minute unter Durchmischung gewaschen.

2.2.6 LAPS - Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor

Für die Messungen wurde ein neuentwickeltes LAPS Gerät eingesetzt [Wagner, 2008], wobei der Fokus auf einer einfachen Handhabung (z.B. beim Ein- und Ausbau des LAPS-Sensors) des Gerätes lag. Der Umgang mit den Sensorchips selbst sollte dabei so weit wie möglich vereinfacht werden, um auch den Einsatz außerhalb von speziell für den Umgang mit Halbleiterchips ausgerichteten Laboren zu erlauben. Dazu wurde der Sensorchip in einen Plastikkartenträger (ISO 7816) mit den Maßen 86 x 54 x 0,7 mm³ integriert. Die verwendeten Plastikkarten werden bereits in hohen Stückzahlen kommerziell genutzt (z.B. für Telefon- und Kreditkarten) und eignen sich daher insbesondere für Einweganwendungen. In Abb. 2.38 ist der Aufbau einer solchen Sensorkarte dargestellt.

Um den LAPS-Chip aufzunehmen, wurde in den Plastikkartenträger eine rechteckige Öffnung von 1,25 x 1,25 cm² eingebracht. Somit ist weiterhin eine Beleuchtung der LAPS-Struktur von unten möglich. Zusätzlich wurde eine 5 mm breite und 500 µm tiefe Nut am Rand der Öffnung eingefräst. Diese dient als Klebefläche und zur Aufnahme des Sensorchips. Die LAPS-Struktur und die Plastikkarte wurden mit einem medizintauglichen Silikon verklebt, da bei diesem im Gegensatz zu industriellen Silikonen keine Essigsäure beim Abbinden erzeugt wird. Diese würde den Aluminiumrückseitenkontakt des Sensorchips angreifen und ggf. zerstören. Die Chipkarte mit integriertem LAPS-Sensor kann in einem letzten Schritt beschriftet werden. Auch eine digitale Speicherung von Parametern auf einen zusätzlichen Speicherchip auf der Plastikkarte ist bei Bedarf möglich.

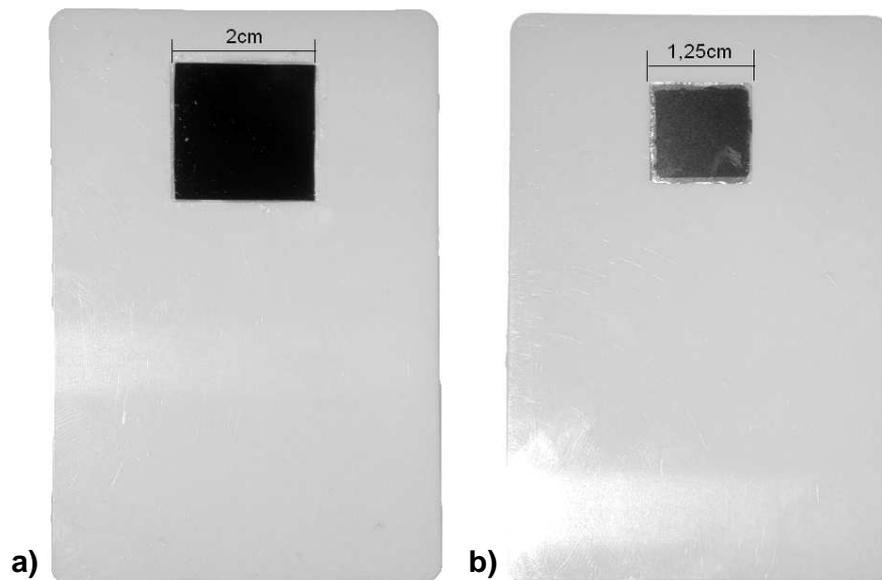


Abb. 2.38: a) Vorderseite des Plastikartenträgers mit integrierter LAPS-Struktur, b) Rückseite mit Öffnung für das IR-LED-Array und zum Abgreifen des Rückseitenkontaktes [Wagner, 2008].

2.2.6.1 Messeinheit und Elektronik

Wie in Abb. 2.39 dargestellt, besteht das Messsystem aus drei Einheiten. Die Basis bildet ein Metallgehäuse, in welches die Mess- und Steuerelektronik integriert ist. Über einen Sub-D-Stecker kann hier eine konventionelle Messwerterfassung angeschlossen werden; um die Qualität des Messsignals zu garantieren, ist dieser mit einem speziell geschirmten Analog-Kontakt für das Sensorsignal ausgestattet. Das Metallgehäuse dient gleichzeitig der Abschirmung vor elektromagnetischen Störquellen und dem thermischen Wärmeausgleich. Dies garantiert einen stabilen Betrieb der Messelektronik unter konstanten Bedingungen.

Auf dem Metallgehäuse sitzt der Messkopf: Dieser beinhaltet neben der Aufnahme der Messzelle den Steckkontakt für den Rückseitenkontakt sowie die Haltevorrichtung für das IR-LED-Array. Dabei lässt sich über ein Gewinde die Position des IR-LED-Arrays in der Höhe justieren, um einen optimalen Abstand zwischen IR-LEDs und LAPS-Struktur zu gewährleisten. Weiterhin findet sich hier eine Kontaktbuchse und eine Haltevorrichtung für die Referenzelektrode.

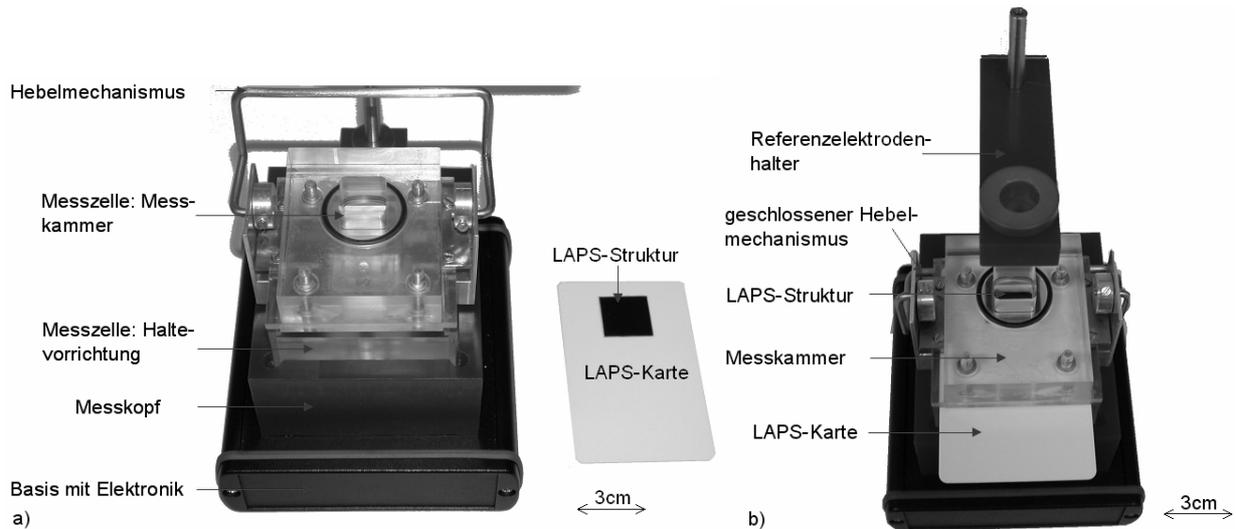


Abb. 2.39: Bilder des LAPS Messsystems bestehend aus Basis mit integrierter Elektronik, Messkopf und Messzelle a) ohne eingebaute LAPS-Karte; Messkammer und Haltevorrichtung sind voneinander getrennt und b) mit eingesteckter LAPS-Karte. Durch den Hebelmechanismus werden Messkammer und Haltevorrichtung gegeneinander gepresst [Wagner, 2008].

Der oberste und dritte Teil des Messsystems ist die eigentliche Messzelle; diese unterteilt sich wiederum in ein Unterteil, der Haltevorrichtung der LAPS-Karte und ein Oberteil, der eigentlichen Messkammer. Beide Teile sind über einen Federmechanismus miteinander verbunden. Im offenen Zustand lässt sich so die oben beschriebene Chipkarte einführen. Die Haltevorrichtung garantiert durch entsprechende Führungen und Anschläge eine exakte Positionierung der LAPS-Karte. Die Rückseite der LAPS-Struktur wird automatisch mit Hilfe von Federstiften elektrisch kontaktiert. Mittig in der Haltevorrichtung befindet sich eine Öffnung, durch die das IR-LED-Array auf wenige mm an die LAPS-Karte herangeführt werden kann. Die Messkammer besitzt einen Dichtring, welcher beim Herablassen auf die LAPS-Struktur aufdrückt und so die LAPS-Struktur und Messkammer gegeneinander abdichtet. Zusätzlich lassen sich verschiedene Oberteile auf die Messkammer anflanschen, so dass neben der hier gezeigten einfachen Messzelle auch andere Geometrien, wie Durchflusszellen, realisierbar sind. Über einen Hebelmechanismus werden beide Teile der Messzelle gegeneinander gepresst. Die eingelegte LAPS-Karte wird dabei sowohl von unten elektrisch kontaktiert als auch von oben gegen die Messkammer abdichtet.

2.2.6.2 Charakterisierung des LAPS-Systems

Vier komplette Messzyklen zwischen pH 3 und pH 10 wurden in pH-Stufen von Eins durchfahren. Aufgrund eines schnelleren Ansprechverhaltens wurde nun 3 min im jeweiligen pH-Puffer gemessen; anschließend wurde die Messlösung gewechselt, Messkammer und Referenzelektrode mit DI-Wasser gespült und die jeweils neue pH-Pufferlösung eingefüllt. Die gesamte Messzeit betrug 1 Stunde und 55 Minuten.

In Abb. 2.40 ist die Erfassung dieser Daten als Screenshot der LAPS-Software festgehalten.

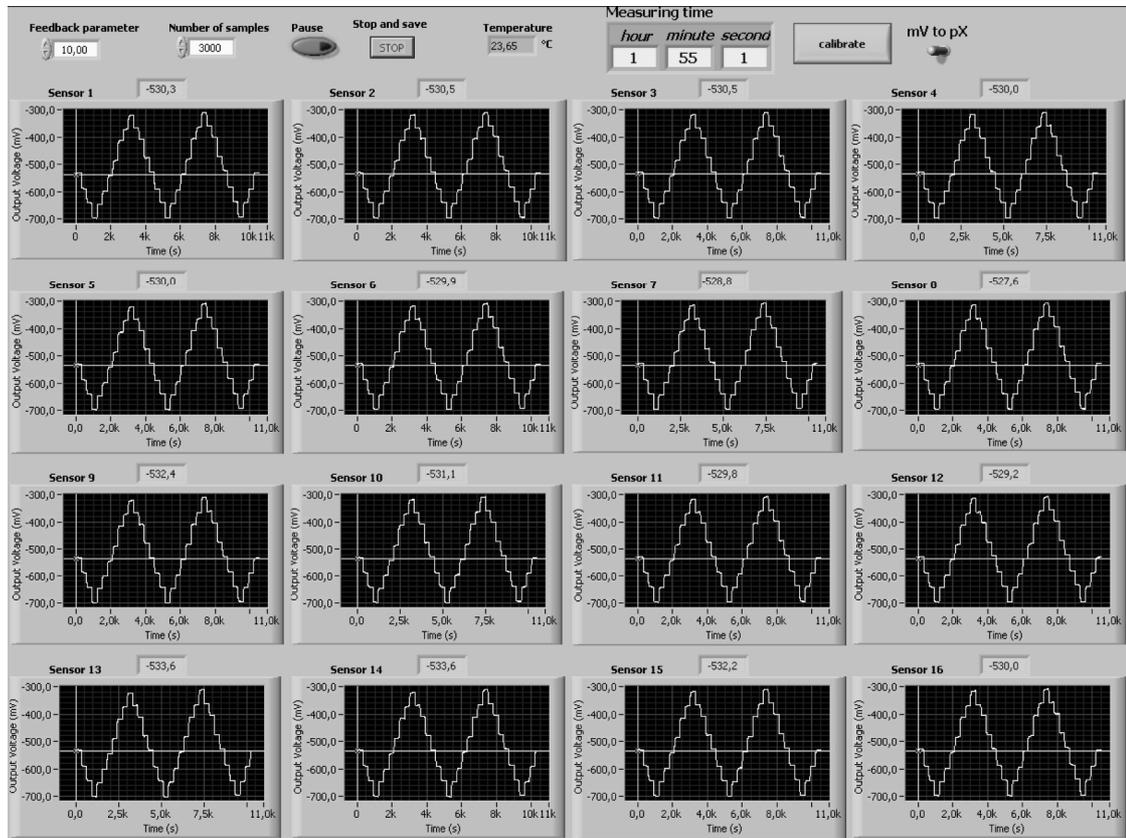


Abb. 2.40: Screenshot während der CC-Messungen zur Bestimmung der pH-Sensitivität und der Reproduzierbarkeit des LAPS für alle 16 Messspots [Wagner, 2008].

Bei dieser Messreihe wurden über die letzten zwei Minuten die jeweiligen Messwerte der pH-Stufe gemittelt. Aus den so gewonnenen Daten wurde im Anschluss die pH-Sensitivität bestimmt. Tab. 2.7 fasst die gemittelten Werte exemplarisch für Messspot 8 zusammen und gibt die Sensitivitäten pro Kalibrierzyklus und die gesamte gemittelte pH-Sensitivität an.

Tab. 2.7: Die ermittelten Messwerte exemplarisch für Spot 8 nach vier Kalibriermessungen zwischen pH 3 und pH 10.

U_{bias} [mV]	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
1. Zyklus	-697,5	-643,5	-595,8	537,6	-481,6	-409,5	-366,9	-312,6
2. Zyklus	-695,4	-640,0	-587,4	-524,0	-472,6	402,4	-363,0	-312,6
3. Zyklus	-695,4	-641,0	-591,5	-532,4	-477,7	-404,6	-357,4	-305,9
4. Zyklus	-694,9	-643,1	-584,4	-520,8	-466,2	-396,2	-354,8	-305,9
Sensitivität [mV dec⁻¹]	1. Zyklus 55,9		2. Zyklus 55,6		3. Zyklus 56,7		4. Zyklus 56,4	
Gesamte gemittelte Sensitivität	$56,1 \pm 0,5 \text{ mV dec}^{-1}$							

Tab. 2.8 fasst die ermittelten pH-Sensitivitäten für alle Messspots, inkl. der Standardabweichungen zwischen den einzelnen Kalibrierzyklen, zusammen.

Tab. 2.8: Gemittelte Sensitivitäten für alle Messspots der aus Abb. 2.40 gewonnenen Messdaten.

# Messspot	1	2	3	4	5	6	7	8
Sensitivität [mV dec^{-1}]	55,7	55,7	55,8	55,9	55,8	55,9	56,1	56,1
Standardabweichung [mV dec^{-1}]	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5
# Messspot	9	10	11	12	13	14	15	16
Sensitivität [mV dec^{-1}]	55,9	56,0	56,1	56,2	55,9	56,0	56,1	56,1
Standardabweichung [mV dec^{-1}]	0,7	0,6	0,5	0,4	0,7	0,6	0,6	0,5

Für Messspot 8 sind die vier Kalibrierzyklen exemplarisch nochmals in Abb. 2.41 jeweils mit einem linearen Fit und der daraus ermittelten Steigung dargestellt.

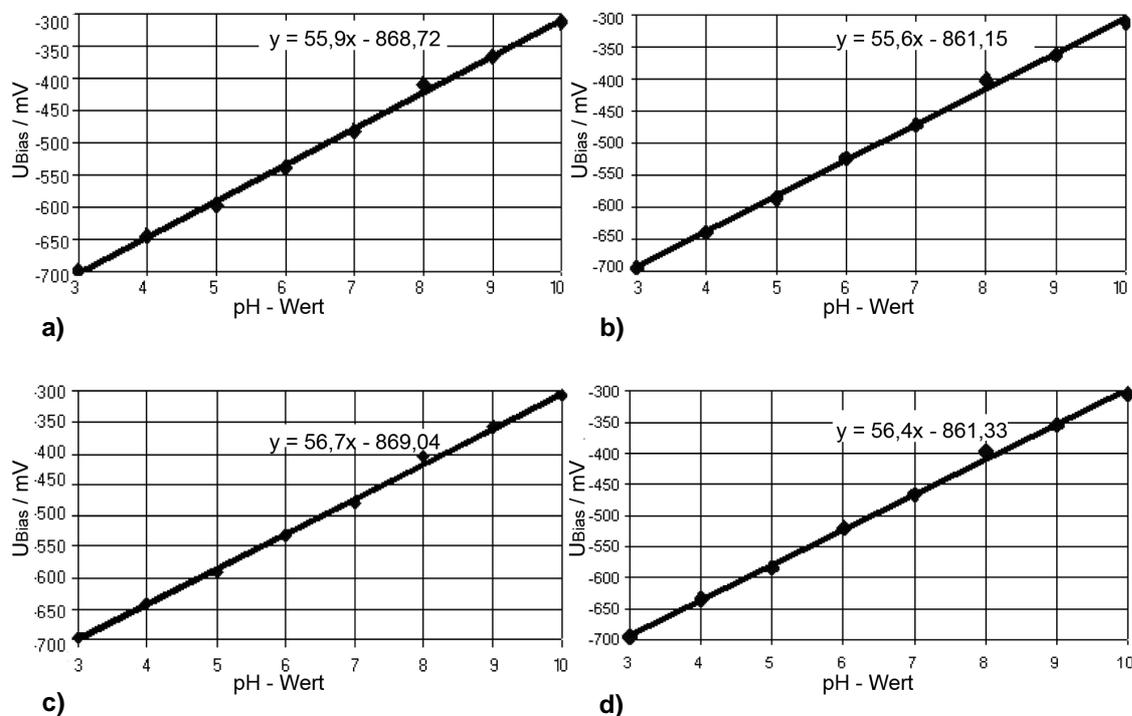


Abb. 2.41: Kalibriergeraden von vier aufeinanderfolgenden Messzyklen zwischen pH 3 und pH 10, mit den entsprechenden linearen Annäherungen und den daraus resultierenden Sensitivitäten, exemplarisch für Messspot 8, a) 1. Zyklus (pH 3-pH 10), b) 2. Zyklus (pH 10-pH 3), c) 3. Zyklus (pH 3-pH 10), d) 4. Zyklus (pH 10-pH 3).

Für das LAPS-Messsystem wurden die maximalen Abweichungen der Messspots untereinander bestimmt, welche in Tab. 2.9 wiedergegeben werden. Die Hysterese aus einer entsprechenden aufsteigenden Kalibriermessung zwischen pH 3 und pH 10 sowie einer absteigenden Kalibriermessung zwischen pH 10 und pH 3 ist exemplarisch für Messspot 8 in Abb. 2.42 und für alle 16 Messspots in Tab. 2.10 zusammengefasst.

Tab. 2.9: Maximal aufgetretene Abweichungen der einzelnen Messspots untereinander für die jeweils gemessene pH-Stufe.

pH-Wert	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
$U_{\text{bias max.}} / \text{mV}$	-695,4	-634,1	-591,5	-524,0	-466,2	-396,2	-357,4	-312,6
$U_{\text{bias min.}} / \text{mV}$	-703,2	-643,5	-598,9	-533,2	-475,2	-406,6	-366,4	-322,9
$\Delta U_{\text{bias}} / \text{mV}$	7,8	9,4	7,4	9,2	9,0	10,4	9,0	10,3

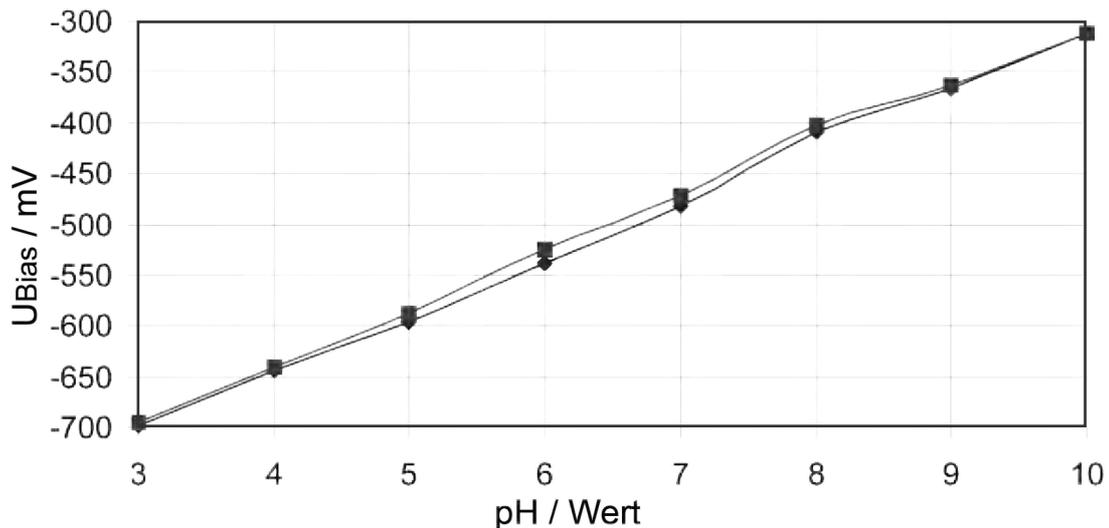


Abb. 2.42: Hysterese durch eine absteigende und eine aufsteigende Kalibriermessung zwischen pH 3 und pH 10, beispielhaft für Messspot 8, die maximale Abweichung beträgt 16,8 mV bei pH 6.

Tab. 2.10: Maximale Hysterese nach einer auf- und einer absteigenden Kalibriermessung zwischen pH 3 und pH 10 für alle 16 Messspots.

# Messspot	1	2	3	4	5	6	7	8
max. Hysterese [mV]	16,7	16,6	16,3	16,5	15,9	15,8	16,3	16,8
# Messspot	9	10	11	12	13	14	15	16
max. Hysterese [mV]	14,5	15,5	16,2	16,4	15,0	15,2	15,7	16,1

Für die gemessenen Temperaturen sind die Korrekturen durch Änderung des Nernstpotentials und der Einfluss aufgrund der möglichen pH-Wertänderung des Puffers und der gemessenen Biasspannung in Tab. 2.11. verrechnet.

Tab. 2.11: Bestimmung des Einflusses einer möglichen Temperaturänderung auf das Messsignal, exemplarisch an Messspot 8.

T [°C]	ΔT [°C]	ΔU_{bias} [mV]	ΔU_{PT} [mV]	ΔU_{NT} [mV]	ΔU_{korrr} [mV]
24,92	0	0	0	0	0
24,79	-0,13	1,6	-0,1	-0,03	1,5
24,61	-0,31	2,5	-0,2	-0,06	2,2
24,50	-0,42	3,2	-0,3	-0,08	2,8
24,42	-0,50	3,7	-0,4	-0,09	2,3
24,41	-0,51	4,3	-0,4	-0,10	3,8
24,32	-0,60	4,3	-0,4	-0,12	3,8
24,30	-0,62	4,3	-0,4	-0,12	3,8
24,29	-0,63	4,3	-0,4	-0,13	3,8
24,25	-0,67	4,3	-0,5	-0,13	3,7
24,28	-0,64	4,2	-0,4	-0,13	3,7
24,41	-0,51	4,3	-0,4	-0,10	3,8

Abb. 2.43 zeigt das Temperaturverhalten des LAPS über einen Zeitraum von 2 Stunden während einer Messung von pH 7-Pufferlösung.

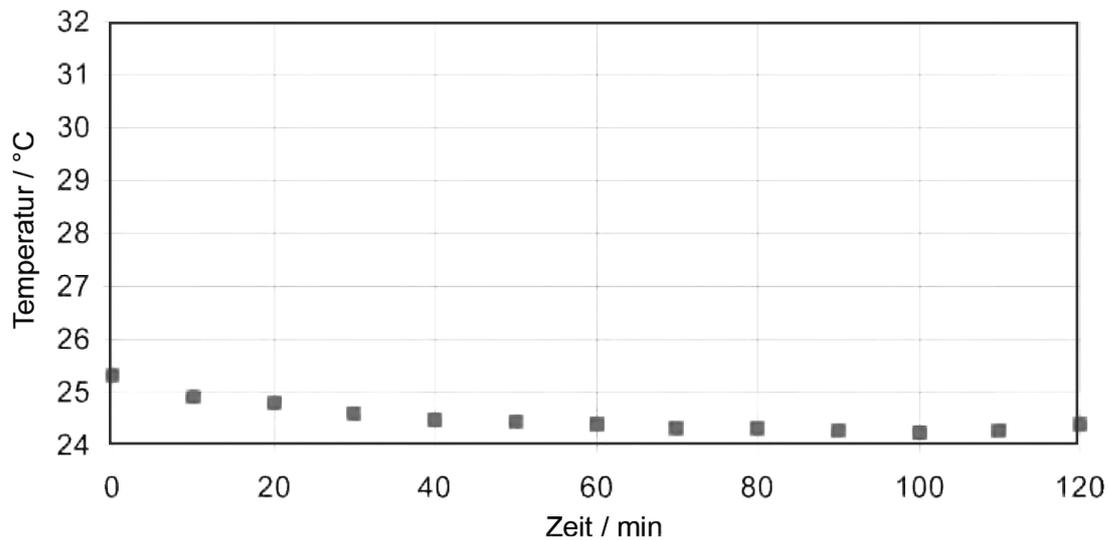


Abb. 2.43: Zeitlicher Temperaturverlauf der pH-Pufferlösung (pH 7) über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Der Einfluss des mechanischen Aufbaus auf das Ansprechverhalten des Messsystems wurde ebenfalls bestimmt, indem die Vorgabe für den Regler zum Zeitpunkt $t = 0$ verändert wurde. Ermittelt wurde abermals T_{90} jeweils für das Vermessen von einem, zwei, vier, acht und allen 16 Messspots. Bei einer Messung von allen 16 Messspots ist in Abb. 2.44 exemplarisch das Ansprechverhalten von Messspot 1 grafisch dargestellt, bei dem ein T_{90} von 50 s ermittelt werden konnte.

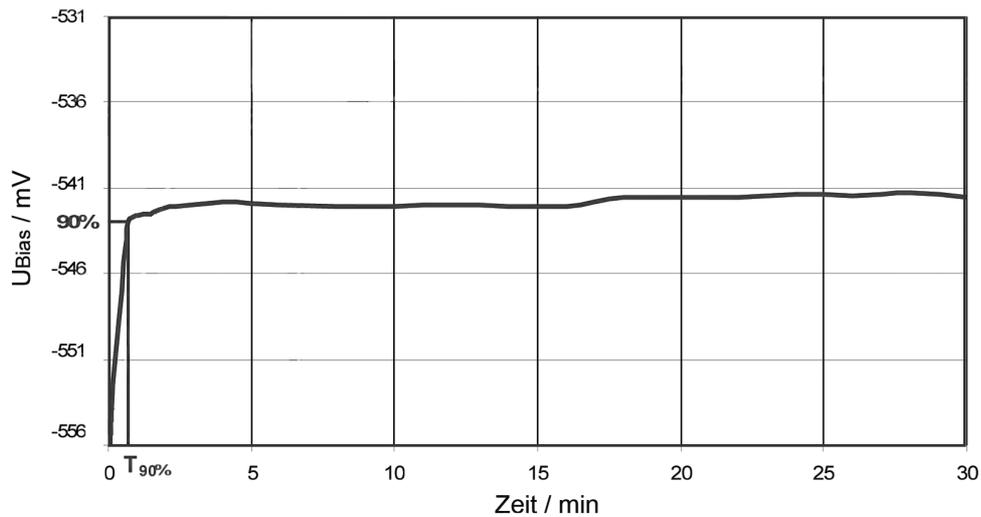


Abb. 2.44: Einregelverhalten des LAPS während einer Messung mit allen 16 Messspots und einer, durch Veränderung des Arbeitspunktes, hervorgerufenen Regeldifferenz zum Zeitpunkt $t = 0$, beispielhaft an Messspot 1.

Tab. 2.12: Abhängigkeit der Einregelzeit (T_{90}) von der Anzahl an sequentiell auszulesenden Messspots.

# Messspot	1	2	4	8	16
Ansprechzeit T_{90} [s]	5	8	12	25	50

Tab. 2.12 fasst die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Anzahl der Messspots zusammen.

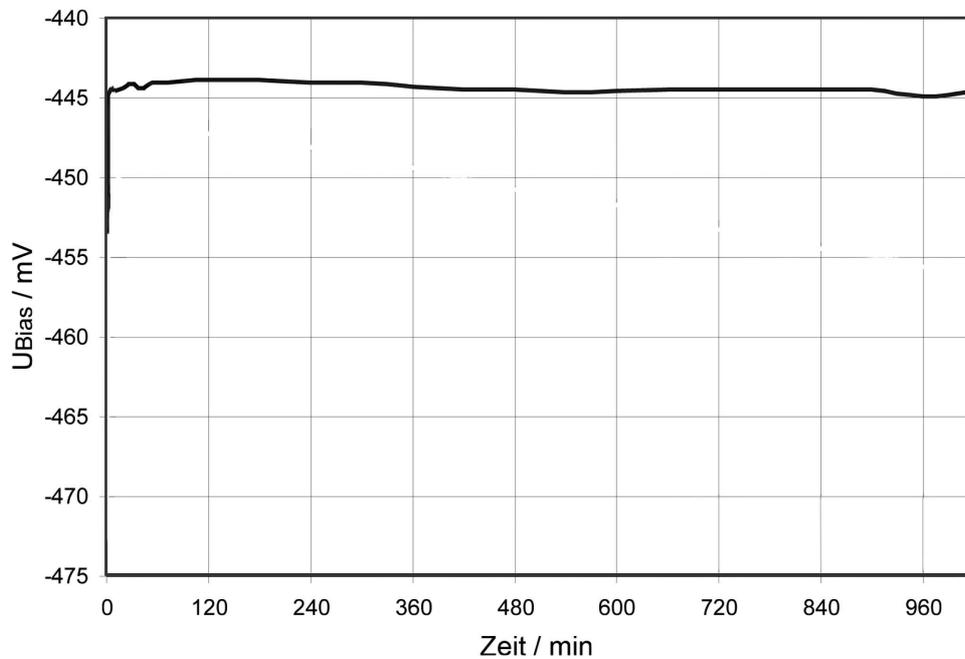


Abb. 2.45: Langzeitdriftverhalten des LAPS über eine Messdauer von 17 h für eine Messung in pH 7-Pufferlösung.

Als letzte Größe wurde in dieser Messreihe die Langzeitstabilität des LAPS bestimmt. Dazu wurde eine pH 7-Pufferlösung über einen Zeitraum von 17 Stunden vermessen. Die Messung erfolgte für alle 16 Messspots und ist in Abb. 2.45 exemplarisch für Messspot 8 dargestellt. Es konnte eine Drift von $1,1 \text{ mV} \pm 0,3 \text{ mV}$ ab dem Zeitpunkt T_{90} bis zum Messende festgestellt werden. Damit betrug die Drift weniger als $70 \mu\text{V h}^{-1}$.

2.2.6.3 LPS-Funktionalisierung von Magentic Beads

Zur Funktionalisierung wurden streptavidinbeschichtete Magnetic Beads BM 0,86 (Durchmesser: $0,86 \mu\text{m}$) von Estapor (Merck) in einer Verdünnung von 1:100 (V/V) mit PBS-Puffer eingesetzt. Diese wurden zur Kopplung an biontynilierte Anti-*Salmonella*-Antikörper eingesetzt. Zur Funktionalisierung diente das Antigen LPS aus *Salmonella typhimurium* in einer Konzentration von $400 \mu\text{g/ml}$. Die Konzentration des eingesetzten Antikörpers betrug $200 \mu\text{g/ml}$. LPS/Antikörper/Magnetic Beads wurden im Verhältnis 1:1:1 (V/V/V) zusammengegeben, vorsichtig durchmischt und mindestens 30 Minuten ohne Schütteln inkubiert.

2.2.7 Liposomenherstellung

Kommen amphiphile Moleküle, wie z.B. Phospholipide, mit einem wässrigen Medium in Kontakt, so organisieren sie sich zu Assoziationskolloiden und reduzieren auf diese Weise ihre Kontaktfläche zwischen den hydrophoben Molekülstrukturen und dem umgebenden Medium. Auf diesem Weg entstehen entweder Mizellen, planare Bilayer oder Liposomen. Um Liposomen in definierter Größe herstellen zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Herstellungsmethoden entwickelt. Folgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben.

Filmmethode

Bei der von Bangham erstmals beschriebenen Filmmethode [Bangham et al., 1965] werden die Membrankomponenten in geeigneten organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen gelöst und in einen Rundkolben pipettiert. Das Lösungsmittel wird anschliessend unter reduziertem Druck und erhöhter Temperatur (ca. $40 \text{ }^\circ\text{C}$) am Rotationsverdampfer entfernt. Auf der Innenwand des Rundkolbens entsteht so ein homogener transparenter Lipidfilm, der im Hochvakuum nachgetrocknet wird. Der Film wird nun mit einer entsprechenden Menge PBS-Puffer (Abb. 2.46) versetzt, wobei sich spontan eine in Bezug auf Größe und Lamellarität inhomogene Liposomendispersion mit multilamellaren Vesikeln (MLV) bildet.

Normalerweise werden Liposomen, die mit der Filmmethode hergestellt wurden, weiter verarbeitet mit dem Ziel, eine definierte, enge Grössenverteilung zu erhalten. Dies kann durch Ultraschall oder über mechanische Verfahren wie die Extrusion geschehen.

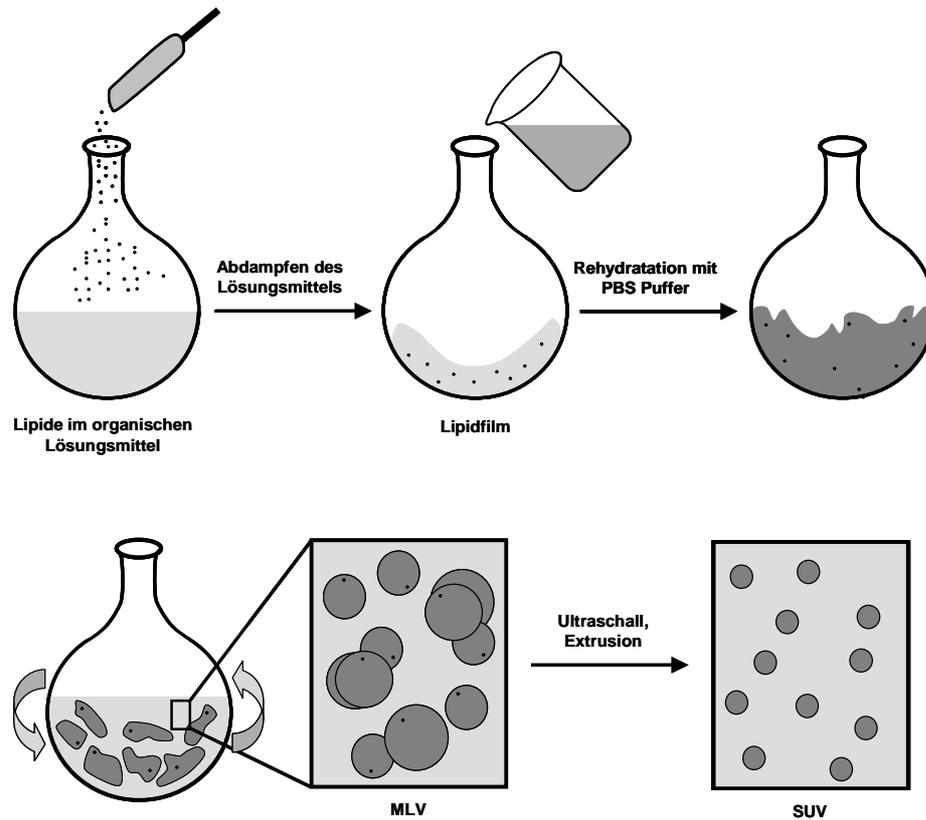


Abb. 2.46: Filmmethode zur Herstellung von Liposomen.

Ultraschallmethode

Die Behandlung einer wässrigen Dispersion im Ultraschallbad führt zu einer Verkleinerung der MLV. Große Ultraschallenergien führen zur Ausbildung von SUV.

Extrusion

Bei der Extrusion wird die nach der Filmmethode hergestellte Liposomendispersion mittels Extruder (Abb. 2.47) mehrmals durch eine Polycarbonatmembran gepresst. Dabei entstehen in Abhängigkeit vom Porendurchmesser und der Zahl der Extrusionsschritte uni- oder oligolamellare Liposomen mit enger Grössenverteilung [Olson et al., 1979; Hope et al., 1985].



Abb. 2.47: Avanti Polar Lipids® Mini-Extruder (links); die Liposomendispersion vor und nach dem Extrudieren (rechts).

2.2.7.1 Präparation der Liposomenformulierungen

Neutrale Liposomen

Zur Herstellung neutraler Liposomen wurde die Filmmethode verwendet. DMPC und Cholesterol wurden in einem molaren Verhältnis von 8:2 eingewogen und in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (V/V 2:1) gelöst. Hierzu wurden 8,17 mg DMPC und 2,06 mg Cholesterol in einen 20 ml Spitzkolben eingewogen und in 10 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (V/V 2:1) gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck und bei gemäßigter Temperatur (ca. 40 °C) weitestgehend entfernt. Der entstandene leicht trübe Lipidfilm wurde am Hochvakuum ($p=0,05$ mbar) mindestens 60 Minuten nachgetrocknet, um mögliche Lösemittelreste vollständig zu entfernen. Der getrocknete Lipidfilm wurde in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert, wobei eine trübe, inhomogene Dispersion entstand. Die Dispersion wurde im Ultraschallbad 15 Minuten bei 50 °C behandelt. Danach wurde diese mit dem Miniextruder 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert. Durch eine ungerade Anzahl an Extrusionsschritten ist gewährleistet, dass größere Verunreinigungen und große Lipidaggregate am Schluss des Extrusionsprozesses an der Membran zurückgehalten werden.

Negativ geladene Liposomen

Als Lipide wurden DMPC, DMPG und Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 6:2:2 verwendet. Hierzu wurden 6,51 mg DMPC, 2,20 mg DMPG und 1,24 mg Cholesterol in einen 20 ml Spitzkolben eingewogen und in 10 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (V/V 2:1) gelöst. Die weitere Herstellung der negativen Liposomen erfolgte analog zu den neutralen.

Positiv geladene Liposomen

Als Lipide wurden DMPC, Stearylamin (SA) und Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 7:1:2 verwendet. Hierzu wurden 7,59 mg DMPC, 0,43 mg Stearylamin und 1,24 mg Cholesterol in einen 20 ml Spitzkolben eingewogen und in 10 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (V/V 2:1) gelöst. Die weitere Herstellung der positiven Liposomen erfolgte analog zu den neutralen.

2.2.7.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die SEC (Size Exclusion Chromatography) ermöglicht eine Trennung von dispergierten bzw. gelösten Teilchen nach ihrer Teilchengröße. Als stationäre Phase werden meistens polymere Gele mit definierter Porengröße verwendet. Im Allgemeinen besteht die mobile Phase (Eluent) aus wässriger Pufferlösung. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Eindringmöglichkeit von Probenpartikeln in die Poren der stationären Phase. Sind Teilchen zu groß, um in die Poren einzudringen, so werden sie „ausgeschlossen“ und verlassen die Säule als erstes. Kleinere Moleküle, die in die Poren des Gels eindringen können, werden zeitweise aus dem Eluentenstrom entfernt

und folglich später eluiert. Da die Eindringtiefe (und damit auch die Retentionszeit) von der Molekülgröße abhängt, kann zudem eine Klassifizierung der porengängigen Molekülfraction erfolgen.

Modifizierte Liposomen wurden von den zur Modifizierung eingesetzten Stoffen mittels FPLC abgetrennt. Nach der Säulenconditionierung wurden Probenvolumina von 1 bzw. 2 ml auf eine Sepharose CL-4B (110 x 26 mm, GE Healthcare) gegeben und mit Phosphatpuffer (60 mM, 0,15 M NaCl) eluiert. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Die Fraktionsgröße lag bei 2 ml.

2.2.7.3 Funktionalisierung der Liposomen mit LPS

Die Funktionalisierung erfolgte mit LPS aus *Legionella pneumophila* und *Salmonella typhimurium*. Die entsprechenden LPS-Lösungen wurden mit den Liposomen in einem Verhältnis von 1:1 (V/V) eingesetzt. Diese Mischung wurde bei 50 °C für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde überschüssiges LPS mittels SEC (vgl. Kapitel 2.2.7.2) über eine Sepharose CL-4B Säule abgetrennt.

2.2.7.4 Liposomencharakterisierung

Partikelgröße und ζ -Potential

Mit der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) werden zwei Werte bestimmt, die die hergestellten Liposomen charakterisieren: Der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen (Z-Average) in nm und der dimensionslose Polydispersitäts-Index (PI) als Maß für die Größenverteilung der Liposomen.

Der hydrodynamische Durchmesser, der Polydispersitäts-Index und das ζ -Potential der Liposomensuspension wurden mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) bestimmt. Die Streulichtmessung erfolgt in einem konstanten Winkel von 90° bei Einsatz eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von $\lambda = 633$ nm. Eine Probe der zu analysierenden Liposomen wurde in eine 1 ml Polystyrol-Einmalküvette pipettiert. Die Probe wurde dann mit dem zur Herstellung verwendeten Puffer so verdünnt, dass das Streulichtsignal 100 bis 200 kcps beträgt. Zur Entfernung von Staub und Schwebstoffen, die die Messung beeinflussen können, wurden die zur Verdünnung der Proben verwendeten Puffer immer durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert, bevor sie zur Probe zugegeben wurden. Die Temperatur der Proben lag während der Messungen bei $25 \pm 0,5$ °C. Jede Probe wurde dreimal gemessen. Die einzelne Messung dauerte 120 Sekunden und bestand aus 10 Untermessungen. Der hydrodynamische Durchmesser wurde aus dem jeweiligen Mittelwert der drei Hauptmessungen berechnet.

2.2.7.5 LPS-Quantifizierung

Limulus-Amoebocytenlysate-Test (LAL-Test)

Bei dem LAL-Test handelt es sich um einen mikrobiologischen Schnelltest zum Nachweis von lebenden oder toten Gram negativen Bakterien. Bei diesem Testverfahren werden lysierte Blutzellen des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* eingesetzt. Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus* und *Tachypleus tridentatus*) besitzen ein proteolytisches Blutgerinnungssystem innerhalb ihrer Amoebocyten, das nach Freisetzung und Endotoxin-Aktivierung ein polymerisiertes unlösliches Gerinnsel bildet. Das Gerinnungsenzym aus dem Limulus-Amoebocytenlysate ist eine Protease, die das gerinnende Protein aktiviert. Das System lässt sich durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) aktivieren und so als Test auf die Anwesenheit von Endotoxinen nutzen. Für die LPS-Quantifizierung wurde der QCL-1000 Chromogenic LAL-Test der Firma Cambrex verwendet (vgl. 3.5.2.3).

LPS-Quantifizierung mittels HPLC-MS

Die Quantifizierung des LPS beruht auf der Bestimmung der 3 – Hydroxymyristinsäure, die durch alkalische Hydrolyse aus dem Lipid-A Teil abgespalten wird. Für die HPLC-MS/MS-Messungen wurde ein Qtrap 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet. Die Messungen wurden im Triple-Quadrupol (MS/MS Messungen) Modus durchgeführt. Als Ionenquelle diente eine Elektrosprayquelle (ESI, Turbolon, Applied Biosystems). Die HPLC-MS-Trennungen erfolgten über ein Shimadzu LC 20 HPLC-System, bestehend aus Autosampler, Hochdruckgradientenpumpe, Säulenofen und einem UV-Detektor. Als stationäre Phase wurde eine Nucleodur® C₁₈-Pyramid RP Säule (125 x 2 mm, 5 µm) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Acetonitril/Wasser Gemisch 95:5 (V/V). Das Injektionsvolumen betrug 1 bis 40 µl, die Säulentemperatur 20 °C. Die Parameter für die MS/MS – Messungen sind in Tab. 2.13 aufgeführt.

Tab. 2.13: Einstellungen für die MS/MS – Messungen.

Parameter	Einstellung
Polarity	negative
Curtain gas (CUR)	10
Ion spray voltage	-4500
Gas 1 (nebulizer gas)	20
Gas 2 (turbo gas)	0
Interface heater	ON
Declustering potential (DP)	-80
Entrance potential (EP)	-10

Die HPLC-MS-Proben wurden wie folgt vorbereitet: Zur Inkorporierung des LPS in die Liposomenmembran wurden 500 µl neutrale Liposomen und 500 µl LPS/PMBN (c=400 µg/ml) gemischt und 5 Minuten bei 50 °C im Ultraschallbad behandelt. Danach erfolgte die Abtrennung des überschüssigen LPS/PMBN aus den modifizierten Liposomen über eine Sepharose CL-4B Säule mittels FPLC. 500 µl der

Liposomenfraktion wurden mit 500 µl 16 M Natronlauge 6 Stunden bei 90 °C verseift. Nach Abkühlung auf RT wurde die Lösung mit 500 µl gesättigter NaCl Lösung versetzt und zweimal mit je 1,5 ml Ethylacetat 1 Minute lang extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 250 mg Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C und unter leichtem Vakuum entfernt.

Der Rückstand wurde in 1 ml Ethanol aufgenommen und zur HPLC-MS-Messung eingesetzt. Die HPLC Methode wurde isokratisch durchgeführt.

2.2.8 Zellkultur

2.2.8.1 Verwendete Zelllinien

Adenokarzinom NCI-H125

Die Zelllinie NCI-H125 wurde über die American Type Culture Collection bezogen. Sie wurde aus einer Hautmetastase eines Patienten mit Adenokarzinom der Lunge, welche vor Therapiebeginn entnommen wurde, etabliert. Die Zellen sind mittelgroß und gering kohäsiv. Die aneuploiden Zellkerne weisen zum Teil prominente Nucleoli auf. In der Monolayerkultur wachsen die Tumorzellen adhärent mit einer Generationszeit von 39 h und einer Kolonieformationseffizienz von 22 %. Die Tumorzellen exprimieren c-myc und haben eine Mutation im p53 Tumorsupressorgen. Es wurden auch verschiedene Komponenten von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren gefunden. Die Adenokarzinomzellen produzieren Muzine und sind immunhistochemisch anfärbbar mit verschiedenen Keratinen und Vimentin [Gazdar 1989; Carney et al., 1985; Banks-Schlegel et al., 1985; Takahashi et al., 1989; Brower et al., 1986; Forsberg et al., 1993; Carbone et al., 1991].

Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC-Zellen)

Die Zelllinie findet weitverbreitet als Metastasierungsmodell Verwendung und ist nützlich in der Untersuchung von Wirkmechanismen der Chemotherapeutika. Die Lewis Lung Carcinom Zelllinie entstammt der Lunge einer C57/BL Maus, der zuvor ein primäres Lewis Lung Carzinom implantiert wurde. Die Zellen sind resistent gegenüber 1,3-bis-(2-Chlorethyl)-1-Nitrosoharnstoff, gegenüber Methotrexat jedoch empfindlich [Bertram und Janik, 1980]. Die Zellen sind in Mäusen hochgradig kanzerogen; allerdings zeigen sie nur schwach metastatische Eigenschaften. Als Zellkultur bilden Lewis-Lung Zellen Multilayer ohne konfluent zu werden.

2.2.8.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen und Makrophagen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte in adhärenter Zellkultur in Kunststoff-Zellkulturflaschen verschiedener Größen. Das verwendete Nährmedium war für Lewis Lung Zellen (LLC) und murine Makrophagen (J774A.1) DMEM bzw. DMEM + 10 % FKS. Für NCI-H125-Zellen wurde RPMI-1640 verwendet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Bearbeitung der Zellen erfolge an einer Sterilbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Zum Passagieren wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, um Zelltrümmer und zweiwertige Kationen weitestgehend zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA überschichtet (ca. 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) und kurz inkubiert. Durch Zugabe der gleichen Menge Medium mit FKS wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert. Durch leichtes Klopfen lösten sich die Zellen vollständig vom Gefäßboden und wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die abgelösten Zellen wurden entsprechend verdünnt und in neuen Kulturgefäßen mit frischem Medium ausgesät, bzw. für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

2.2.9 Spin Coating

Das Spin Coating ist ein häufig angewandtes Verfahren zum Auftragen und gleichmäßigen Verteilen von Materialien auf einem Träger.

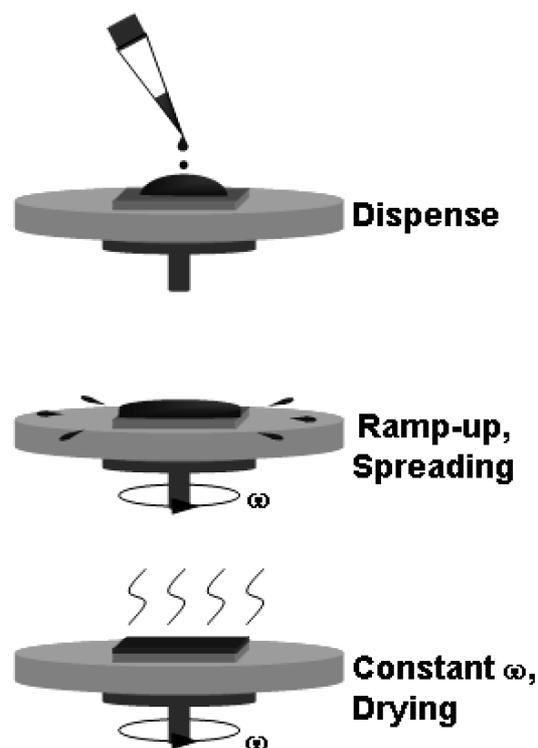


Abb. 2.48: Schematische Darstellung des Spin Coating Verfahrens. Nach Aufgabe der Coating-Lösung (Dispense) wird diese bei konstanter Drehgeschwindigkeit (Constant ω) verteilt (Ramp-up, Spreading) und der entstandene Film getrocknet (Drying).

Der Spin Coating Prozess lässt sich in drei Teilprozesse untergliedern. Im ersten Teilschritt, den man üblicherweise als „Dispense“ bezeichnet, wird die Lösung in die Mitte des Trägers gegeben. Anschließend wird der Drehteller in Rotation versetzt,

wobei sich die Lösung aufgrund der Zentrifugalkraft auf dem Träger verteilt und überschüssige Lösung vom Träger heruntergeschleudert wird („Spreading“ oder „Ramp-up“ Prozess). Im letzten Teilschritt („Evaporation“ oder „Drying“ Prozess) verdampft das leichtflüchtige Lösungsmittel während des Rotationsvorgangs. Die schwerflüchtige Komponente bleibt als Film auf dem Träger zurück (Abb. 2.48).

Zum Spin Coating wurde eine 2,5 % (m/V) PEC-Lösung in Dichlormethan verwendet. Da sich Polyethylencarbonat sehr schlecht löst, wurde die Polymerlösung über Nacht angesetzt.

2.2.9.1 SPI-Versuche

Als Träger dienten spezielle Mikroskop-Deckgläschen mit einer definierten Dicke von 100 µm. Diese wurden auf dem Spin Coater befestigt und mit 200 µl der 2,5 % PEC-Lösung beschickt. Die Beschichtungsdauer betrug 60 Sekunden bei einer Drehzahl von 6000 U/min.

2.2.9.2 SPR-Versuche

Als Träger dienten die goldbeschichteten Glasprismen. Nach Befestigung der Träger auf dem Spin Coater wurde dieser mit 200 µl einer 0,625 % (m/V) PEC-Lösung beschickt. Die Beschichtungsdauer betrug 60 Sekunden bei einer Drehzahl von 6000 U/min.

Bei beiden Trägern war das Coating zufriedenstellend, wenn nach dem Prozess keine Trübungen im Polymerfilm zu erkennen waren.

3 Ergebnisse

3.1 Lektin-Screening

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine aus pflanzlichen oder tierischen Quellen, die spezifisch an Zucker von Zellmembranen oder -wänden binden. Durch dieses spezifische Bindungsverhalten kommt es zu Veränderungen des Metabolismus innerhalb der Zelle [Sharon und Lis, 1989]. Eine derartige Interaktion kann aber auch zu direkten Veränderungen an der Zellmembran und der Zellwand führen. Einige pflanzliche Lektine sind in der Lage, das Immunsystem durch Aktivierung der T-Lymphozyten zu stimulieren. Andere wiederum führen zu einer Agglutination von Zellen und werden beispielsweise zur Blutgruppenbestimmung eingesetzt [Khan et al., 2002].

Um in biologischem Material gezielt nach Lektinen screenen zu können, sollte die Spezifität der Zucker – Lektin Wechselwirkung genutzt werden. Eine Testlösung wurde auf ein zuckerbeschichtetes Goldprisma gegeben. Enthielt die Probe das „passende“ Lektin zur Zuckeroberfläche, kam es zu einer spezifischen Bindung. Diese spezifische Wechselwirkung wird durch die Abb. 3.49 verdeutlicht.

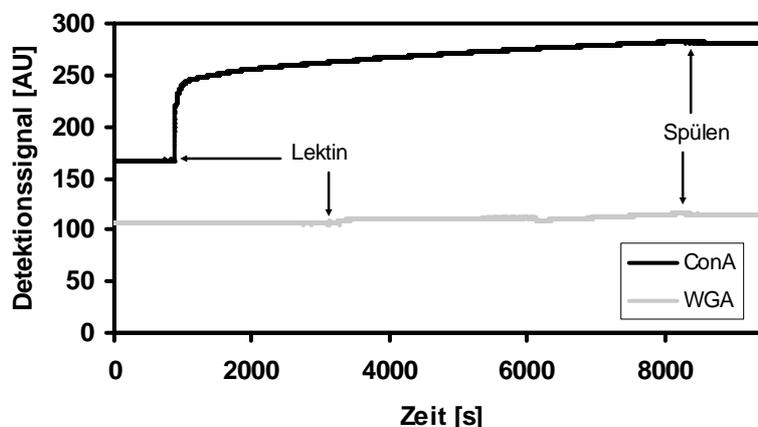


Abb. 3.49: Sensorgramm der Immobilisierung von ConA und Wheat Germ Agglutinin (WGA) auf einer Mannanoberfläche. ConA zeigt den typischen Kurvenverlauf aufgrund der Spezifität zu Mannan. Wheat Germ Agglutinin besitzt diese Spezifität nicht.

Die Lektine ConA und WGA wurden auf ein mannanbeschichtetes Goldprisma gegeben. Anhand der Bindungskurven lässt sich direkt die Spezifität des ConA gegenüber Mannan erkennen. Diese beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen ConA und α -D-Mannosereste.

WGA weist keine Spezifität gegen α -D-Mannosereste auf. Es kam zu keiner signifikanten Anlagerung.

Zur Herstellung der Lektin-Testlösungen wurden sechs Lektine ausgewählt. Es handelte sich dabei um *Canavalia ensiformis* (Jackbohne; Concanavalin A), *Lens culinaris* (Linse; Lentil), *Triticum vulgare* (Weizen, Wheat Germ Agglutinin), *Viscum album I* (Mistel; *Viscum album I* Agglutinin), *Ulex europaeus I* (Stechginster; *Ulex europaeus I* Agglutinin) und *Helix pomatia* (Weinbergschnecke; *Helix pomatia* Agglutinin). Dabei erfolgte die Auswahl der verwendeten Lektine nach folgenden Gesichtspunkten:

- Unterschiedliche Spezifität gegenüber Zucker
- Zwei Lektine sollten eine hohe Affinität zu den gleichen Zuckern haben
- Ein Lektin sollte aus einer tierischen Quelle stammen
- Sie sollten unterschiedliche Molekulargewichte besitzen

Die Spezifitäten und die Molekulargewichte der ausgewählten Lektine sind in der Tab. 3.14 aufgeführt.

Tab. 3.14: Molekulargewicht und Spezifität der ausgewählten Lektine.

Lektin	Molekulargewicht [kDa]	Spezifität
Concanavalin A	104	α -D-Mannose, α -D-Glucose
Lentil	48	α -D-Mannose, α -D-Glucose
Wheat Germ Agglutinin	36	N-Acetyl- β -D-Glucosamin
<i>Viscum album I</i> Agglutinin	60 (bei hohen Konz. 115)	β -D-Galactose
<i>Ulex europaeus I</i> Agglutinin	170 (im Sauren 63)	α -L-Fucose
<i>Helix pomatia</i> Agglutinin	70	N-Acetyl- α -D-Galactosamin

Die Kohlenhydrate zur Beschichtung der Goldprismen wurden so gewählt, dass jedes Lektin an mindestens eine Oberfläche spezifisch bindet. Dabei wurden, bis auf N-Acetyl-D-Galactosamin, polymere Zucker verwendet. Folgende Kohlenhydrate wurden für das Lektin-Screening eingesetzt: Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae*, Stärke, Fucoidan aus *Fucus vesiculosus*, Hyaluronsäure aus *Streptococcus equi* und N-Acetyl-D-Galactosamin.

Die eigentlichen Messungen wurden alle in der gleichen Weise durchgeführt. Nach Spülen der zuckerbeschichteten Goldprismen mit PBS-Puffer wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA-Lösung (c=2 mg/ml in PBS-Puffer) passiviert. Dies war nötig, um ein falsch positives Ergebnis aufgrund von unspezifischem Binden der Lektine zu vermeiden. Nach BSA-Zugabe wurden fünf Spülschritte mit PBS-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die entsprechende Lektinlösung aufgegeben. Die Lektinlösungen wurden alle mit der gleichen Stoffmengenkonzentration von 1,92 nmol/ml in PBS-Puffer hergestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

Abb. 3.50 gibt die Mittelwerte der Signalzuwächse auf den verschiedenen beschichteten Goldprismen wieder.

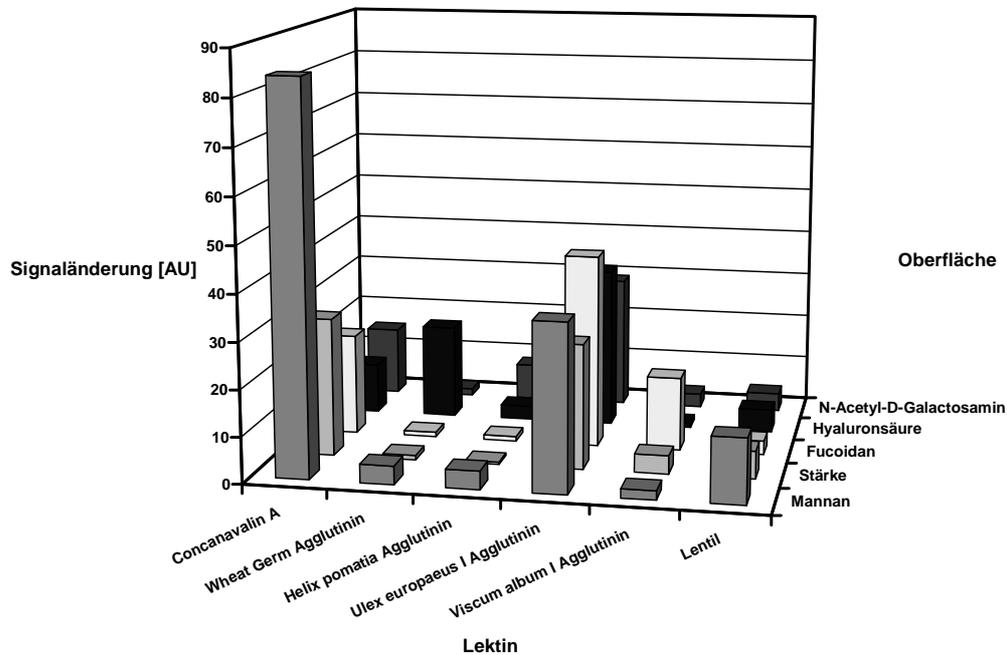


Abb. 3.50: Affinität verschiedener Lektine zu unterschiedlichen Zuckeroberflächen.

ConA führte auf einem mannanbeschichteten Goldprisma zu einem Signal von $84,0 \pm 3,9$ AU, auf einem stärkebeschichteten Prisma ergab sich ein Signal von $30,0 \pm 2,9$ AU. Für die anderen Zuckeroberflächen betragen die Zuwächse $22,0 \pm 3,3$ AU (Fucoidan), $11,0 \pm 2,2$ AU (Hyaluronsäure) und $15,0 \pm 3,1$ AU (N-Acetyl-D-Galactosamin).

Das Lektin aus *Lens culinaris*, welches die gleichen Spezifitäten wie ConA zeigen sollte, führte auf der Mannanoberfläche zu einem Signalzuwachs von $14,0 \pm 2,5$ AU. Auf der Stärkeoberfläche betrug das Signal $6,0 \pm 2,2$ AU. Die Zuwächse auf den „unspezifischen“ Zuckeroberflächen betragen $3,0 \pm 1,6$ AU (Fucoidan), $5,0 \pm 2,6$ AU (Hyaluronsäure) und $4,0 \pm 0,8$ AU (N-Acetyl-D-Galactosamin).

Das Wheat Germ Agglutinin aus *Triticum vulgare* sollte eine Affinität zu N-Acetyl- β -D-Glucosamin (Baustein der Hyaluronsäure) zeigen. Das Signal lag auf der Hyaluronsäuroberfläche bei $20,5 \pm 1,1$ AU. Der Zuwachs auf der Mannanoberfläche betrug $4,0 \pm 0,8$ AU. Auf stärke-, fucoidan- und N-Acetyl-D-Galactosaminbeschichteten Goldprismen lagen die Signalzuwächse im Bereich des Grundrauschens (Stärke 1,0 AU, Fucoidan 1,0 AU, N-Acetyl-D-Galactosamin 1,5 AU).

Das Lektin aus *Helix pomatia* zeigte nur auf der N-Acetyl-D-Galactosaminoberfläche einen nennenswerten Zuwachs von $8,0 \pm 0,9$ AU. Dieses korreliert mit der

beschriebenen Spezifität des Lektins gegenüber N-Acetyl-D-Galactosamin. Sehr geringe Zuwächse waren auf Stärke-, bzw. Fucoidanoberflächen zu verzeichnen (Stärke 0,5 AU, Fucoidan 1,0 AU). Die Signalzuwächse auf Hyaluronsäure-, bzw. Mannanprismen lagen bei $3,0 \pm 0,8$ AU bzw. $4,0 \pm 0,8$ AU.

Das Lektin aus *Viscum album I* erzeugte ein Signal von $16,0 \pm 2,2$ AU auf der Fucoidanoberfläche. Das Lektin sollte eine Spezifität gegenüber Glactose haben. Die Signalzuwächse auf den anderen Zuckeroberflächen waren $4,0 \pm 1,4$ AU (Stärke), $3,0 \pm 0,8$ AU (N-Acetyl-D-Galactosamin), auf mannan- und hyaluronsäurebeschichteten Prismen waren die Signale im Bereich des Grundrauschens (Mannan 2,0 AU, Hyaluronsäure 1,0 AU).

Das Lektin *Ulex europaeus I* weist eine Spezifität zu α -L-Fucose auf. Der Signalzuwachs auf dieser Oberfläche betrug $42,0 \pm 4,1$ AU. Die Zuwächse auf den weiteren Zuckeroberflächen waren zwischen 27,0 AU und 36,0 AU (Mannan $36,0 \pm 3,3$ AU, Stärke $27,0 \pm 5,7$ AU, Hyaluronsäure $35,0 \pm 2,9$ AU und N-Acetyl-D-Galactosamin $29,0 \pm 4,6$ AU).

Zur internen Beurteilung der Bindungsfähigkeit jedes einzelnen Lektins zu den verschiedenen immobilisierten Kohlenhydraten wurden die Messreihen normiert. Der höchste Signalzuwachs wurde für jedes Lektin gleich 100 % gesetzt. Die Zuwächse auf den weiteren Zuckeroberflächen wurden dazu in Relation gebracht (Abb. 3.51).

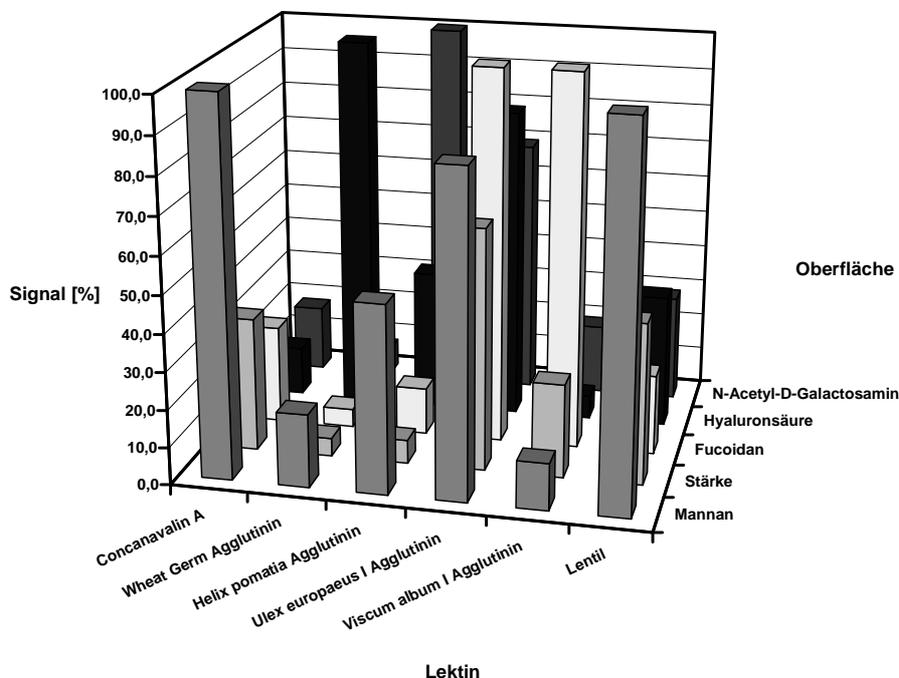


Abb. 3.51: Normierte Darstellung der Affinität der Lektine zu unterschiedlichen Zuckeroberflächen.

Das Lektin Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis* wies die größte Affinität zu der Mannanoberfläche auf (100 %). Die Bindung zu den anderen Oberflächen betrug 26,2 % (Fucoidan), 35,7 % (Stärke), 13,1 % (Hyaluronsäure) und 17,9 % (N-Acetyl-D-Galactosamin).

Lentil aus *Lens culinaris* hatte das größte Bindungsvermögen auf der Mannanoberfläche. Auf den anderen Oberflächen betrug die Bindung 42,9 % (Stärke), 35,7 % (Hyaluronsäure), 28,6 % (N-Acetyl-D-Galactosamin) und 21,4 % (Fucoidan).

Das *Viscum album* I Agglutinin (VAA I) und das Lektin aus *Ulex europaeus* I hatten das größte Bindungsvermögen auf der Fucoidanoberfläche. In dem Bindungsverhalten zu den weiteren Zuckeroberflächen unterschieden sich beide Lektine. Das Bindungsvermögen für VAA I lag bei 12,5 % (Mannan), 25,0 % (Stärke), 6,3 % (Hyaluronsäure), 18,8 % (N-Acetyl-D-Galactosamin). *Ulex europaeus* I Agglutinin (UEA I) wies folgende Bindungen auf: 85,7 % (Mannan), 64,3 % (Stärke), 83,3 % (Hyaluronsäure), 69,0 % (N-Acetyl-D-Galactosamin).

Das Wheat Germ Agglutinin (WGA) aus *Triticum vulgare* hatte den größten Bindungswert auf der Hyaluronsäuroberfläche. Auf den anderen Oberflächen waren die Werte für die Bindung gering. Im Einzelnen betrug sie für Mannan (19,5 %), Stärke (4,9 %), Fucoidan (4,9 %) und N-Acetyl-D-Galactosamin (7,3 %).

Das *Helix pomatia* Agglutinin (HPA) zeigte die größte Bindung zu N-Acetyl-D-Galactosamin. Für die anderen Zuckeroberflächen waren die Affinitäten wie folgt: 50,0 % (Mannan), 37,5 % (Hyaluronsäure), 12,5 % (Fucoidan) und 6,3 % (Stärke).

3.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze des ConA-Mannan-Systems

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von ConA wurde eine Konzentrationsreihe von ConA-Lösungen hergestellt, die einen Bereich von 0,5 - 1000 µg/ml umfasste. Die Abhängigkeit des Messsignals von unterschiedlichen ConA-Konzentrationen ist in Abb. 3.52 dargestellt.

Die Signaländerungen lagen bei 3,0 AU (0,5 µg/ml), 5,0 AU (2 µg/ml), 9,0 AU (5 µg/ml), 14,0 AU (10 µg/ml), 33,0 AU (20 µg/ml), 46,0 AU (50 µg/ml), 62,0 AU (75 µg/ml), 68,0 AU (100 µg/ml), 84,0 AU (200 µg/ml), 99,0 AU (300 µg/ml), 130,0 AU (600 µg/ml), 134,0 AU (1000 µg/ml).

Eine Konzentration größer 600 µg/ml ConA führte nicht zu entscheidend höheren Messsignalen. Daher ist davon auszugehen, dass alle möglichen Bindungsstellen für das Mannan auf der Oberfläche belegt waren. Die Nachweisgrenze (das Dreifache des Grundrauschens von 0,4 AU) war kleiner 0,5 µg/ml und die Bestimmungsgrenze (das Zehnfache des Grundrauschens von 0,4 AU) war im Bereich von 0,5 – 2 µg/ml ConA erfüllt.

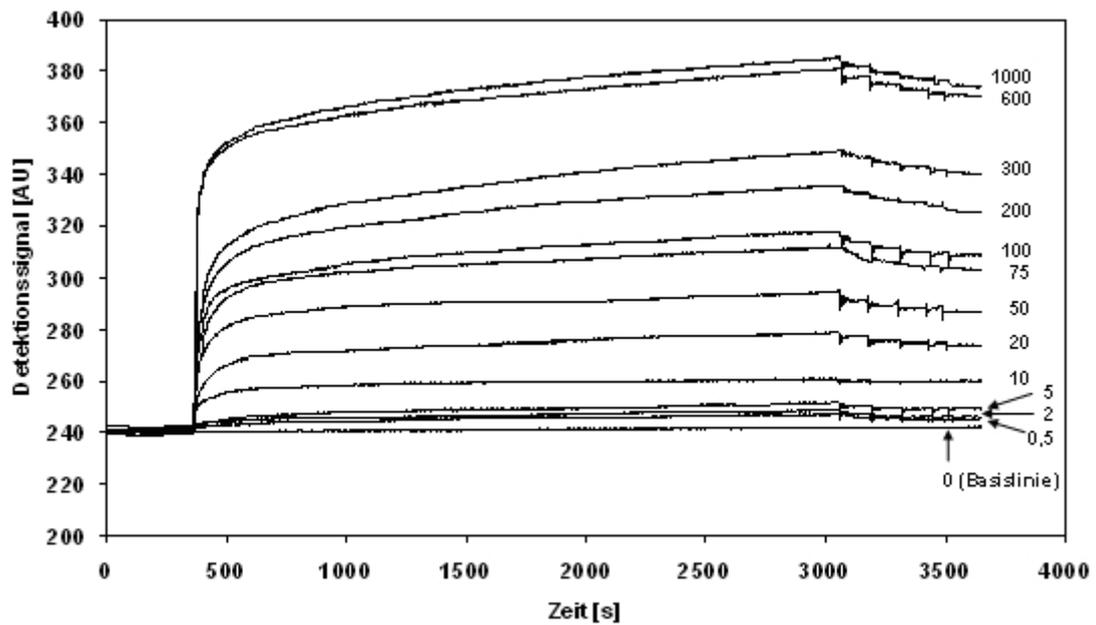


Abb. 3.52: Abhängigkeit des Messsignals von der ConA-Konzentration [µg/ml].

Der dynamische Bereich lag bei 2 bis 600 µg/ml (Abb. 3.53). Die Signaländerungen waren wie folgt: 0,5 µg/ml $2,7 \pm 0,6$ AU, 2 µg/ml $6,0 \pm 1,7$ AU, 5 µg/ml $8,7 \pm 1,5$ AU, 10 µg/ml $14,0 \pm 2,0$ AU, 20 µg/ml $32,3 \pm 4,0$ AU, 50 µg/ml $47,3 \pm 4,2$ AU, 75 µg/ml $63,0 \pm 4,6$ AU, 100 µg/ml $67,3 \pm 6,0$ AU, 200 µg/ml $82,0 \pm 6,2$ AU, 300 µg/ml $101,3 \pm 3,2$ AU, 600 µg/ml $129,0 \pm 3,6$ AU, 1000 µg/ml $133,7 \pm 4,5$ AU.

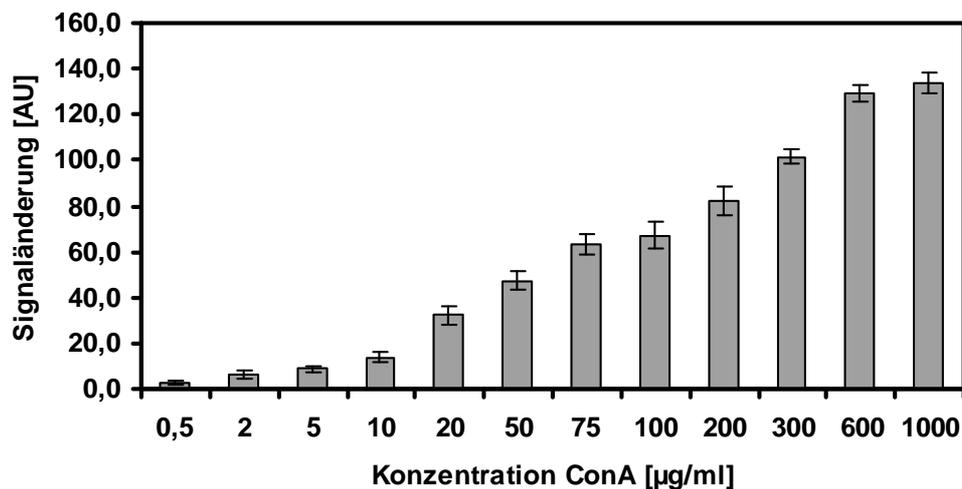


Abb. 3.53: Dynamischer Bereich der Interaktion von ConA mit einer Mannanoberfläche.

3.1.2 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante

Die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante ($k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$) für das ConA-Mannan-System wurde nach der Methode von Edwards und Leatherbarrow (1997) durchgeführt.

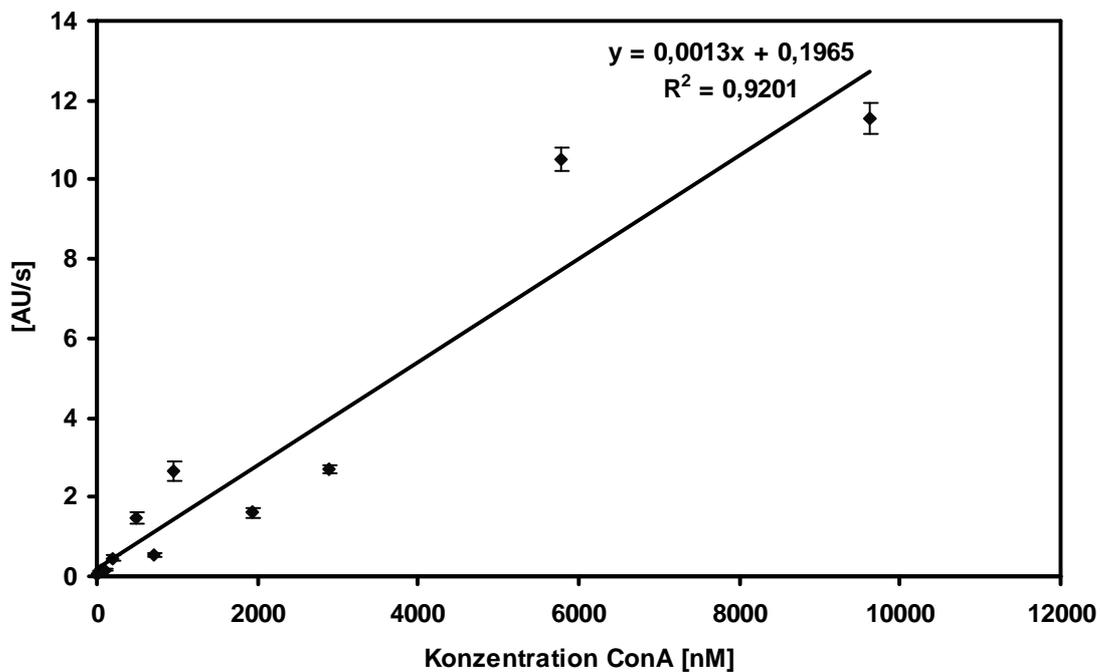


Abb. 3.54: Auftragung der initialen Bindungsraten von ConA gegen die ConA-Konzentration. Nach Edwards und Leatherbarrow (1997) kann die Assoziationskonstante k_{ass} aus der Steigung berechnet werden.

Die Assoziationskonstante wurde gemäß der Gleichung 2.3 berechnet (Abb. 3.54). Der Wert für k_{ass} lag bei $9,70 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziationskonstante (k_{diss}) wurde mit Hilfe der Gleichung 2.6 berechnet und betrug für ConA $k_{\text{diss}} = 3,95 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Hieraus resultiert ein K_D -Wert (Gleichung 2.2) von $4,07 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

3.2 Krebszellen unter Einfluss von Concanavalin A

Auf der Goldoberfläche des SPR-Sensors wurde versucht, ein Zucker-Lektin-Sandwich zu erzeugen. Dabei erfolgte die Immobilisierung der Zellen über Glykostrukturen an der Außenseite der Zellmembran (Abb. 3.55).

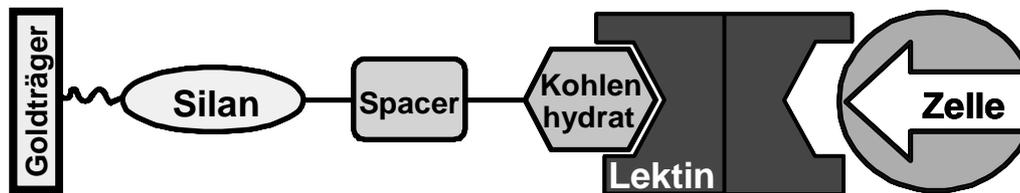


Abb. 3.55: Schematische Darstellung eines Schichtaufbaus auf der Goldoberfläche eines SPR-Sensors. Dabei können ganze Zellen über eine multivalente Lektinschicht immobilisiert werden.

Da bis dato keine Messungen mit eukaryotischen Zellen unter zu Hilfenahme des Plasmonic[®] SPR-Gerätes durchgeführt wurden, war zunächst zu prüfen, ob eine Messung mit Zellen hiermit möglich ist.

Die Ergebnisse aus dem Lektin-Screening (Kapitel 3.1) zeigten, dass die Bindung von ConA an Mannan den höchsten relativen Schichtdickenzuwachs aufwies. Daher wurde dieses Zucker-Lektin-System als Immobilisierungsgrundlage für die Messreihen mit den Krebszellen auf der SPR-Plattform gewählt. Das Bindungsverhalten von NCI-H125- und Lewis Lung Carcinom Zellen wurde nun an Mannan bzw. ConA untersucht.

Die folgenden zwei Messreihen wurden mit beiden Zelllinien durchgeführt:

Messreihe 1: Immobilisierung der Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldprisma *ohne* BSA Passivierung.

Die Immobilisierung der Zellen erfolgte dabei über Glykoproteinstrukturen der Zellmembran direkt auf einem mannanbeschichteten Goldprisma, durch Nutzung der unspezifischen sowie der spezifischen Bindungsstellen (vgl. Abb. 3.55 ohne Lektin im Schichtaufbau).

Mit dieser Versuchsreihe sollte das grundlegende Verhalten von Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldprisma untersucht werden.

Messreihe 2: Immobilisierung der Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldprisma *mit* BSA Passivierung.

Hier erfolgte die Immobilisierung der Zellen als erstes ebenfalls über Glykoproteinstrukturen direkt auf der Mannanoberfläche. In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde ConA auf der Mannanoberfläche gebunden, an das die Zellen über ihre Glykostrukturen auf der

Zellmembranoberfläche immobilisiert wurden (vgl. Abb. 3.55). Bei dieser Messreihe standen nach BSA Passivierung nur die spezifischen Bindungsstellen zur Verfügung.

Die in den Testreihen verwendeten Reagenzien hatten folgende Konzentrationen:

- BSA Lösung $c=200 \mu\text{g/ml}$
- Mannan Lösung $c=2,5 \text{ mg/ml}$
- ConA-Lösung $c=310 \mu\text{g/ml}$
- NCI-H125- und LLC-Zellen je 8000 Zellen/Messspot

Nach jeder Reagenzienzugabe erfolgten fünf Spülschritte mit PBS-Puffer.

Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.1 Immobilisierung von NCI-H125-Zellen

Als Modellzellen wurden Zellen der Zelllinie NCI-H125 verwendet. Zur Immobilisierung wurden diese auf ein mannanbeschichtetes Goldprisma gegeben, wo sie sich durch Selbstorganisation anordneten. Die Zellen sollten in der Lage sein, einen dichten Zellrasen auszubilden.

Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) NCI-H125

Die Einteilung der Bronchialkarzinome erfolgt in zwei Bereiche, zum einen in das nicht kleinzellige (Non Small Cell Lung Cancer) und zum anderen in das kleinzellige (Small Cell Lung Cancer) Bronchialkarzinom.

Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom NCI-H125 stammt von einer Hautmetastase eines Patienten mit Adenokarzinom der Lunge, welche vor Therapiebeginn entnommen wurde. Die Zellen sind mittelgroß und gering kohäsiv. In der Monolayerkultur wachsen die Tumorzellen adhärent. Die Adenokarzinome produzieren Muzine und sind immunohistochemisch anfärbbar.

3.2.1.1 Immobilisierung von NCI-H125-Zellen ohne BSA Passivierung

Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldprisma zu immobilisieren und dies mit der SPR-Messmethode zu detektieren. Die Immobilisierung sollte über Glykoproteinstrukturen der Zellmembran erfolgen.

Als Kontrollversuch wurden die Zellen auf eine reine Goldoberfläche gegeben.

Messreihe 1.1: Zellen

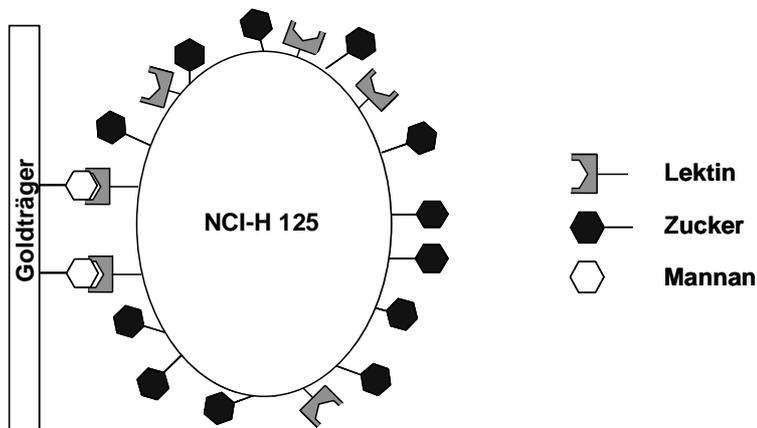


Abb. 3.56: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger.

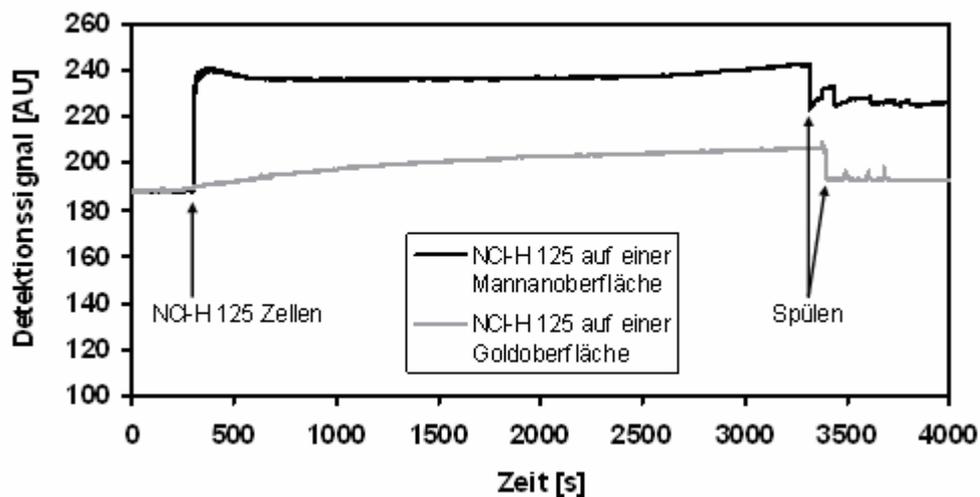


Abb. 3.57: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einer Mannanoberfläche. Als Kontrollversuch wurden die NCI-H125-Zellen auf die unbeschichtete Goldoberfläche gegeben.

Die Bindungskurve auf der Mannanoberfläche zeigte einen steilen Anstieg in der Assoziationsphase (Zeit nach Zugabe der Zellen bis zum Erreichen des maximalen Messsignals) der Zellen und ergab einen Signalzuwachs von 41,0 AU. Nach Erreichen des Maximums sinkt das Messsignal um ca. 5 AU ab, bleibt konstant, bis es am Ende der Inkubationsphase wieder um ca. 5 AU ansteigt (Abb. 3.57). Der direkte Abfall des Messsignals nach Erreichen des Maximums ist untypisch (vgl. folgende Messreihen).

Im Kontrollversuch zeigte die Bindungskurve der Zellen über den gesamten Messzeitraum einen sehr flachen Anstieg. Nach den Spülschritten betrug der Signalzuwachs 5,0 AU (Abb. 3.57).

Messreihe 1.2: Zellen – Mannan – ConA

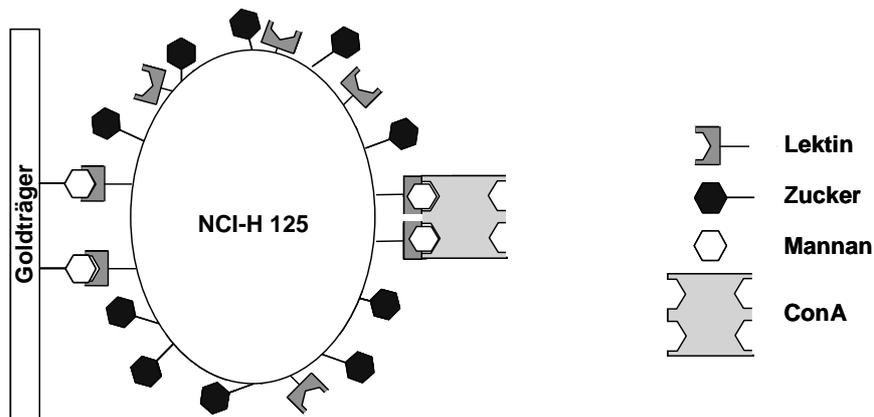


Abb. 3.58: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-Mannan-ConA.

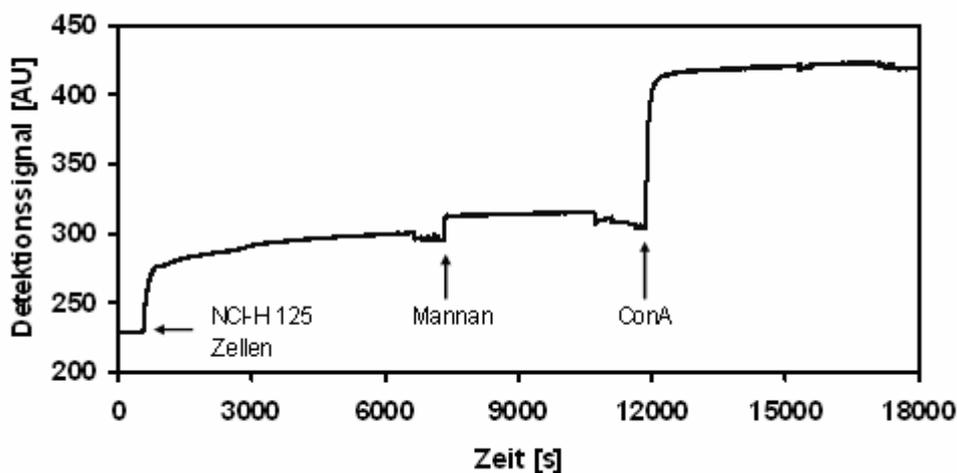


Abb. 3.59: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen, die noch weiter mit Mannan und ConA behandelt wurden.

Nach der Immobilisierung der NCI-H125-Zellen ergab sich ein Signalzuwachs von 67,0 AU. In der Assoziationsphase der Zellen zeigt die Bindungskurve einen relativ steilen Anstieg. Während der Inkubationsphase ist ein weiterer leichter Anstieg zu verzeichnen. Die Zugabe von Mannan ergab eine Signaländerung von 8,0 AU. Dies zeigt sich in einem geringen, steilen Anstieg. Für ConA wurde ein Signalzuwachs von

115,0 AU gemessen. Die Form der ConA Bindungskurve (sehr steiler Anstieg, Höhe der Kurve) ist typisch für die Spezifität zu Mannan (Abb. 3.59).

Messreihe 1.3: Zellen – ConA – Mannan – ConA

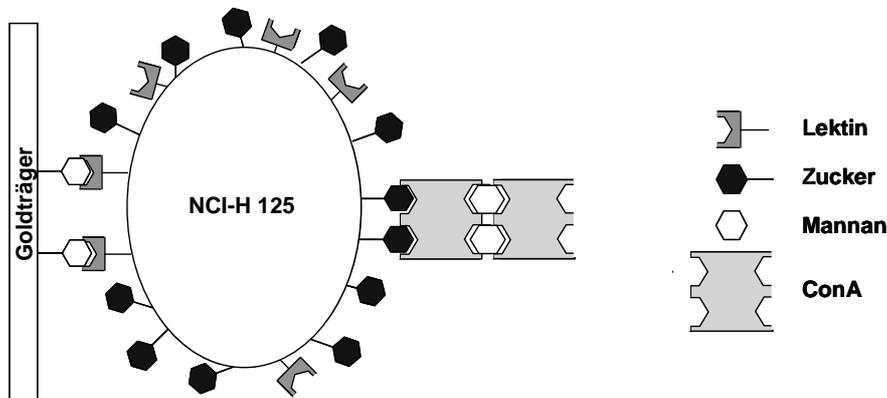


Abb. 3.60: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA-Mannan-ConA.

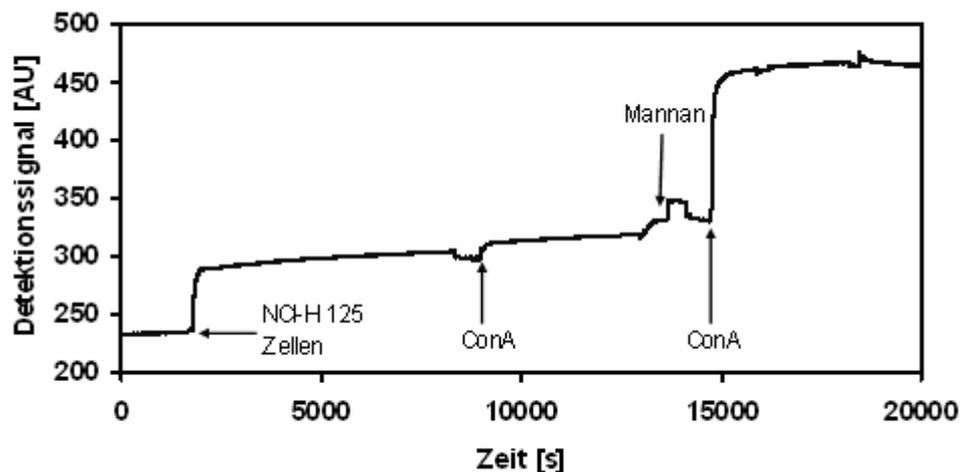


Abb. 3.61: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen, die noch weiter mit ConA-Mannan-ConA behandelt wurden.

Nach der Immobilisierung der NCI-H125-Zellen wurde auf den immobilisierten Zellen ein Sandwich in der Form ConA-Mannan-ConA etabliert. Die Signalzuwächse betragen für die NCI-H125-Zellen 64,0 AU, erste Zugabe ConA 21,0 AU, Mannan 9,0 AU, zweite Zugabe ConA 134,0 AU (Abb. 3.61). Die Bindungskurve der Zellen zeigt ein ähnliches Verhalten wie in Messreihe 1.2. Die erste ConA-Zugabe weist einen sigmoiden Verlauf mit geringer Kurvenhöhe auf. Der Kurvenverlauf für Mannan ist relativ flach, die Höhe der Kurve ist gering. Der „Sprung“ im Sensorgramm nach der Mannanzugabe ist auf

Brechungsindexphänomene zurückzuführen. Die zweite Zugabe von ConA zeigt ein spezifisches Bindungsverhalten zu Mannan (vgl. Messreihe 1.2).

3.2.1.2 Immobilisierung von NCI-H125-Zellen mit BSA Passivierung

Um die Versuche zum Verhalten der Zellen auf der SPR-Plattform zu vertiefen, sollten in dieser Messreihe nur die möglichen spezifischen Bindungen zur Immobilisierung auf einem mannanbeschichteten Träger genutzt werden. Um dies zu erreichen wurden die unspezifischen Bindungen zu Beginn eines jeden Tests mit BSA passiviert.

Es wurden zwei unterschiedliche Immobilisierungsstrategien verfolgt:

1. Immobilisierung der Zellen direkt auf der Mannanoberfläche.
2. Immobilisierung der Zellen auf ConA, welches zuvor auf der Mannanoberfläche gebunden wurde.

Immobilisierung der NCI-H125 direkt auf der Mannanoberfläche

In der ersten Serie wurden zunächst die NCI-H125-Zellen immobilisiert. An diese sollte ConA bzw. Mannan spezifisch binden. Im letzten Schritt erfolgte die Anlagerung von NCI-H125-Zellen (an ConA) bzw. ConA (an Mannan).

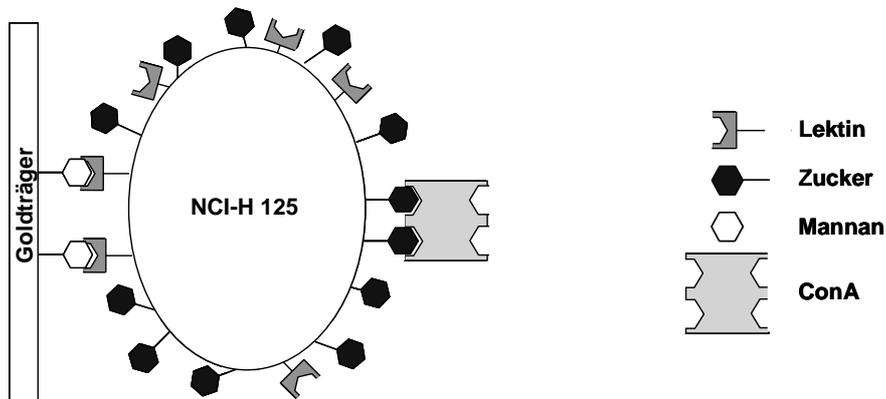
Messreihe 2.1: Zellen – ConA

Abb. 3.62: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA.

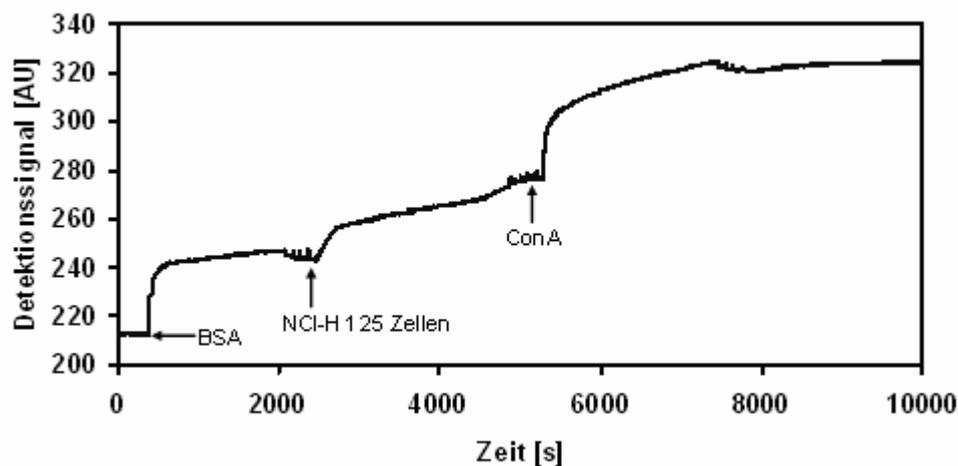


Abb. 3.63: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen, die noch weiter mit ConA behandelt wurden.

Nach der Immobilisierung der Zellen ergab sich eine Änderung des Detektionssignals von 26,0 AU. Die Bindungskurve der Zellen zeigt in der Assoziationsphase einen relativ flachen Anstieg. Vor den Spülschritten der ConA-Zugabe zum Ende der Inkubationsphase steigt das Messsignal leicht an. Die Anlagerung von ConA an die NCI-H125-Zellen resultierte in einem Signalzuwachs von 43,0 AU. Die Bindungskurve verläuft steil und ist relativ hoch (Abb. 3.63).

Messreihe 2.2: Zellen – ConA – Zellen

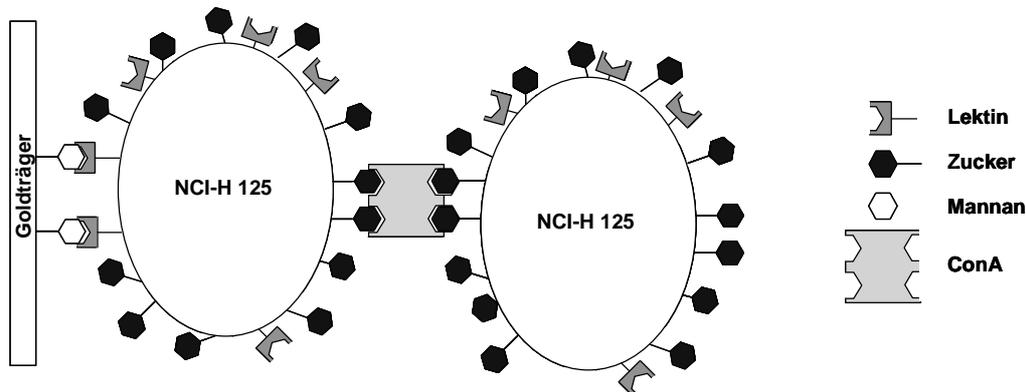


Abb. 3.64: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA-Zellen.

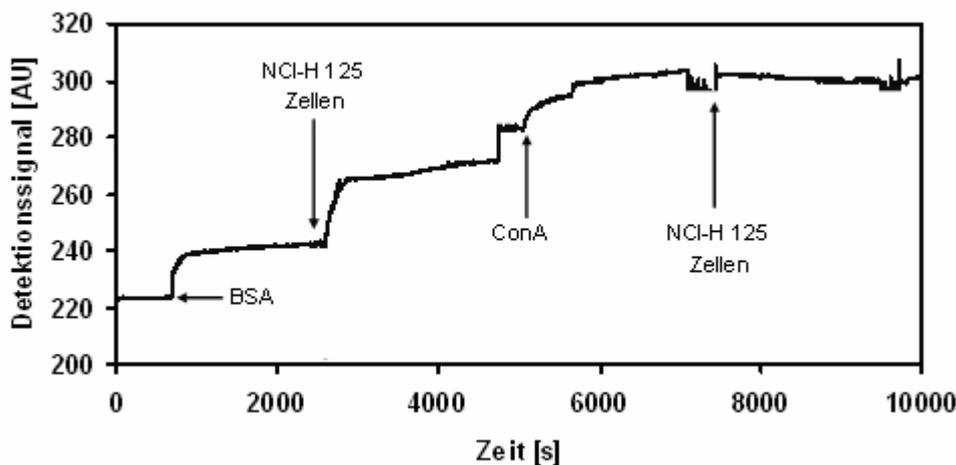


Abb. 3.65: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen. Aufbau einer Sandwichstruktur der Form Zellen-ConA-Zellen.

Auf der passivierten Mannanoberfläche wurde ein Zellen-ConA-Zellen Sandwich aufgebaut, wobei die einzelnen Signalzuwächse wie folgt waren: Erste Zellzugabe 30,0 AU, ConA 14,0 AU, zweite Zellzugabe 0 AU (Abb. 3.65). In der Assoziationsphase der Zellen zeigt die Bindungskurve einen steileren und in der der Inkubationsphase einen flacheren Anstieg als in der vorherigen Messreihe. Der „Sprung“ beim Beginn der Spülschritte vor der ConA-Zugabe ist auf Brechungsindexeffekte zurückzuführen und darf somit nicht als Signaländerung im Sinne einer Anlagerung verstanden werden. Das gleiche Phänomen war während der Inkubationszeit nach der ConA-Zugabe zu beobachten. Die Bindungskurve der zweiten Zellzugabe sah untypisch (kein sigmoider Verlauf) aus und resultierte nicht in einem Signalzuwachs.

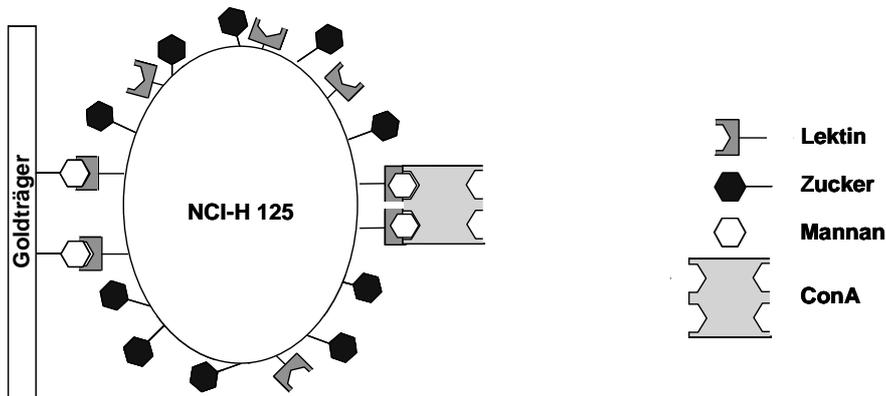
Messreihe 2.3: Zellen – Mannan – ConA

Abb. 3.66: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanchichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-Mannan-ConA.

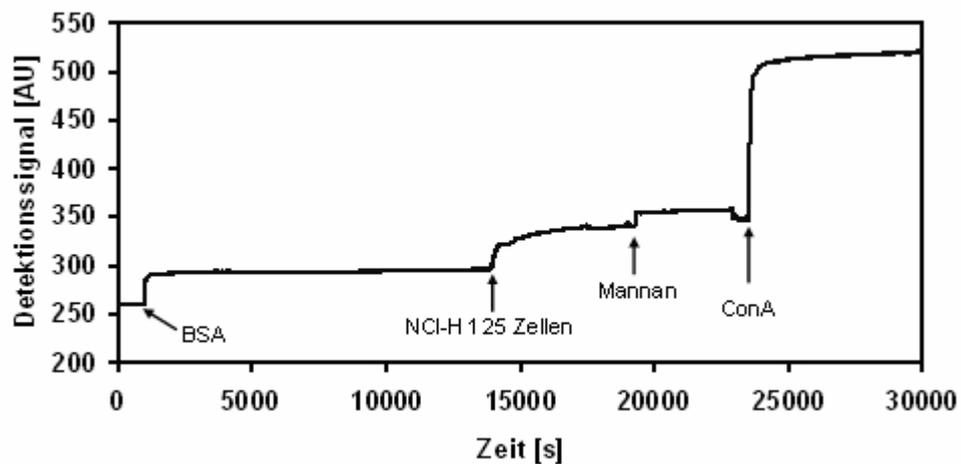


Abb. 3.67: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen, die noch weiter mit Mannan und ConA behandelt wurden.

Die NCI-H125-Zellen zeigten nach der Immobilisierung eine Änderung des Detektionssignals von 42,0 AU. Die Bindungskurve der Zellen zeigte den gleichen Verlauf wie in der Messreihe 2.2. Die Interaktion des Mannans mit den Zellen führte zu einem Signal von 10,0 AU und Con A zeigte einen Signalzuwachs von 171,0 AU (Abb. 3.67). Der Sensorgrammverlauf für Mannan ist sprunghaft (stufenförmig). Der Verlauf und die Höhe der Bindungskurve für ConA sind typisch für die spezifische Interaktion mit Mannan.

Immobilisierung der NCI-H125-Zellen auf ConA

In der zweiten Serie wurde als erster Schritt des Schichtaufbaus ConA immobilisiert. An dieses sollten die NCI-H125-Zellen spezifisch (über Glykostrukturen) binden. Die Testreihe hatte den in Abb. 3.68 dargestellten Basis-Schichtaufbau. Dieser wurde durch weitere Anlagerungen von ConA und Zellen erweitert (vgl. Abb. 3.70 und Abb. 3.72).

Messreihe 2.4: ConA – Zellen

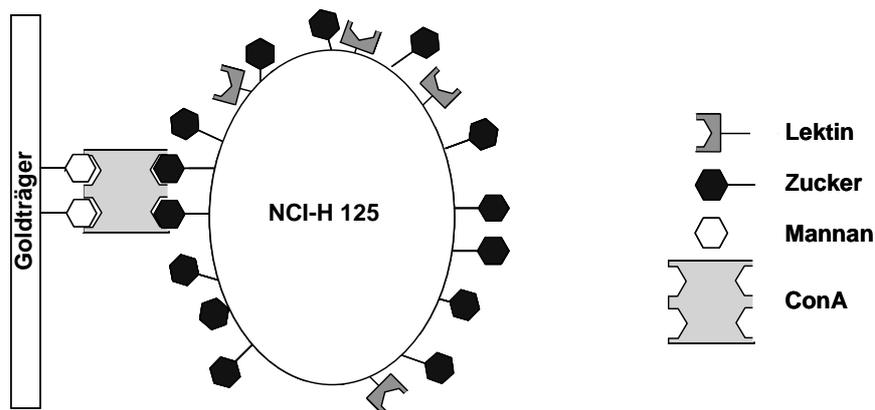


Abb. 3.68: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen.

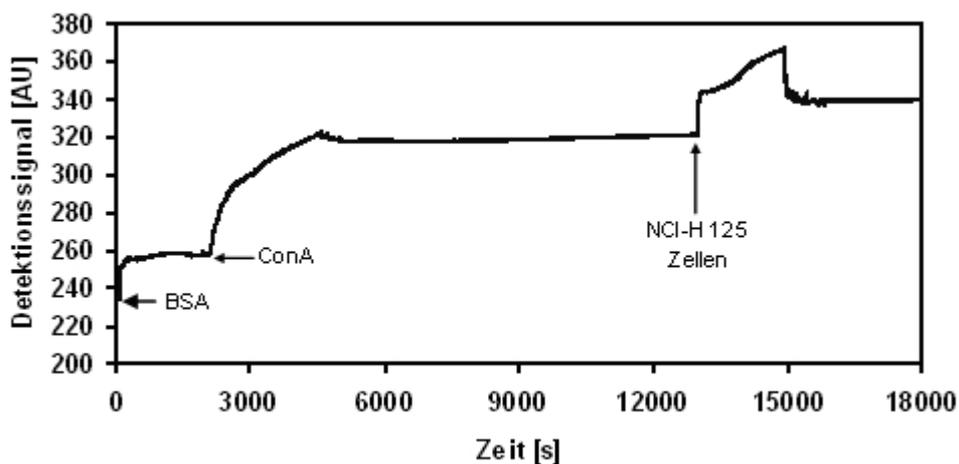


Abb. 3.69: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf ConA.

An das immobilisierte ConA, welches das typische Mannan-ConA Bindungsverhalten zeigt, wurden NCI-H125-Zellen angelagert. Die Signaländerung für ConA betrug 60,0 AU. Die Bindung der NCI-H125-Zellen ergab ein Signal von 18,0 AU.

Nach dem sprunghaften Anstieg der Bindungskurve in der Assoziationsphase steigt das Messsignal der Zellen zum Schluss der Inkubationszeit stark an (Abb. 3.69).

Messreihe 2.5: ConA – Zellen – ConA

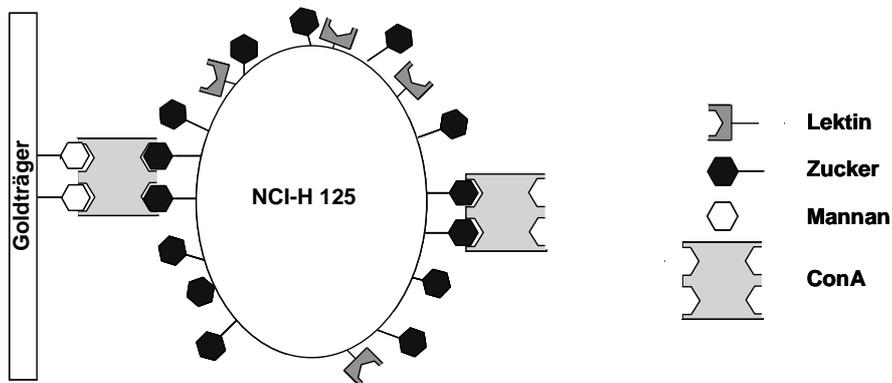


Abb. 3.70: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen-ConA.

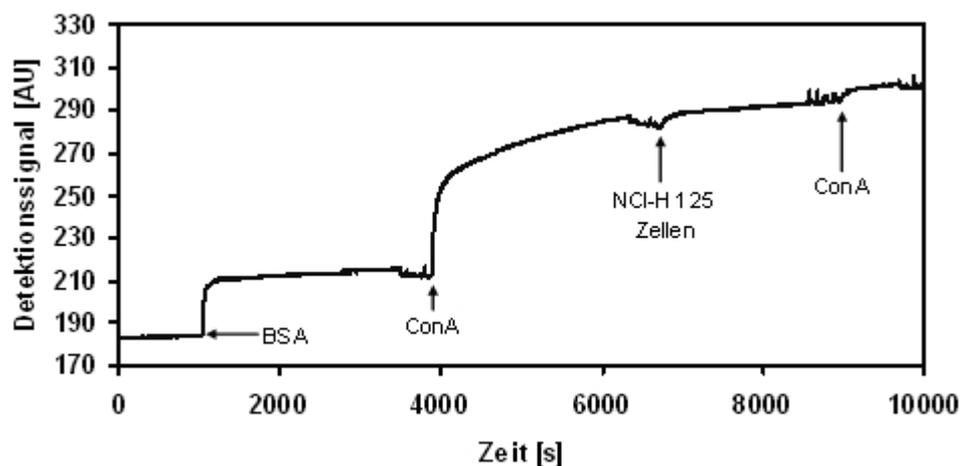


Abb. 3.71: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf ConA. Aufbau einer Sandwichstruktur der Form ConA-Zellen-ConA.

Bei dieser Messreihe wurden die NCI-H125-Zellen zwischen zwei Schichten Concanavalin A immobilisiert. Die einzelnen Signalzuwächse waren wie folgt: Erste Zugabe ConA 78,0 AU, NCI-H125-Zellen 7,0 AU und zweite Zugabe ConA 9,0 AU (Abb. 3.71). ConA zeigt einen typischen Kurvenverlauf für die Interaktion mit der passivierten Mannanoberfläche. Die Bindungskurve der Zellen verläuft in der Assoziationsphase relativ flach und resultiert in einem geringen Signalzuwachs am

Ende der Inkubationsphase. Die zweite ConA - Anlagerung war schwach, was an der flachen und niedrigen Bindungskurve erkennbar ist.

Messreihe 2.6: ConA – Zellen – ConA – Zellen

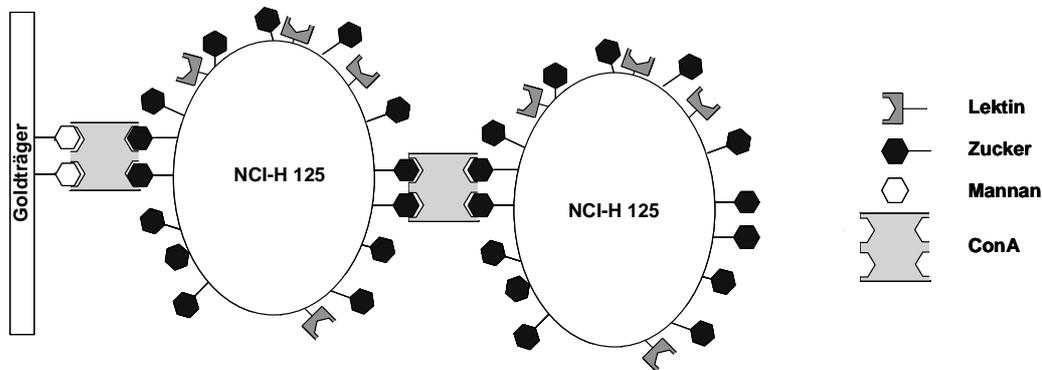


Abb. 3.72: Schema der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen-ConA-Zellen.

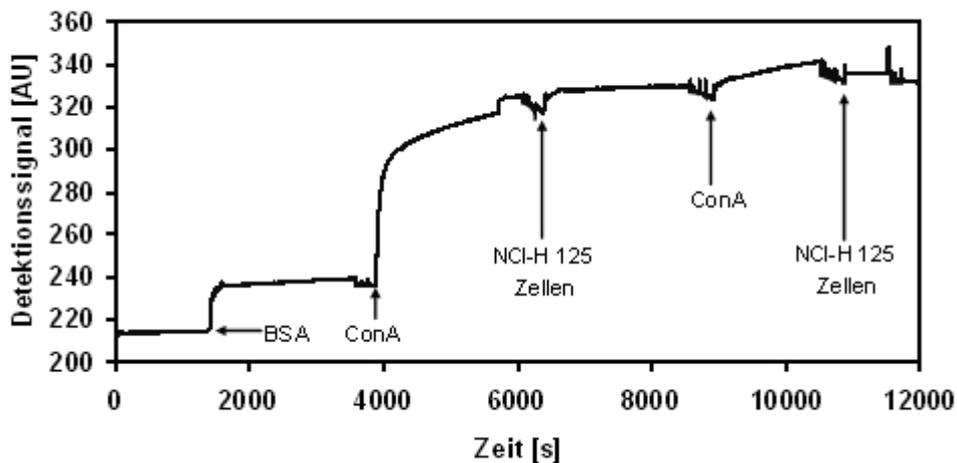


Abb. 3.73: Sensorgramm der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen auf ConA. Aufbau einer Doppelsandwichstruktur der Form ConA-Zellen-ConA-Zellen.

Auf der Mannanoberfläche des Goldträgers wurde ein Doppelsandwich in Form von ConA-Zellen-ConA-Zellen erzeugt. Der Signalzuwachs betrug für die erste ConA-Zugabe 82,0 AU, erste Zugabe Zellen 4,0 AU, zweite ConA-Zugabe 9,0 AU, zweite Zugabe Zellen 0 AU (Abb. 3.73). Der Kurvenverlauf ist prinzipiell identisch mit der Messreihe 2.5. Die Bindungskurve der zweiten Zellzugabe sah untypisch aus und resultierte in keinem Signalzuwachs.

3.2.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immobilisierung von NCI-H125-Zellen

Tab. 3.15 gibt die durchschnittlichen Detektionssignale der verwendeten Substanzen der Doppelbestimmung wieder. Eine Immobilisierung der NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger war grundsätzlich möglich. Es konnten verschiedene Schichtaufbauten mit dem Zucker-Lektin-System Mannan-ConA umgesetzt werden. Die Immobilisierung der Zellen war durch unspezifische und spezifische Interaktionen möglich, wobei die Bindungskurven zum Teil recht unterschiedlich aussahen.

Die relative Standardabweichung für die Messergebnisse der Zellimmobilisierung würde wahrscheinlich in einem Bereich von 30 – 40 % liegen. Dieser hohe Wert ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei Zellen um lebende Systeme handelt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist, aufgrund des möglichen unterschiedlichen Verhaltens auf dem SPR-Sensor, nicht so leicht zu bewerkstelligen.

Tab. 3.15: Mittelwerte [AU] der Signaländerungen der jeweiligen Substanzen nach Immobilisierung der NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger.

Messreihe	Immobilisierung von NCI-H 125 Zellen ohne BSA Passivierung				
1.1	Schichtaufbau	Zellen			
	Signaländerung [AU]	41,0			
1.2	Schichtaufbau	Zellen	Mannan	ConA	
	Signaländerung [AU]	66,5	8,0	115,0	
1.3	Schichtaufbau	Zellen	ConA	Mannan	ConA
	Signaländerung [AU]	63,5	21,0	9,0	132,0
Messreihe	Immobilisierung von NCI-H 125 Zellen mit BSA Passivierung				
2.1	Schichtaufbau	Zellen	ConA		
	Signaländerung [AU]	28,0	36,5		
2.2	Schichtaufbau	Zellen	ConA	Zellen	
	Signaländerung [AU]	39,5	13,0	4,0	
2.3	Schichtaufbau	Zellen	Mannan	ConA	
	Signaländerung [AU]	41,5	13,5	123,0	
2.4	Schichtaufbau	ConA	Zellen		
	Signaländerung [AU]	54,5	22,0		
2.5	Schichtaufbau	ConA	Zellen	ConA	
	Signaländerung [AU]	75,0	9,0	7,5	
2.6	Schichtaufbau	ConA	Zellen	ConA	Zellen
	Signaländerung [AU]	77,5	6,0	9,5	0,0
Kontrolle	Zellen auf Goldoberfläche	4 AU			

3.2.2 Immobilisierung von Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC)

Zur zielgerichteten Immobilisierung wurden LLC-Zellen gewählt. Die Zellen sollten auch in diesem Fall in der Lage sein einen dichten Zellrasen auszubilden. Als Immobilisierungsstrategien wurden dieselben wie in Kapitel 3.2.1 gewählt.

Lewis Lung Carcinom (LLC)

Das Lewis Lung Carcinom stammt von C57BL Mäusen, denen zuvor ein Lewis Lung Carcinom implantiert wurde. Die Zellen werden vornehmlich als Metastasierungsmodell und zur Untersuchung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika genutzt.

3.2.2.1 Immobilisierung von LLC-Zellen ohne BSA Passivierung

Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldprisma zu immobilisieren und dies mit der SPR-Messmethode zu detektieren. Die Immobilisierung sollte über Glykoproteinstrukturen der Zellmembran erfolgen.

Als Kontrollversuch wurden die Zellen auf eine reine Goldoberfläche gegeben.

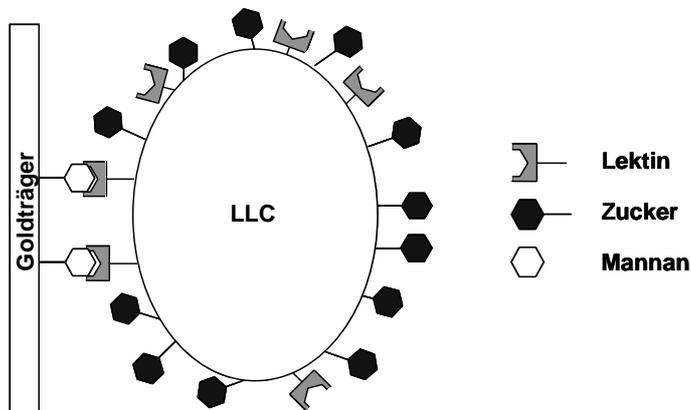
Messreihe 1.1: Zellen

Abb. 3.74: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger.

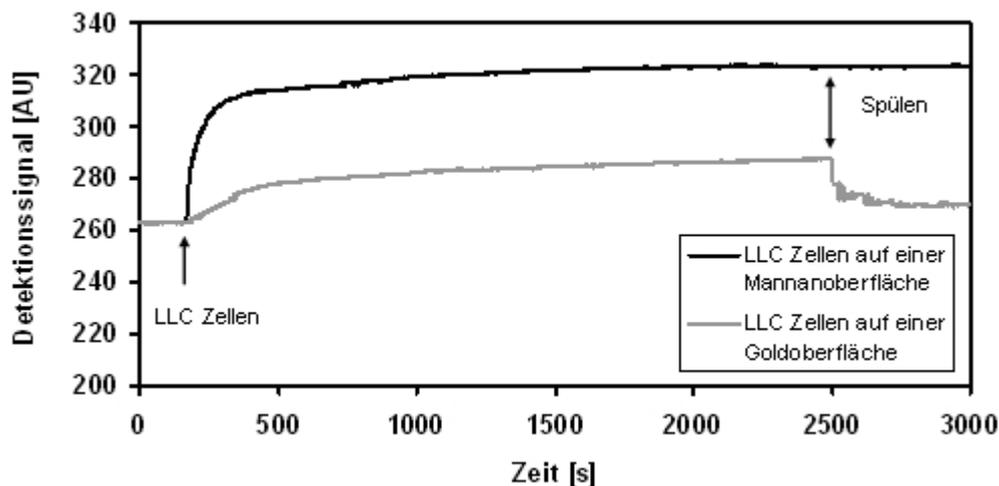


Abb. 3.75: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einer Mannanoberfläche.

Bei diesem Versuch wurden LLC-Zellen direkt auf einem mannanbeschichteten Goldträger immobilisiert. Nach Zugabe der Zellen ergab sich ein Signalzuwachs von 60,0 AU (Abb. 3.75). Der steile Anstieg und die Höhe der sigmoiden Bindungskurve in der Assoziationsphase lassen auf eine gute Interaktion der Zellen mit der Mannanoberfläche schließen. In der Inkubationsphase zeigt die Kurve einen gewünschten asymptotischen Verlauf. Nach den Spülschritten ist keine Veränderung des Messsignals zu verzeichnen.

Im Kontrollversuch zeigte die Bindungskurve der Zellen über den gesamten Messzeitraum einen sehr flachen Anstieg. Nach den Spülschritten betrug der Signalzuwachs 7,0 AU (Abb. 3.75).

Messreihe 1.2: Zellen – Mannan – ConA

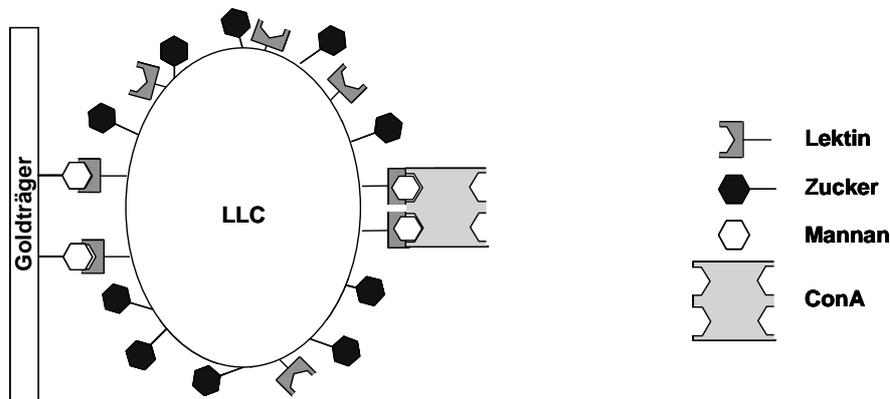


Abb. 3.76: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-Mannan-ConA.

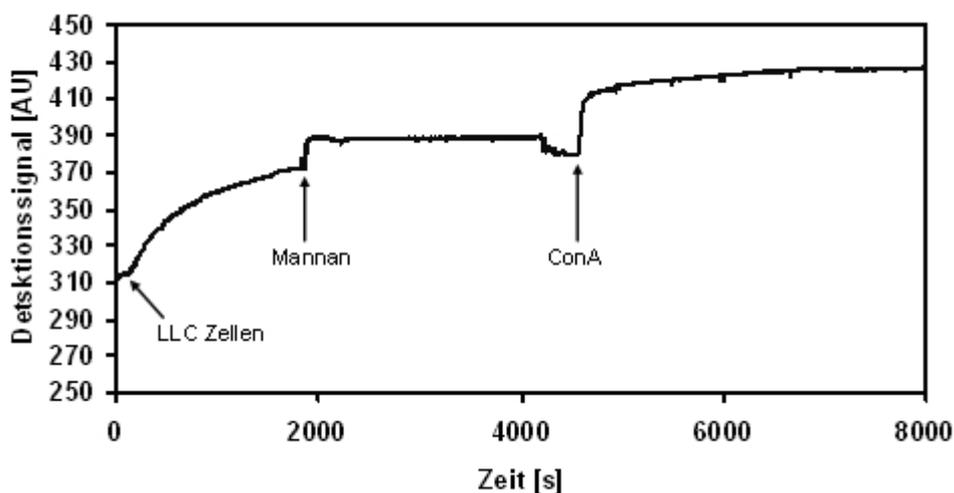


Abb. 3.77: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen, die noch weiter mit Mannan und ConA behandelt wurden.

Die Bindung der LLC-Zellen an die Mannanoberfläche führte zu einem Anstieg des Detektionssignal von 57,0 AU. Mannan zeigte einen Signalzuwachs von 6,0 AU und ConA interagiert mit dem Mannan unter einer Änderung des Signals von 52,0 AU (Abb. 3.77). Die Anlagerung der Zellen ist gut; die Bindungskurve ist jedoch in der Assoziationsphase im Vergleich zur vorherigen Messreihe relativ flach und steigt in der Inkubationsphase stetig an. Der Kurvenverlauf für Mannan ist sehr steil, die Kurvenhöhe ist mit 6,0 AU nach dem Spülen gering. ConA zeigt den typischen Kurvenverlauf für die Interaktion mit Mannan.

Messreihe 1.3: Zellen – ConA – Mannan – ConA

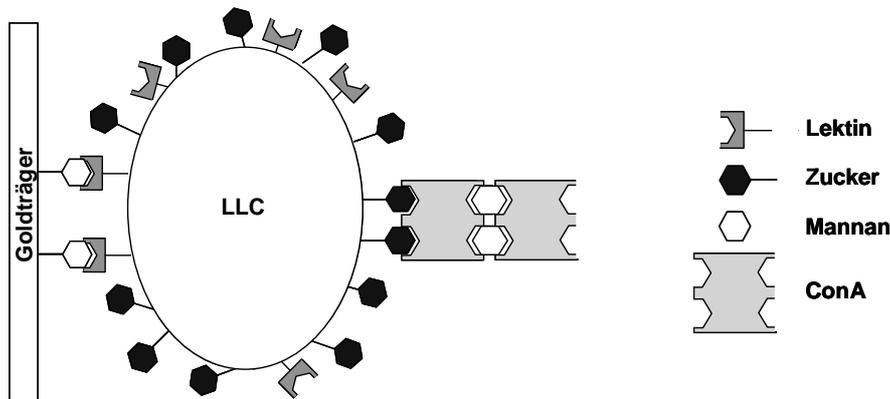


Abb. 3.78: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA-Mannan-ConA.

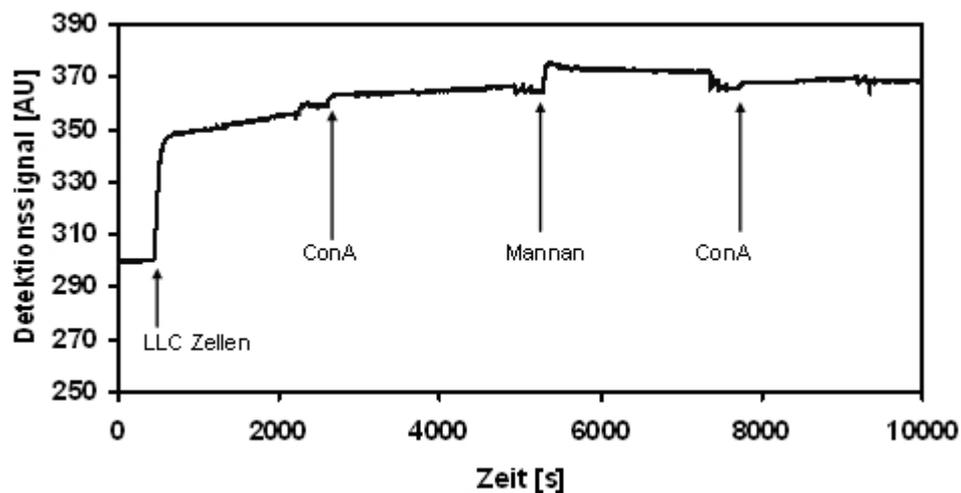


Abb. 3.79: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen, die noch weiter mit ConA-Mannan-ConA behandelt wurden.

Nach der Immobilisierung der LLC-Zellen wurde auf den immobilisierten Zellen ein Sandwich in der Form ConA-Mannan-ConA etabliert. Die Signalzuwächse betrugen für die LLC-Zellen 55,0 AU, erste Zugabe ConA 5,0 AU, Mannan 1,0 AU, zweite Zugabe ConA 3,0 AU (Abb. 3.79). Die Bindungskurve der Zellen ist in der Assoziationsphase sehr steil und weist eine gute Anlagerung an die Mannanoberfläche auf. Der Anstieg der Messkurve der ersten ConA-Zugabe ist steil, verläuft sigmoid und resultiert in einer geringen Höhe nach den Spülschritten. Für Mannan ist der Kurvenverlauf flacher, das Messsignal ist nach dem Spülen gering. Die zweite Zugabe von ConA (3,0 AU) zeigt kein spezifisches Bindungsverhalten zu Mannan.

3.2.2.2 Immobilisierung von LLC-Zellen mit BSA Passivierung

Wie in den Versuchen mit den NCI-H125-Zellen sollten auch mit den LLC-Zellen nur die spezifischen Bindungen zur Immobilisierung auf einem mannanbeschichteten Träger genutzt werden. Zur Passivierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde ebenfalls BSA verwendet.

Analog zu den NCI-H125-Zellen wurden zwei Versuchsserien mit BSA Passivierung durchgeführt.

Immobilisierung von LLC-Zellen direkt auf Mannan

In der ersten Serie wurden zunächst die LLC-Zellen immobilisiert. An diese sollte ConA bzw. Mannan spezifisch binden. Im letzten Schritt erfolgte die Anlagerung von LLC-Zellen (an ConA) bzw. ConA (an Mannan).

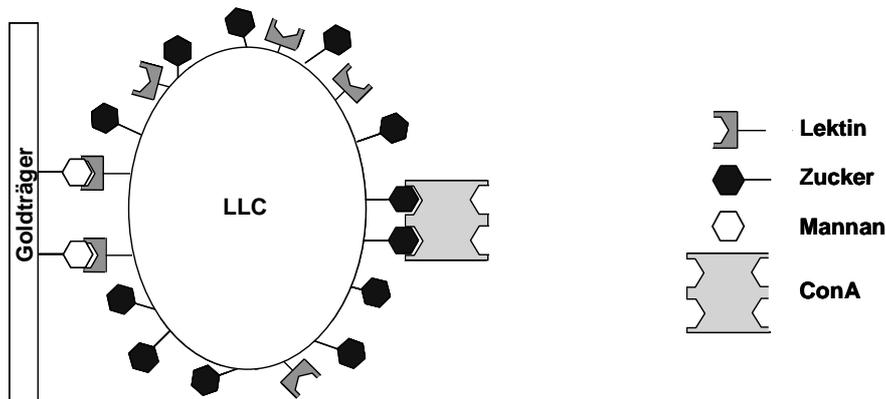
Messreihe 2.1: Zellen – ConA

Abb. 3.80: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA.

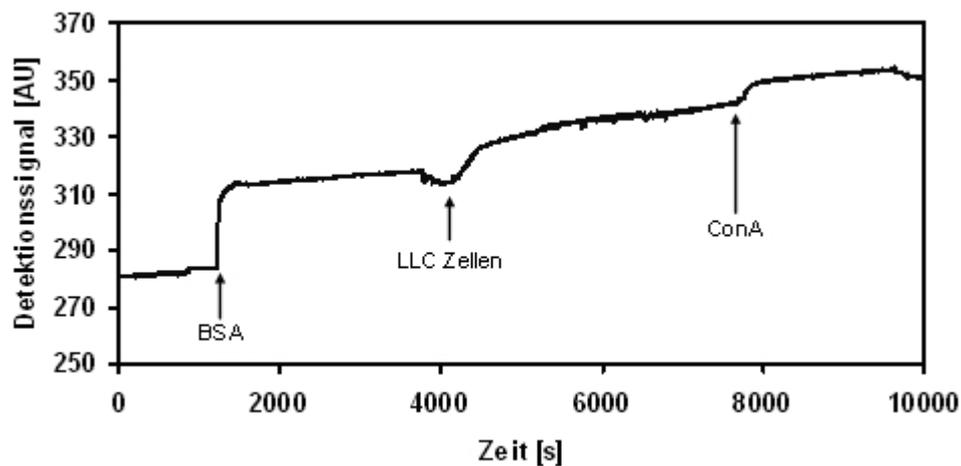


Abb. 3.81: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen, die noch weiter mit ConA behandelt wurden.

Die Änderung des Detektionssignals lag nach der Immobilisierung der LLC-Zellen auf der passivierten Mannanoberfläche bei 30,0 AU. Die Zugabe von ConA führte zu einem Signalzuwachs von 7,0 AU (Abb. 3.81). Die Bindungskurve der Zellen in der Assoziationsphase ist relativ flach und steigt zum Ende der Inkubationsphase an. Das Messsignal für ConA verläuft sigmoid und endet nach dem Spülen in einer geringen Kurvenhöhe.

Messreihe 2.2: Zellen – ConA – Zellen

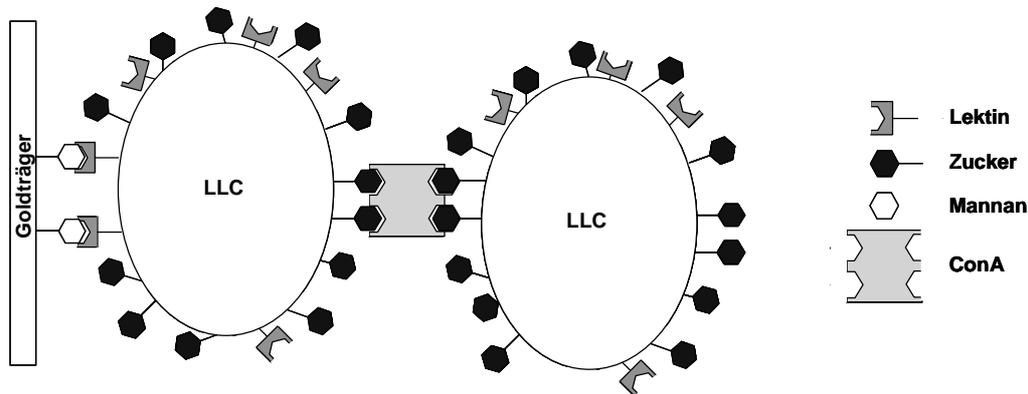


Abb. 3.82: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-ConA-Zellen.

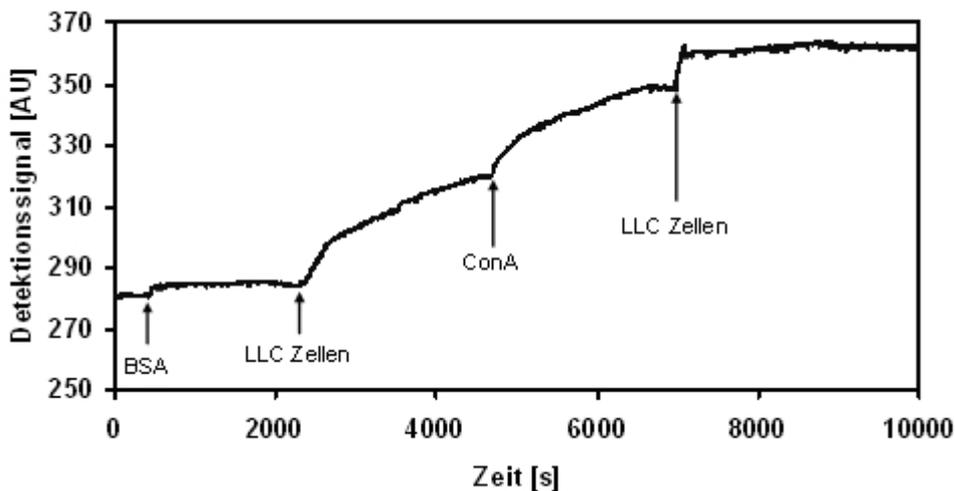


Abb. 3.83: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen. Aufbau einer Sandwichstruktur der Form Zellen-ConA-Zellen.

Auf der mit BSA geblockten Mannanoberfläche des Goldträgers wurde ein Sandwichtaufbau in Form von Zellen-ConA-Zellen erzeugt (Abb. 3.82). Der Signalzuwachs betrug für die erste Zellzugabe 36,0 AU, für ConA 28,0 AU und für die zweite Zellzugabe 14,0 AU (Abb. 3.83). Die Bindungskurve der ersten Zellzugabe zeigt einen flachen Anstieg in der Assoziationsphase und einen stetigen starken Anstieg während der gesamten Inkubationsphase. Die Kurve zeigt kein asymptotisches Verhalten. In gleicher Weise verläuft die Anlagerung des ConA. Die zweite Zellzugabe zeigt einen untypischen (sprunghaften, nicht sigmoiden) Signalverlauf.

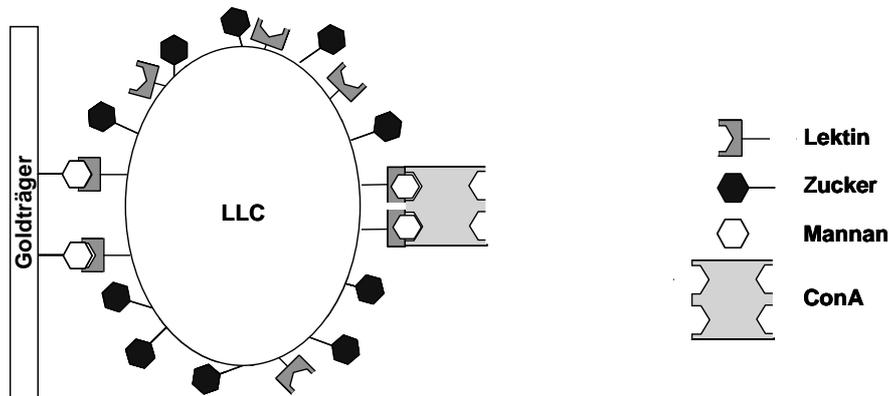
Messreihe 2.3: Zellen – Mannan – ConA

Abb. 3.84: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanchichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: Zellen-Mannan-ConA.

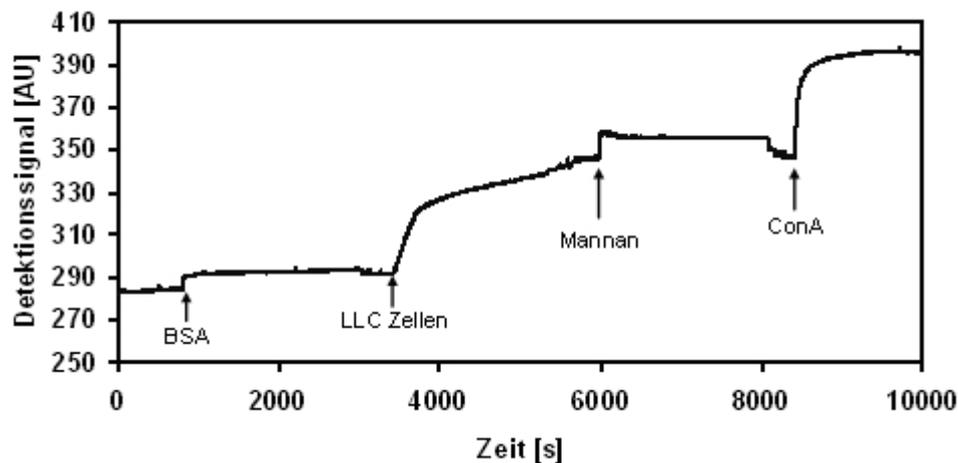


Abb. 3.85: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen, die noch weiter mit Mannan und ConA behandelt wurden.

Nach Passivierung des Mannanträgers ergab die Immobilisierung der LLC-Zellen einen Zuwachs des Detektionssignals von 52,0 AU. Die Zugabe von Mannan generierte eine Signaländerung von 1,0 AU. Der Signalzuwachs von ConA nach spezifischer Bindung an Mannan lag bei 49,0 AU (Abb. 3.85). Die Bindungskurve der Zellen ist in der Assoziationsphase relativ steil und weist einen stetigen starken Anstieg während der gesamten Inkubationsphase auf. Wie in der vorherigen Messreihe zeigt diese kein asymptotisches Verhalten. Der Kurvenverlauf für Mannan ist sprunghaft (stufenförmig) und endet in einer sehr geringen Kurvenhöhe nach dem Spülen. Der Verlauf der Bindungskurve von ConA ist typisch (Steilheit und Höhe der Kurve) für die Spezifität zu Mannan.

Immobilisierung von LLC-Zellen auf ConA

In der zweiten Serie wurde als erster Schritt des Schichtaufbaus ConA immobilisiert. An dieses sollten die LLC-Zellen spezifisch (über Glykostrukturen) binden. Die Testreihe hatte den in Abb. 3.86 dargestellten Basis-Schichtaufbau. Dieser wurde durch weitere Anlagerungen von ConA und Zellen erweitert (vgl. Abb. 3.88 und Abb. 3.90).

Messreihe 2.4: ConA – Zellen

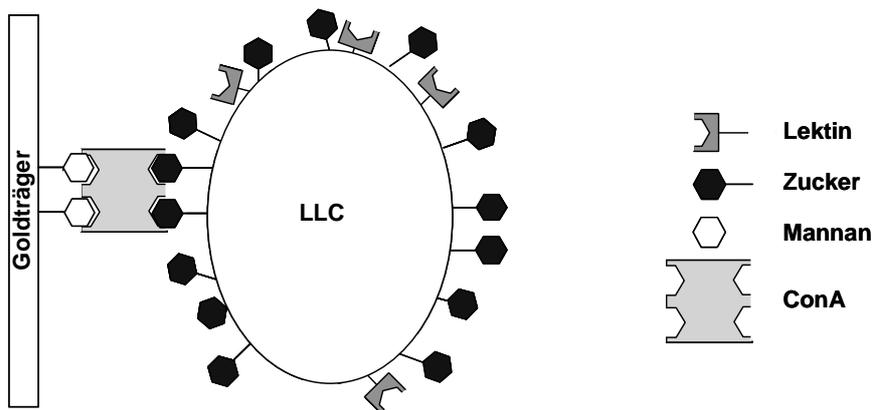


Abb. 3.86: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen.

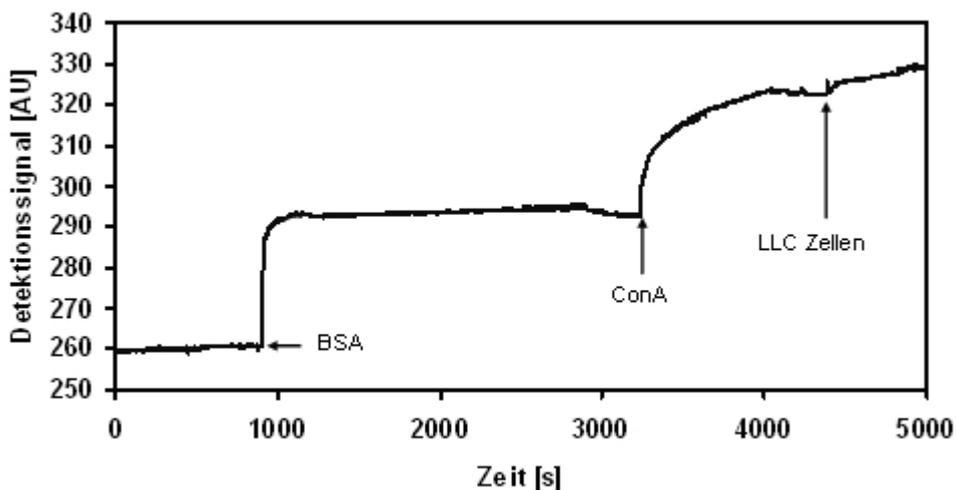


Abb. 3.87: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen auf ConA.

An das immobilisierte ConA wurden LLC-Zellen angelagert. Die Signaländerung für ConA betrug 30,0 AU. Die Anlagerung der LLC-Zellen ergab ein Signal von 6,0 AU.

Der Verlauf und die Form des Messsignals (Steilheit und Höhe der Kurve) für ConA sind typisch für die Spezifität zu Mannan. Der Anstieg der Bindungskurve der Zellen ist in der Assoziationsphase flach. Während der Inkubationsphase steigt die Kurve anfangs schwach und zum Ende hin stärker an (Abb. 3.87).

Messreihe 2.5: ConA – Zellen – ConA

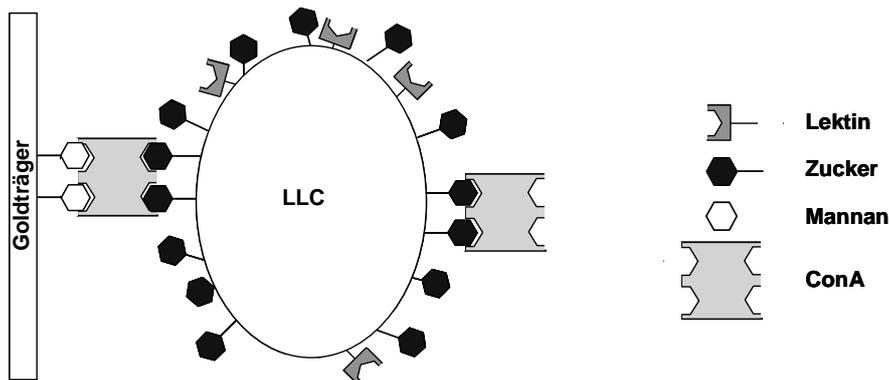


Abb. 3.88: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanspezifischen Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen-ConA.

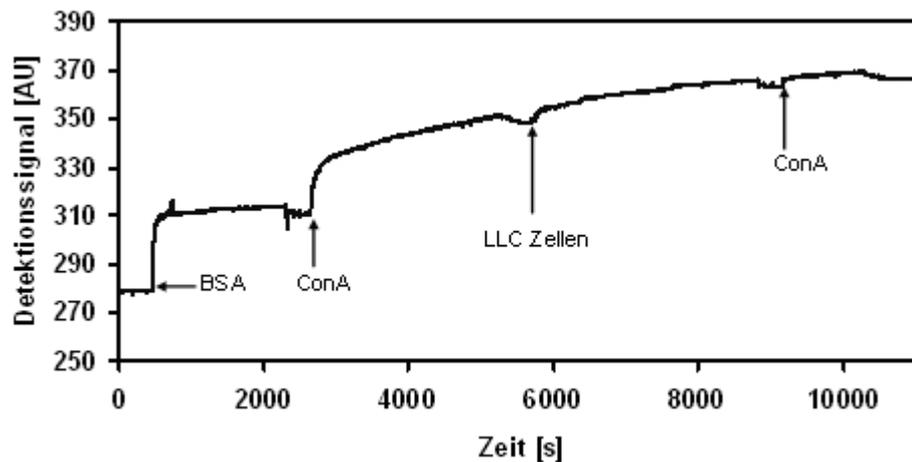


Abb. 3.89: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen auf ConA. Aufbau einer Sandwichstruktur der Form ConA-Zellen-ConA.

Auf der Mannanoberfläche wurde ein Sandwichtaufbau von ConA-Zellen-ConA generiert. Die Signalzuwächse waren im Einzelnen: Erste ConA-Zugabe 38,0 AU, LLC-Zellen 15,0 AU, zweite ConA-Zugabe 3,0 AU. ConA zeigt einen typischen Kurvenverlauf für die Interaktion mit der passivierten Mannanoberfläche, der die Spezifität zu Mannan widerspiegelt. Die Bindungskurve der Zellen verläuft in der

Assoziationsphase relativ flach und resultiert in einem geringen Signalzuwachs (relativ kleine Höhe der Kurve). Die zweite ConA - Anlagerung war sehr schwach, was an der flachen und niedrigen Bindungskurve erkennbar ist.

Messreihe 2.6: ConA – Zellen – ConA – Zellen

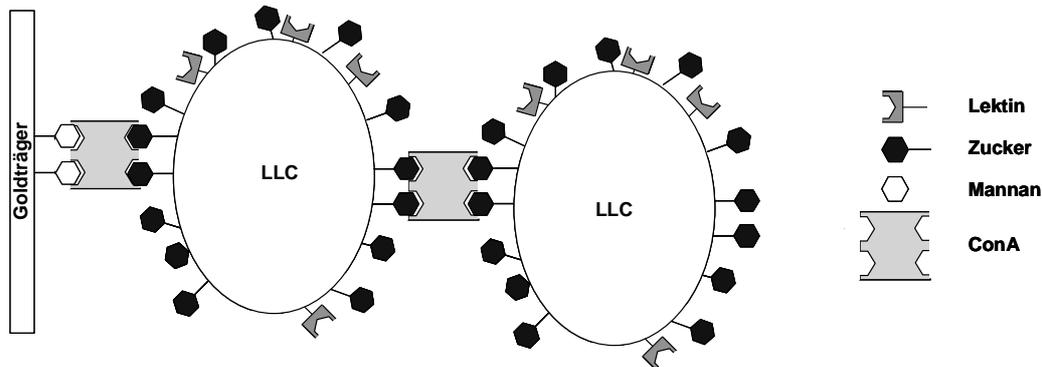


Abb. 3.90: Schema der Immobilisierung von LLC-Zellen auf einem mannanschichteten Goldträger mit folgendem Schichtaufbau: ConA-Zellen-ConA-Zellen.

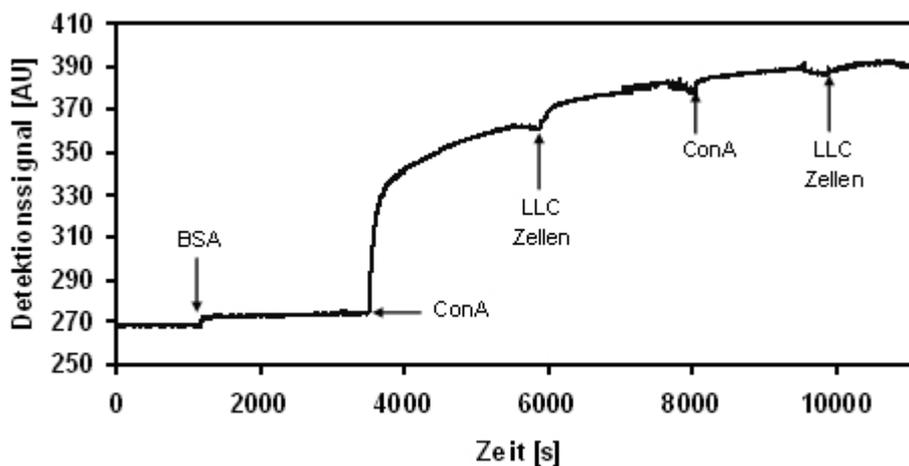


Abb. 3.91: Sensorgramm der Immobilisierung von LLC-Zellen auf ConA. Aufbau einer Doppelsandwichstruktur der Form ConA-Zellen-ConA-Zellen.

Auf der BSA behandelten Mannanoberfläche des Goldträgers wurde ein Doppelsandwich in Form von ConA-Zellen-ConA-Zellen erzeugt. Der Signalzuwachs betrug für die erste ConA – Zugabe 81,0 AU, erste Zugabe Zellen 22,0 AU, zweite ConA - Zugabe 17,0 AU, zweite Zugabe Zellen 4,0 AU (Abb. 3.91). Der Kurvenverlauf ist prinzipiell identisch mit der Messreihe 2.5. Die Bindungskurve der zweiten Zellzugabe zeigt einen sehr flachen Verlauf und endet in einer geringen Kurvenhöhe.

3.2.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immobilisierung von LLC-Zellen

Tab. 3.16 gibt die durchschnittlichen Detektionssignale der verwendeten Substanzen der Doppelbestimmung wieder. Eine Immobilisierung der LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger war möglich. Die Schichtaufbauten aus den Versuchsreihen der NCI-H125-Zellen mit dem Zucker-Lektin-System Mannan-ConA konnten ebenfalls umgesetzt werden. Auch in den Messreihen mit den LLC-Zellen war eine Immobilisierung der Zellen durch unspezifische und spezifische Interaktionen möglich, wobei die Bindungskurven zum Teil recht unterschiedlich aussahen.

Auch für die Messergebnisse der Zellimmobilisierung der LLC-Zellen würde die relative Standardabweichung wahrscheinlich in einem Bereich von 30 – 40 % liegen. Dieser hohe Wert ist, wie schon bei den NCI-H125-Zellen erwähnt, darauf zurückzuführen, dass es sich bei Zellen um lebende Systeme handelt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist, aufgrund des möglichen unterschiedlichen Verhaltens auf dem SPR-Sensor, nicht so leicht zu bewerkstelligen.

Tab. 3.16: Mittelwerte [AU] der Signaländerungen der jeweiligen Substanzen nach Immobilisierung der LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Goldträger.

Messreihe	Immobilisierung von LLC Zellen ohne BSA Passivierung				
1.1	Schichtaufbau	Zellen			
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	62,0			
1.2	Schichtaufbau	Zellen	Mannan	ConA	
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	58,5	6,5	46,5	
1.3	Schichtaufbau	Zellen	ConA	Mannan	ConA
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	55,5	5,0	1,0	2,5
Messreihe	Immobilisierung von LLC Zellen mit BSA Passivierung				
2.1	Schichtaufbau	Zellen	ConA		
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	13,0	19,0		
2.2	Schichtaufbau	Zellen	ConA	Zellen	
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	27,5	22,0	15,0	
2.3	Schichtaufbau	Zellen	Mannan	ConA	
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	49,5	0,5	43,0	
2.4	Schichtaufbau	ConA	Zellen		
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	29,5	5,5		
2.5	Schichtaufbau	ConA	Zellen	ConA	
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	34,0	21,0	5,0	
2.6	Schichtaufbau	ConA	Zellen	ConA	Zellen
	Durchschnittliche Signaländerung [AU]	84,0	19,5	12,5	4,0
Kontrolle	Zellen auf Goldoberfläche	5,5 AU			

3.2.3 REM Aufnahmen der immobilisierten Zellen

Beide Zelllinien zeigten ein ausgeprägtes Bindungsverhalten an die beschriebenen Oberflächen. Jedoch scheint die Reaktion der Zellen auf den Kontakt mit Concanavalin A völlig unterschiedlich zu sein. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben, dass die NCI-H125-Zellen nach der Immobilisierung deutlich verändert waren und kleine Abschnürungen aufwiesen, die sehr an apoptotische Vorgänge erinnern. Die LLC-Zellen hingegen bildeten teilweise zusammenhängende Zellrasen aus und zeigten keinerlei äußerliche Veränderungen. Zwischen den Zellen sind noch Reste von Puffersalzen zu erkennen (Abb. 3.92).

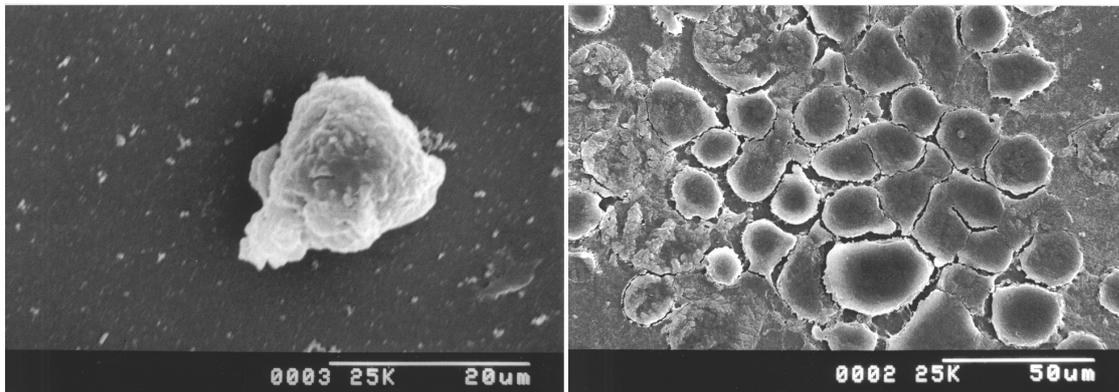


Abb. 3.92: REM-Aufnahmen der NCI-H125- und LLC-Zellen immobilisiert auf einer Mannan-ConA-Oberfläche. Das linke Bild zeigt eine NCI-H125-Zelle, das rechte Bild LLC-Zellen.

3.3 Entwicklung eines Mistellektin I-(MLI)-Assays auf SPR-Basis

Mistellektin-I (MLI) aus *Viscum album* gehört zur Familie der Ribosomen inaktivierenden Proteine vom Typ II. MLI besteht aus zwei Untereinheiten, einer 29 kDa umfassenden A-Kette mit N-Glykosidaseaktivität und einer 34 kDa großen D-Galactose-spezifischen B-Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [Olsnes et al., 1982]. An vier Positionen innerhalb der Polypeptidkette sind Oligosaccharidstrukturen über Asparagin angehängt [Stoeva et al, 1999].

Im Hinblick auf Mistellektinbestimmungen in Fertigarzneimitteln sollte ein Testsystem für Mistellektin I (MLI) auf der SPR Technologie-Plattform etabliert werden. Ein Krebstherapiekonzept, welches die immunmodulatorische Potenz von Mistelextrakten ausnutzt, basiert auf den experimentellen Dosiswirkungsbeziehungen des gereinigten MLI [Beuth et al., 1993; Hajto et al., 1990]. Voraussetzung dafür ist die differenzierte Erfassung des Gehaltes an MLI, MLII und MLIII in therapeutisch angewendeten Mistelextrakten. Die Anwendung von Enzym-Immuno-Assays bzw. Lektinbindungs-Enzym-Immuno-Assays haben diesen Anspruch nicht erfüllt [Ziska und Franz, 1985; Vang et al., 1986].

Es wurde daher versucht, einen SPR-Assay zum Nachweis von rekombinantem Mistellektin I (rMLI) zu entwickeln. Hierbei kamen die monoklonalen Antikörper MNA4, MNA9 und 5F5, 5H8 mit unterschiedlicher Epitopspezifität gegenüber dem rMLI zum Einsatz. Das rMLI und die zugehörigen monoklonalen Antikörper wurden von der Firma Probiogen (rMLI, MNA4, MNA9) und der Firma Sifin (rMLI, 5F5, 5H8) bezogen.

Rekombinantes Mistellektin I ist im Gegensatz zum natürlichen Mistellektin I (MLI) nicht glykosyliert (vgl. Kapitel 1.6.2) und weist eine relative Molekülmasse von 56 kDa auf.

3.3.1 MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9

Die beiden monoklonalen Antikörper MNA4 und MNA9 unterscheiden sich in ihrer Epitopspezifität gegenüber dem rMLI. In Abb. 3.93 ist das Schema des Sandwich-Assays dargestellt, bei dem der Antikörper MNA4 als Fängerantikörper und der Antikörper MNA9 als Detektionsantikörper fungiert.

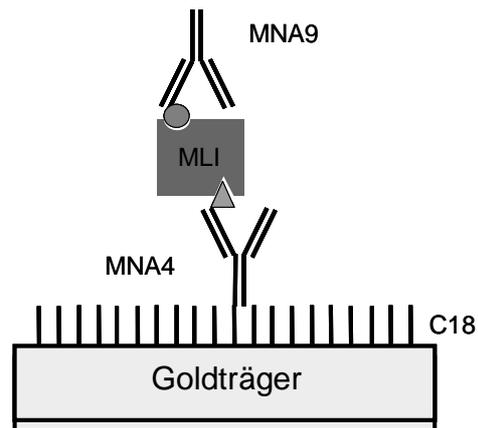


Abb. 3.93: Schema des Schichtaufbaus des MLI-Assays.

Als Immobilisierungsgrundlage diente eine C₁₈-alkylierte Sensoroberfläche. Auf dieser wurde der Fängerantikörper über hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Als zweiter Schritt wurden unspezifische Bindungen mit BSA geblockt. Nach Zugabe des rMLI erfolgte im letzten Schritt die Zugabe des Detektionsantikörpers.

In zwei Messreihen wurden die Antikörper MNA4 und MNA9 einmal als Fängerantikörper und einmal als Detektionsantikörper eingesetzt. Die Konzentration des rMLI und der Antikörper betrug in beiden Messreihen des MLI-Assays 200 µg/ml.

Um sicherzustellen, dass keine Interaktion zwischen den beiden monoklonalen Antikörpern abläuft, wurde bei den Kontrollversuchen das rMLI nicht eingesetzt. Aus den Sensorgrammen (Abb. 3.94 und Abb. 3.95) ist ersichtlich, dass keine Bindung zwischen den monoklonalen Antikörpern stattgefunden hat.

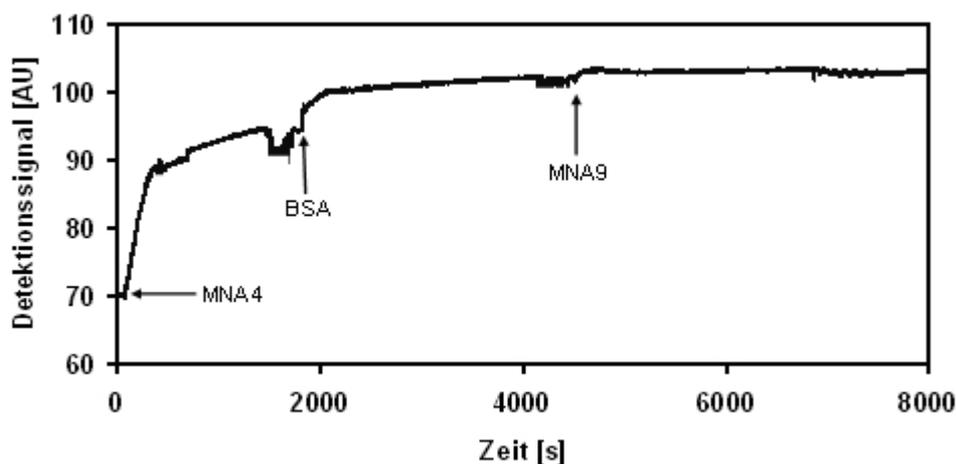


Abb. 3.94: Sensorgramm des Kontrollversuchs, bei dem MNA4 als Fänger- und MNA9 als Detektionsantikörper fungierten.

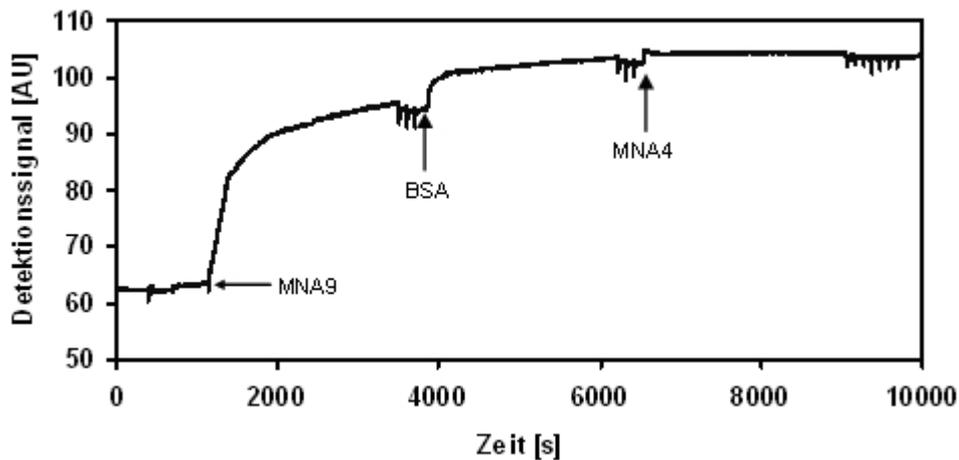


Abb. 3.95: Sensorgramm des Kontrollversuchs, bei dem MNA9 als Fänger- und MNA4 als Detektionsantikörper fungierten.

3.3.1.1 MNA4 als Fängerantikörper und MNA9 als Detektionsantikörper

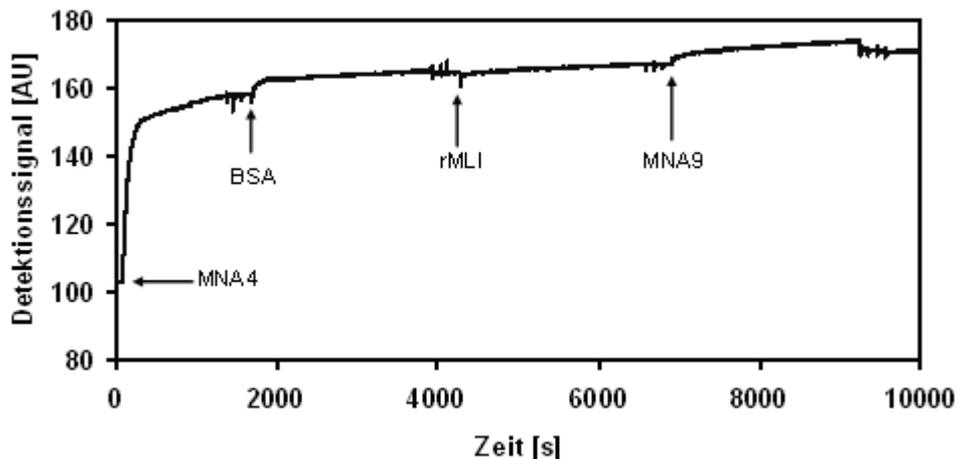


Abb. 3.96: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA4 als Fänger- und MNA9 als Detektionsantikörper, das rMLI lag in PBS-Puffer vor.

Der MLI-Assay wurde in dieser Messreihe mit den monoklonalen Antikörpern MNA4 als Fänger- und MNA9 als Detektionsantikörper durchgeführt. Das rekombinante MLI lag dabei als Lösung in PBS-Puffer vor. Die Signaländerung für den Antikörper MNA4 lag bei 55,0 AU. Das rMLI zeigte nach Zugabe einen Zuwachs von 3,0 AU und der Signalzuwachs für den Detektionsantikörper MNA9 lag bei 4,5 AU (Abb. 3.96).

Um das Detektionssignal des monoklonalen Antikörpers MNA9 zu erhöhen, sollte das rMLI mit 50 mM Galactose stabilisiert werden.

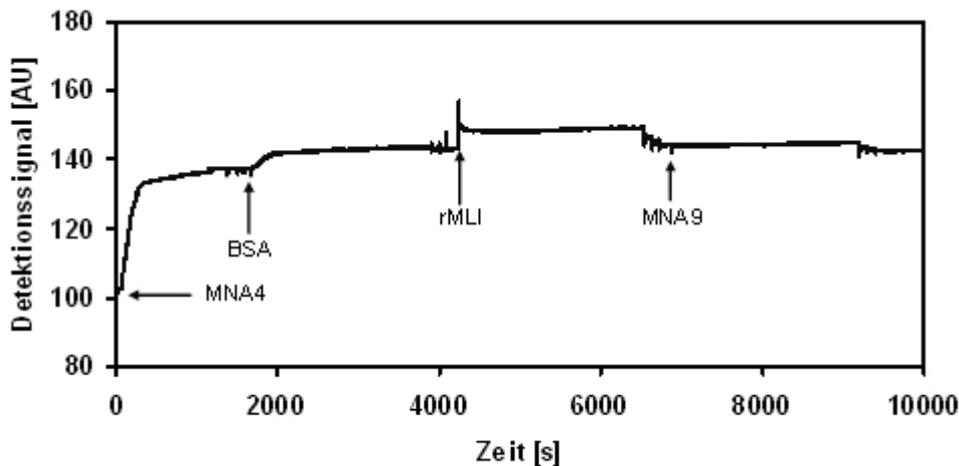


Abb. 3.97: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA4 als Fänger- und MNA9 als Detektionsantikörper, das rMLI wurde mit 50 mM Galactose stabilisiert.

Eine Signaländerung für den Antikörper MNA9 konnte nicht festgestellt werden. Die Galactose, die zur Stabilisierung des rMLI dienen sollte, zeigte keine verbessernde Auswirkung auf das Bindungsverhalten des Detektionsantikörpers MNA9. Die Signaländerungen lagen bei 35,0 AU für den Fängerantikörper MNA4, 1 AU für das rMLI und 0 AU für den Detektionsantikörper MNA9 (Abb. 3.97).

Als Vergleich zum rMLI wurde mit dem natürlichen MLI (200 µg/ml) aus *Viscum album* gearbeitet. Die Zugabe des Antikörpers MNA4 ergab eine Signaländerung von 50,0 AU, MLI aus *Viscum album* führte zu einem Signal von 11,0 AU und die Zugabe des Antikörpers MNA9 führte zu einem Signalzuwachs von 21,0 AU (Abb. 3.98).

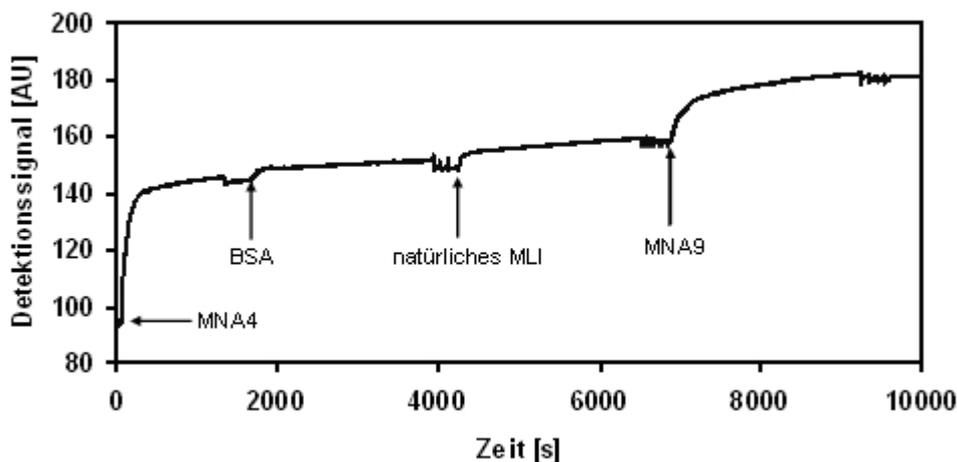


Abb. 3.98: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA4 als Fänger- und MNA9 als Detektionsantikörper, das natürliche MLI aus *Viscum album* lag in PBS-Puffer vor.

3.3.1.2 MNA9 als Fängerantikörper und MNA4 als Detektionsantikörper

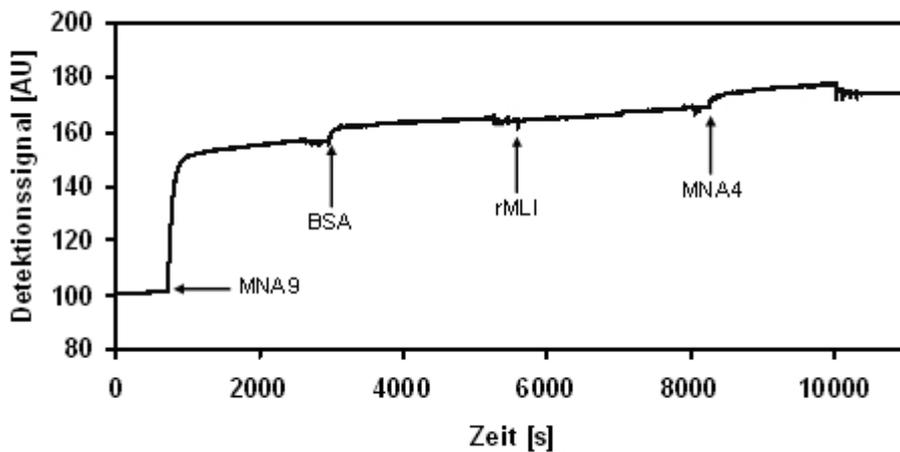


Abb. 3.99: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA9 als Fänger- und MNA4 als Detektionsantikörper, das rMLI lag in PBS-Puffer vor.

In dieser Messreihe des MLI-Assays dienen die monoklonalen Antikörper MNA9 als Fänger- und MNA4 als Detektionsantikörper. Das rMLI lag dabei als Lösung in PBS-Puffer vor. Nach Zugabe des Antikörpers MNA9 zeigte sich ein Signalzuwachs von 56,0 AU. Die Signaländerungen für das rMLI und den Antikörper MNA4 lagen bei jeweils 5,0 AU (Abb. 3.99).

Um das Detektionssignal des monoklonalen Antikörpers MNA4 zu erhöhen, sollte auch in dieser Messreihe das rMLI mit 50 mM Galactose stabilisiert werden.

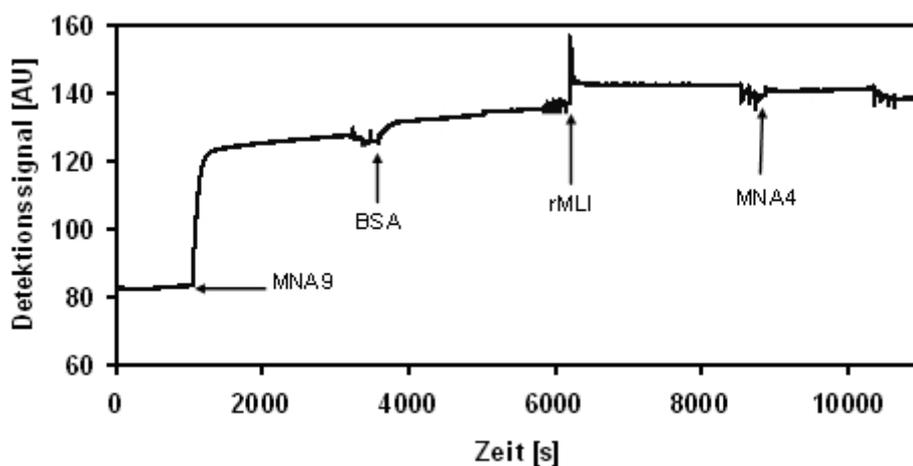


Abb. 3.100: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA9 als Fänger- und MNA4 als Detektionsantikörper, das rMLI wurde mit 50 mM Galactose stabilisiert.

Eine Signaländerung für den Antikörper MNA4 konnte nicht festgestellt werden. Die Galactose, die zur Stabilisierung des rMLI dienen sollte, zeigte auch hier keine verbessernde Auswirkung auf das Bindungsverhalten des Detektionsantikörpers MNA4. Die Signaländerungen waren: 42,0 AU für den Fängerantikörper MNA9, 4,0 AU für rMLI und 0 AU für den Detektionsantikörper MNA4 (Abb. 3.100).

Als Vergleich zum rMLI wurde wiederum mit dem natürlichen MLI (200 µg/ml) aus *Viscum album* gearbeitet. Hier zeigte der Fängerantikörper MNA9 einen Signalzuwachs von 54,0 AU. Das MLI aus *Viscum album* führte zu einer Signaländerung von 22,0 AU, der Zuwachs für den Detektionsantikörper MNA4 lag bei 11,0 AU (Abb. 3.101).

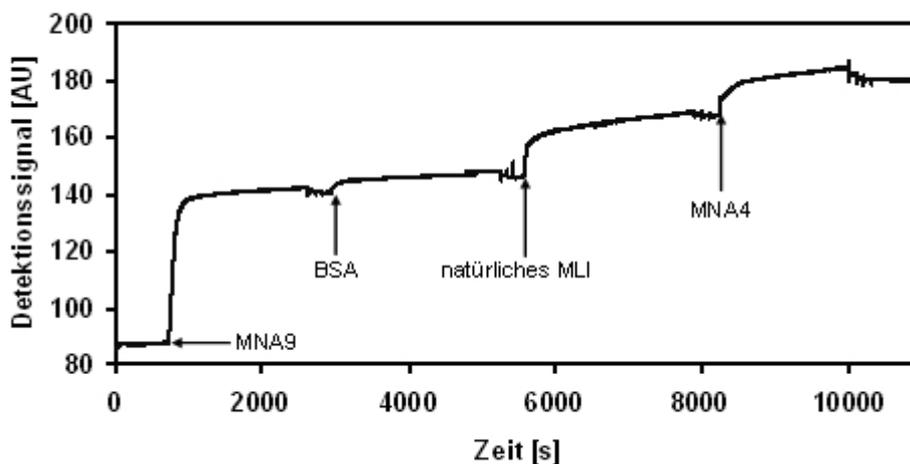


Abb. 3.101: Sensorgramm des MLI-Assays mit MNA9 als Fänger- und MNA4 als Detektionsantikörper, das natürliche MLI aus *Viscum album* lag in PBS-Puffer vor.

3.3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des MLI-Assays mit den Antikörpern MNA4 und MNA9

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem rMLI und den monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9 sind in Tab. 3.17 und Tab. 3.18 zusammengefasst. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tab. 3.17: Signaländerungen des MLI-Assays, bei dem der monoklonale Antikörper MNA9 als Detektionsantikörper eingesetzt wurde (rMLI(Gal) = rMLI stabilisiert mit 50 mM Galactose, MLI (VAA I) = natürliches Mistellektin I).

Assayaufbau	ΔAU	Assayaufbau	ΔAU	Assayaufbau	ΔAU
MNA4	$55,7 \pm 1,2$	MNA4	$36,7 \pm 1,5$	MNA4	$51,0 \pm 2,6$
rMLI	$3,3 \pm 0,6$	rMLI(Gal)	$1,0 \pm 0,0$	MLI(VAA I)	$10,7 \pm 0,6$
MNA9	$4,5 \pm 0,8$	MNA9	0,0	MNA9	$22,5 \pm 1,2$

Der Detektionsantikörper MNA9 führte mit dem rMLI zu einer Signaländerung von $4,5 \pm 0,8$ AU, nach Interaktion mit VAA I ergab sich ein Zuwachs des Antikörpers MNA9 von $22,5 \pm 1,2$ AU.

Tab. 3.18: Signaländerungen des MLI-Assays, bei dem der monoklonale Antikörper MNA4 als Detektionsantikörper eingesetzt wurde (rMLI(Gal) = rMLI stabilisiert mit 50 mM Galactose, MLI (VAA I) = natürliches Mistellektin I).

Assayaufbau	ΔAU	Assayaufbau	ΔAU	Assayaufbau	ΔAU
MNA9	$55,0 \pm 1,7$	MNA9	$43,7 \pm 2,1$	MNA9	$52,0 \pm 2,6$
rMLI	$5,3 \pm 0,6$	rMLI(Gal)	$3,3 \pm 0,6$	MLI(VAA I)	$20,3 \pm 2,1$
MNA4	$6,5 \pm 0,6$	MNA4	0,0	MNA4	$9,5 \pm 1,1$

Der Signalzuwachs für den Detektionsantikörper MNA4 lag nach Anlagerung an rMLI bei $6,5 \pm 0,6$ AU, nach Interaktion mit *Viscum album* I Agglutinin (VAA I) zeigte der Antikörper MNA4 einen Zuwachs von $9,5 \pm 1,1$ AU.

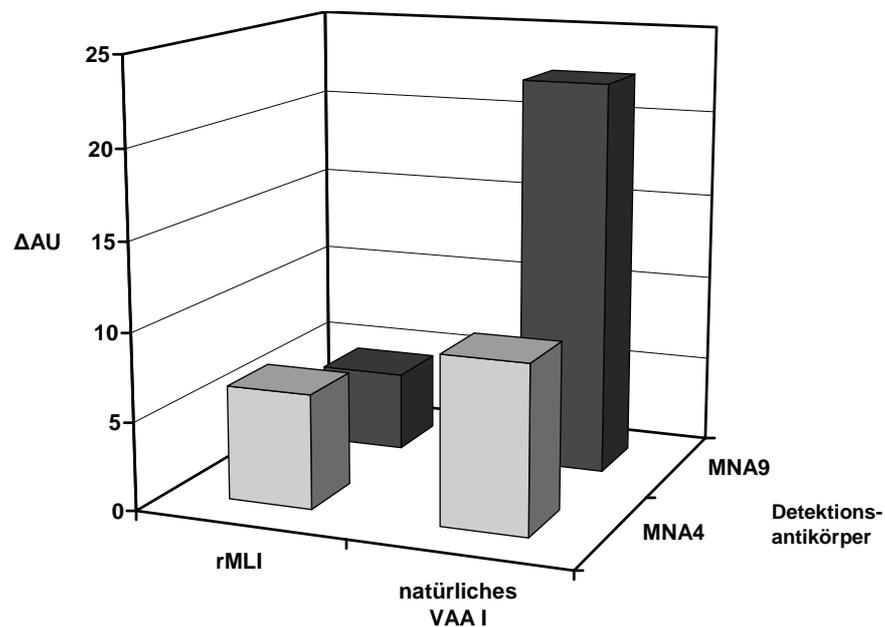


Abb. 3.102: Signaländerung des Detektionsantikörpers. Die eingesetzten Konzentrationen an rMLI, MLI aus *Viscum album* I Agglutinin (VAA I) und Antikörper lagen jeweils bei 200 $\mu g/ml$.

Die Interaktion des rMLI mit den monoklonalen Antikörpern liegt mit $4,5 \pm 0,8$ AU (MNA9) bzw. $6,5 \pm 0,6$ AU (MNA4) in einem Bereich, bei dem nicht von einer Spezifität gesprochen werden kann (Abb. 3.102). Zu berücksichtigen sind auch die relativ hohen eingesetzten Konzentrationen von Antikörper und Antigen (jeweils $c=200 \mu g/ml$), die einen wesentlich höheren Signalzuwachs zur Folge haben müssten. Lediglich gegenüber VAA I zeigte der Detektionsantikörper MNA9 zufriedenstellende Signalzuwächse.

3.3.2 MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8

Der Schichtaufbau bei diesem Assay war der gleiche wie in Abb. 3.93. Die Immobilisierungsmethode wurde ebenfalls aus dem ersten MLI-Assay übernommen.

Die Konzentration des rMLI und der monoklonalen Antikörper 5F5, 5H8 betrug in den Messreihen 200 µg/ml.

Als Kontrollversuch wurde der Assay ohne das rMLI durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Interaktion zwischen den beiden monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8 abläuft. Jeder der beiden Antikörper diente einmal als Fänger- und ein weiteres Mal als Detektionsantikörper. Eine Signaländerung war nach Zugabe des jeweiligen Detektionsantikörpers nicht zu verzeichnen (Abb. 3.103 und Abb. 3.104).

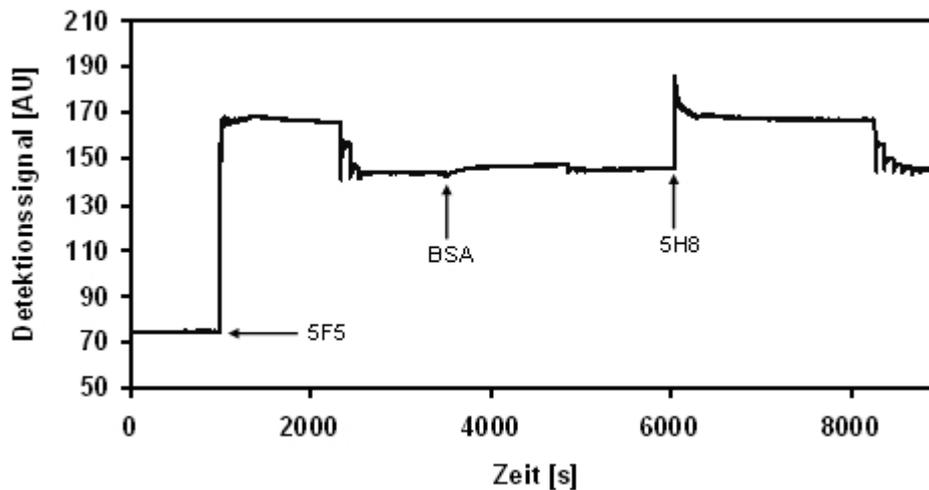


Abb. 3.103: Sensorgramm des Kontrollversuchs, bei dem 5F5 als Fänger- und 5H8 als Detektionsantikörper fungierten.

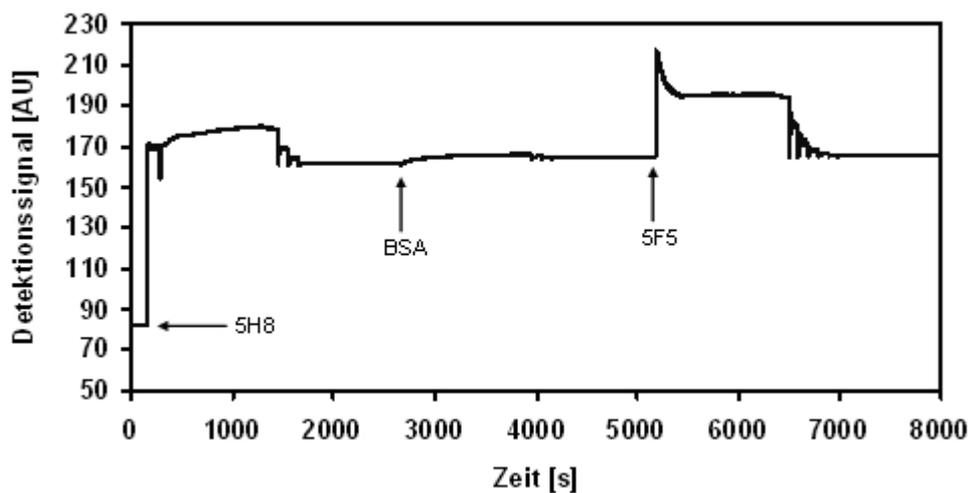


Abb. 3.104: Sensorgramm des Kontrollversuchs, bei dem 5H8 als Fänger- und 5F5 als Detektionsantikörper fungierten.

3.3.2.1 5F5 als Fängerantikörper und 5H8 als Detektionsantikörper

Der MLI-Assay wurde in der ersten Messreihe mit den monoklonalen Antikörpern 5F5 als Fänger- und 5H8 als Detektionsantikörper durchgeführt. Das rMLI lag dabei als Lösung in PBS-Puffer vor.

Die einzelnen Signalzuwächse waren wie folgt: 53,0 AU für den Fängerantikörper 5F5, 52,0 AU für das rMLI und 43,0 AU für den Detektionsantikörper 5H8 (Abb. 3.105).

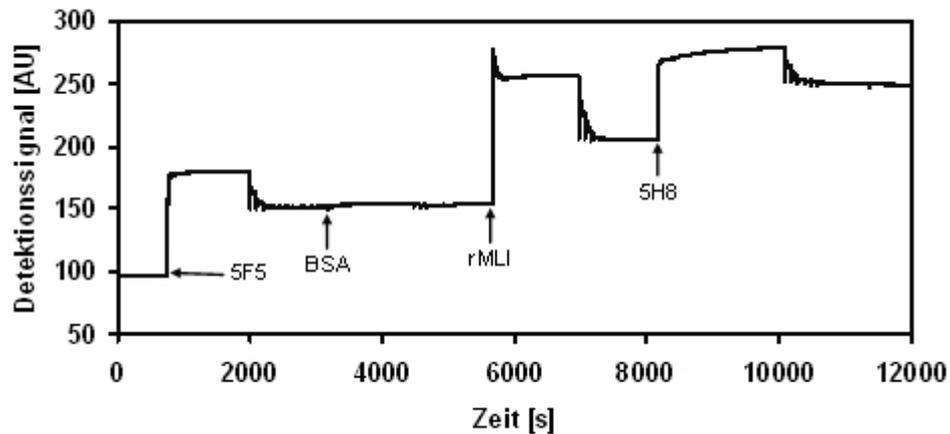


Abb. 3.105: Sensorgramm des MLI-Assays mit 5F5 als Fänger- und 5H8 als Detektionsantikörper, das rMLI lag in PBS-Puffer vor.

3.3.2.2 5H8 als Fängerantikörper und 5F5 als Detektionsantikörper

Bei der zweiten Messreihe des MLI-Assays fungierte der monoklonale Antikörper 5H8 als Fängerantikörper, der monoklonale Antikörper 5F5 stellte den Detektionsantikörper dar.

Der Fängerantikörper 5H8 zeigte einen Zuwachs von 50,0 AU. Die Signaländerung für das rMLI lag bei 32,0 AU und die des Detektionsantikörpers 5F5 bei 54,0 AU (Abb. 3.106).

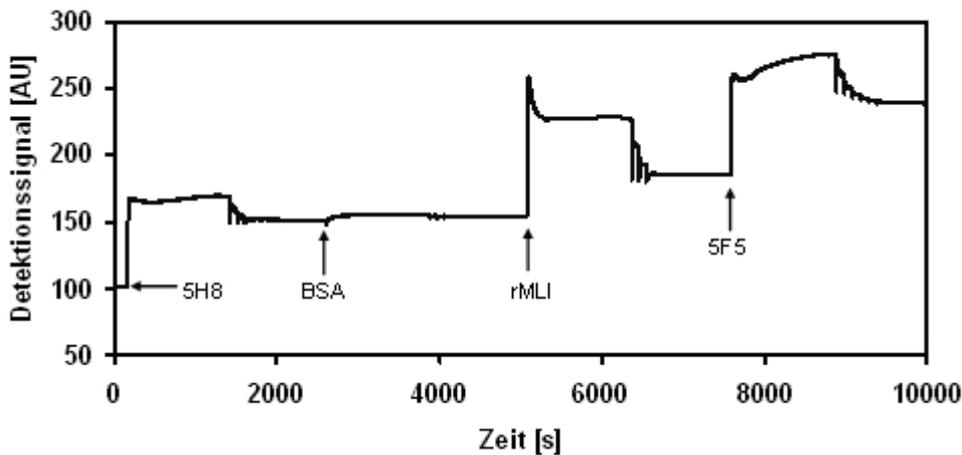


Abb. 3.106: Sensorgramm des MLI-Assays mit 5H8 als Fänger- und 5F5 als Detektionsantikörper, das rMLI lag in PBS-Puffer vor.

3.3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des MLI-Assays mit den Antikörpern 5F5 und 5H8

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem rMLI und den monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8 sind in Tab. 3.19 und Tab. 3.20 zusammengefasst. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tab. 3.19: Signaländerungen des MLI-Assays, bei dem der monoklonale Antikörper 5H8 als Detektionsantikörper eingesetzt wurde.

Assayaufbau	ΔAU
5F5	$53,2 \pm 2,3$
rMLI	$53,7 \pm 2,9$
5H8	$46,3 \pm 4,9$

Tab. 3.20: Signaländerungen des MLI-Assays, bei dem der monoklonale Antikörper 5F5 als Detektionsantikörper eingesetzt wurde.

Assayaufbau	ΔAU
5H8	$51,3 \pm 1,5$
rMLI	$32,2 \pm 1,3$
5F5	$61,0 \pm 6,2$

Der Signalzuwachs für den Detektionsantikörper 5F5 lag nach Anlagerung an rMLI bei $61,0 \pm 6,2$ AU. Wurde der monoklonale Antikörper 5H8 als Detektionsantikörper eingesetzt, so zeigte sich eine Signaländerung von $46,3 \pm 4,9$ AU. Die Interaktion der monoklonalen Antikörper 5F5 und 5H8 mit rMLI war zufriedenstellend.

Aus der Abb. 3.107 wird ersichtlich, dass der monoklonale Antikörper 5F5 eine bessere Interaktion mit dem rekombinaten MLI einging, was zu einer größeren Signaländerung des Detektionsantikörpers 5F5 führte.

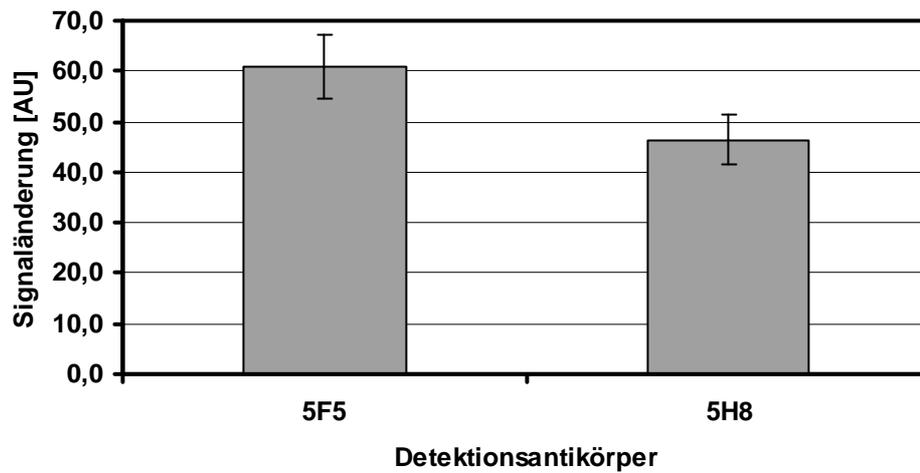


Abb. 3.107: Signaländerung des Detektionsantikörpers. Die eingesetzte Konzentration der Antikörper lag jeweils bei 200 µg/ml.

3.3.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze des MLI-Assays

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der monoklonale Antikörper 5F5 als Detektionsantikörper ein größeres Signal als der monoklonale Antikörper 5H8 generiert, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der Assaystrategie wie in Abb. 3.106 ermittelt.

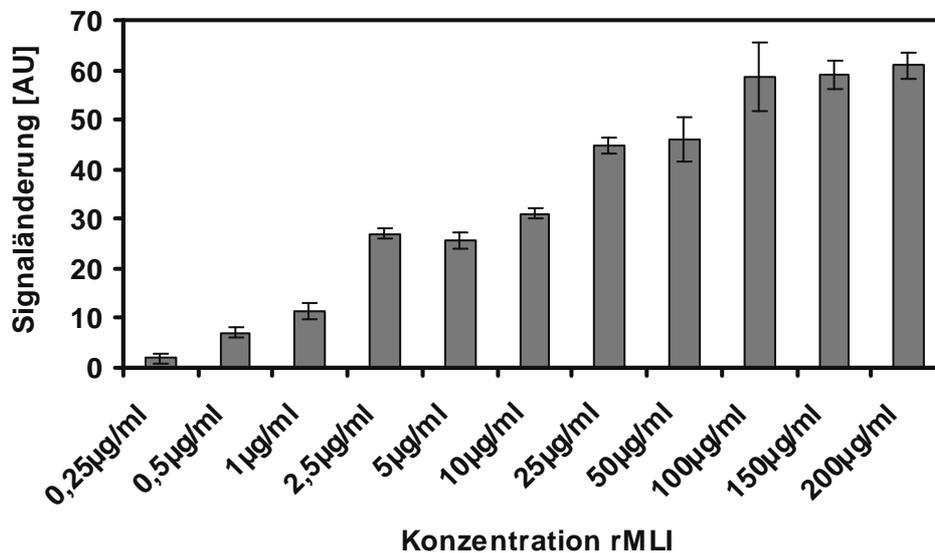


Abb. 3.108: Abhängigkeit des Messsignals des Detektionsantikörpers 5F5 von der rMLI Konzentration.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des rekombinanten MLI wurden rMLI Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0,25 – 200 µg/ml vermessen.

Folgende Signalzuwächse wurden nach der Interaktion des rMLI mit dem Detektionsantikörper 5F5 gemessen (Abb. 3.108): 0,25 µg/ml $2,0 \pm 1,0$ AU, 0,5 µg/ml $7,0 \pm 1,0$ AU, 1 µg/ml $11,0 \pm 1,5$ AU, 2,5 µg/ml $27,0 \pm 1,0$ AU, 5 µg/ml $26,0 \pm 1,5$ AU, 10 µg/ml $31,0 \pm 1,0$ AU, 25 µg/ml $45,0 \pm 1,5$, 50 µg/ml $46,0 \pm 4,4$ AU, 100 µg/ml $59,0 \pm 7,0$ AU, 150 µg/ml $59,0 \pm 3,0$ AU, 200 µg/ml $61,0 \pm 6,2$ AU.

Das Signal des Detektionsantikörpers für die rMLI Konzentration 0,25 µg/ml unterschied sich deutlich von der „Basislinie“, d.h. dem Signalwert vor der Zugabe des Detektionsantikörpers. Die Nachweisgrenze lag somit in dem Bereich von $c_{\text{rMLI}}=0,25$ µg/ml. Bei dieser rMLI Konzentration lag die Signaländerung des Detektionsantikörpers beim fünffachen des Grundrauschens. Damit war die Bedingung, dass die Nachweisgrenze im dreifachen Bereich des Grundrauschens (0,4 AU) liegt, erfüllt.

Die Bestimmungsgrenze lag bei einer rMLI Konzentration von 0,5 µg/ml. Bei dieser Konzentration lag das Messsignal des Detektionsantikörpers beim 17,5 fachen des Grundrauschens. Das Kriterium, das die Bestimmungsgrenze im Bereich des zehnfachen des Grundrauschens (0,4 AU) liegt, war erfüllt.

Da die Messungen in einem Volumen von 20 µl pro Kavität durchgeführt wurden, ergab sich, auf die Stoffmenge von rMLI ($M_r=56$ kDa) bezogen, eine Nachweisgrenze von 4,47 pmol/l und eine Bestimmungsgrenze von 8,93 pmol/l. Die Basislinie blieb über eine Zeit von 60 Minuten relativ konstant und zeigte lediglich eine Signaländerung von 1,4 AU.

Die Abhängigkeit der Signaländerung des Detektionsantikörpers 5F5 von der Konzentration des rMLI gibt Abb. 3.109 wieder. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (Abb. 3.110).

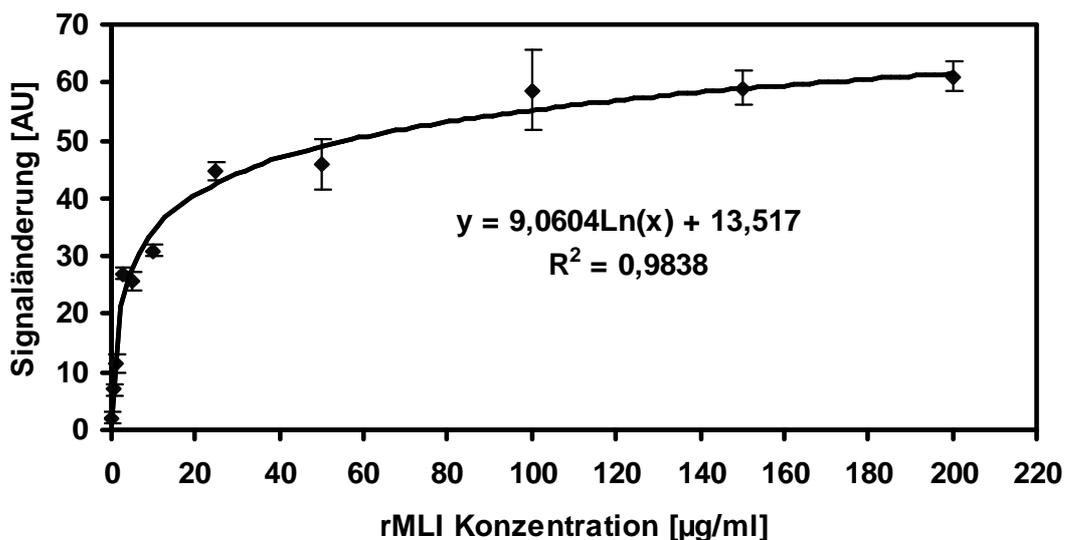


Abb. 3.109: Abhängigkeit der Messsignaländerung des Detektionsantikörpers 5F5 von der rMLI Konzentration.

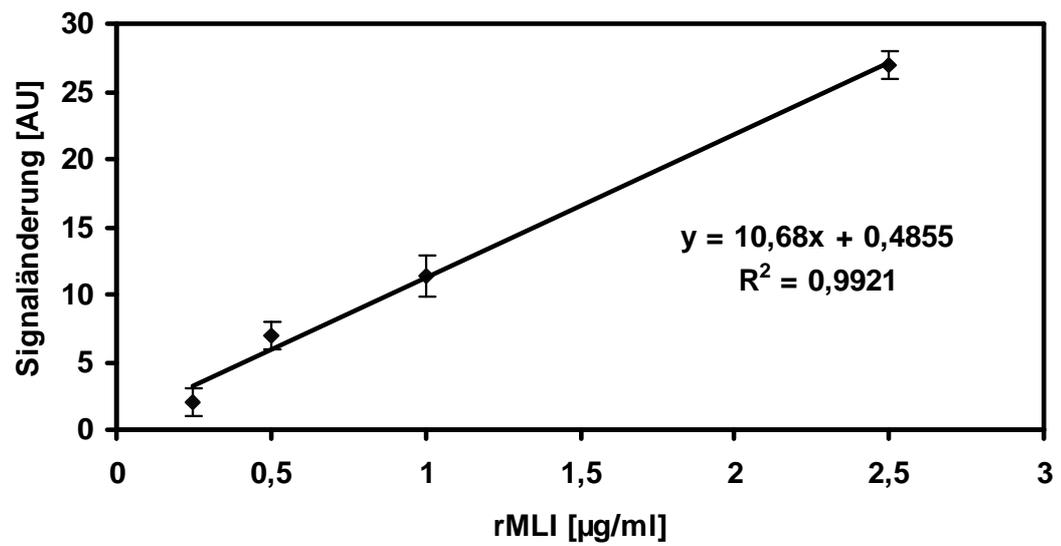


Abb. 3.110: Linearer Bereich des rMLI-Assays; Darstellung des Detektionssignals des Antikörpers 5F5 in Abhängigkeit der rMLI Konzentration.

3.4 Bioabbaubarkeitsstudie von Polyethylencarbonat durch Makrophagen

Der Schichtdickenabbau von Polyethylencarbonat (PEC) durch murine Makrophagen der Zelllinie J774A.1 sollte visualisiert werden. Dazu wurden Messreihen auf der SPI- und der SPR-Plattform durchgeführt. Ziel war es, eine Aussage darüber zu treffen, wie sich der Schichtdickenabbau des Polymers in Korrelation zur Zeit, Zellkonzentration und zu Triggerfaktoren verhält.

3.4.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems und unter anderem für die angeborene, zelluläre Immunantwort verantwortlich. Diese sogenannten „Fresszellen“ reifen kontinuierlich aus Monozyten heran. In großer Anzahl befinden sie sich im Verdauungstrakt, in der Lunge (Alveolarmakrophagen) und in der Milz. Blutmonozyten und Makrophagen stammen von der gleichen Vorläuferlinie ab und werden daher auch mononukleäres System genannt.

Makrophagen gehören zu den inflammatorischen Zellen. Bei Stimulation setzen sie unter anderem Superoxidradikalanionen ($O_2^- \cdot$) frei, die in der Lage sind, Polyethylencarbonat (PEC) abzubauen [Stoll et al., 2001]. Diese Eigenschaft wurde für die Bioabbaubarkeitsstudie des PEC ausgenutzt.

3.4.2 Polyethylencarbonat (PEC)

3.4.2.1 Darstellung des PEC

PEC wird durch Copolymerisation von Kohlendioxid und Ethylenoxid hergestellt. Wird Diethylzink / Ethylenglycol als Katalysator verwendet, erhält man PEC mit den Eigenschaften eines hohen Ethylencarbonatanteils, einer niedrigen Polydispersität und einer hohen Glasübergangstemperatur.

Die Copolymerisation läuft in drei Schritten ab. Der erste Schritt ist die Aktivierung durch den nukleophilen Angriff an das Ethylenoxid Molekül. Der zweite Schritt ist die Carboxylierung des gebildeten Zinkalkoholats. Die Anwesenheit von Zn^{2+} -Kationen ist von großer Bedeutung, da andere Alkoholate, wie zum Beispiel die des Lithiums, Magnesiums, Calciums und Aluminiums, in der Anwesenheit von solch großen Mengen CO_2 nicht so leicht carboxyliert werden können. Der dritte Schritt der Copolymerisation ist die Kettenverlängerung, bei der ein Ethylenoxidmolekül durch ein carboxyliertes Zinkalkoholatmolekül angegriffen wird (Abb. 3.111).

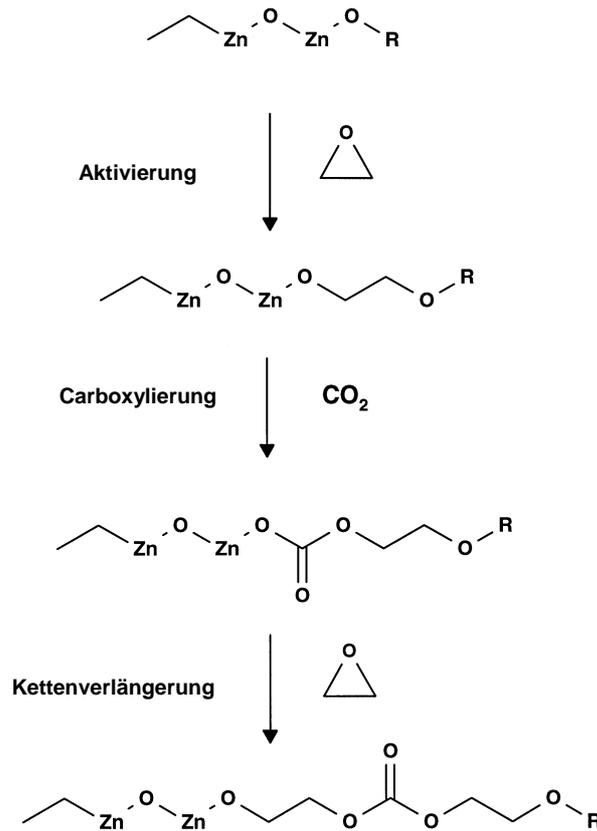


Abb. 3.111: Darstellung von PEC [Acemoglu et al., 1997].

3.4.2.2 Abbaumechanismus des PEC

Die Bioabbaubarkeit *in vivo* wird sehr durch den Gehalt an Etherfunktionen im Polymer, das Molekulargewicht der Produkte und den Katalysator, der für die Synthese des PEC verwendet wurde, beeinflusst. Interessanterweise findet ein biologischer Abbau des Polymers bei Polyethylencarbonaten mit $M_r < 100000$ kaum statt. Im Vergleich dazu zeigen Polyethylencarbonate mit einem $M_r > 130000$ nahezu den gleichen biologischen Abbau *in vivo* durch Oberflächenerosion [Acemoglu et al., 1997].

Bei dem Abbauprozess des PEC handelt es sich *in vivo* und *in vitro* um einen nicht enzymatischen Prozess. In der Gegenwart von Hydrolasen, Serum oder Blut wird kein Abbau des PEC beobachtet. Verantwortlich für den Abbau sind die Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^- \cdot$), welche *in vivo* durch inflammatorische Zellen produziert werden. Der biologische Abbau erfolgt über Oberflächenerosion ohne eine signifikante Änderung der molekularen Masse der restlichen Polymermasse. Der nicht hydrolytische Bioabbau durch Superoxidradikalanionen bildende Zellen (z.B. Makrophagen) ist einzigartig unter den bioabbaubaren Polymeren. Die Bildung von Ethylencarbonat (EC) kann formal durch radikalische oder anionische Mechanismen begonnen werden. Um die Kettenreaktion auszulösen, sind lediglich katalytische Mengen des Initiators notwendig. Diese endet letztlich mit dem kompletten

Abbau der Polycarbonatkette (Abb. 3.112). Das Superoxidradikalanion kann in beiden Fällen als Initiator dienen [Stoll et al., 2001].

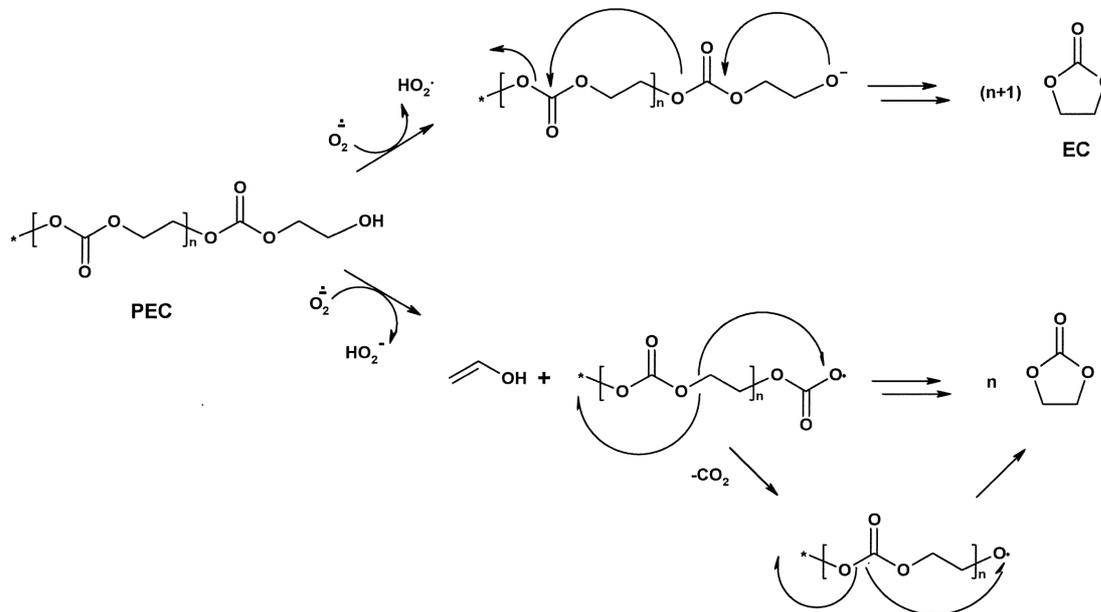


Abb. 3.112: Abbau des Polyethylencarbonats (PEC).

Das Hauptabbauprodukt des PEC in wässrigen Systemen ist Ethylenglycol, welches durch Hydrolyse von Ethylencarbonat (EC) entsteht (Abb. 3.113).

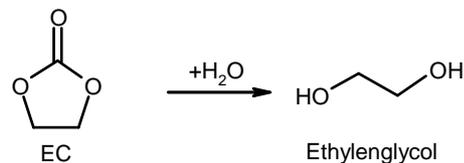


Abb. 3.113: Endprodukt des PEC-Abbaus in wässrigen Systemen, EC=Ethylencarbonat.

In dieser Arbeit wurde PEC verwendet, welches ein durchschnittliches Molekulargewicht von 264 kDa und eine Polydispersität von 1,82 aufwies.

3.4.3 Schichtdickenbestimmung des PEC-Polymerfilms

Bestimmung der Dicke des PEC-Polymerfilms auf einem Glasträger

Die Schichtdickenbestimmung der Polymerschicht war wichtig, um den Bioabbau des PEC zur Zeit und zur verwendeten Zellzahl in Relation setzen zu können. AFM (Atomic Force Microscopy) wurde als analytisches Instrument zur Dickenbestimmung verwendet. Fehlstellen, die beim Spin Coating in der Polymerschicht entstanden sind, konnten zur Dickenmessung herangezogen werden.

Zur AFM Messung wurde ein SPI-Glasträger eingesetzt, der mit 200 μl einer 2,5 % PEC-Lösung beschichtet wurde.

Das Phasenkontrastbild liefert Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit. In diesem Fall handelt es sich um eine weiche Oberfläche. Dies korreliert mit den Eigenschaften des Polyethylencarbonats (Abb. 3.114).

Das Rauigkeitsbild gibt Auskunft über die Oberfläche in Bezug auf deren Rauigkeit. Sie lag unter ± 1 nm. Dies konnte als Bestätigung für ein gutes Spin Coating der SPI-Glasträger angesehen werden (Abb. 3.115).

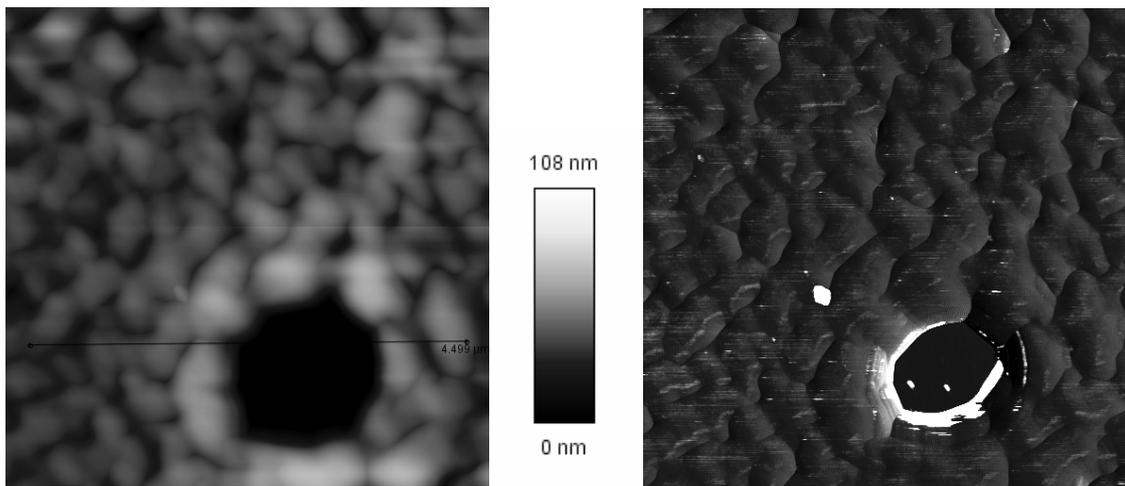


Abb. 3.114: AFM-Aufnahme einer Fehlstelle im PEC-Polymerfilm auf dem SPI-Glasträger; links: Das Steigungsbild mit Höhenmaßstab; rechts: Das Phasenkontrastbild.

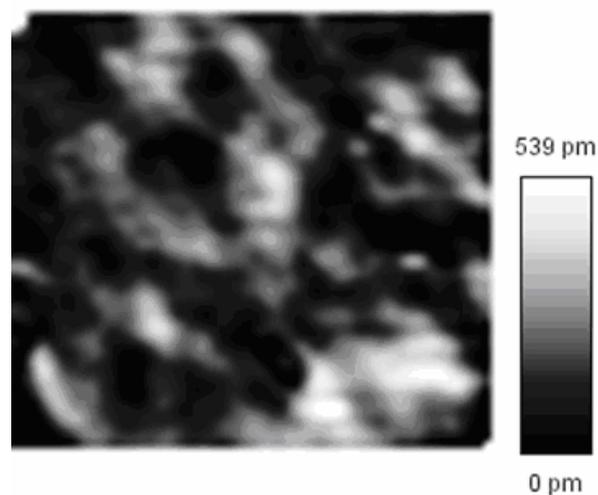


Abb. 3.115: Rauigkeitsbild mit Rauigkeitsmaßstab des PEC-Polymerfilms auf dem SPI-Glasträger.

Der Höhenunterschied zwischen dem Boden des SPI-Glasträgers und der PEC-Polymerschicht betrug 119 nm (Abb. 3.116).

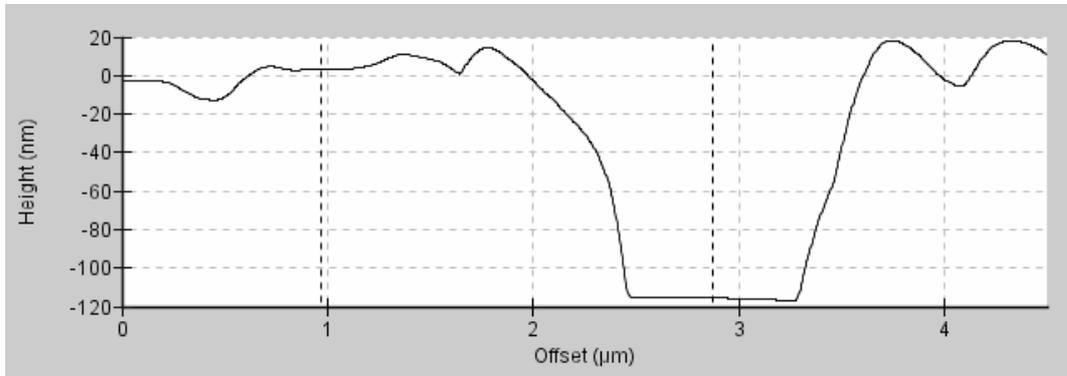


Abb. 3.116: Höhenprofil der Fehlstelle im PEC-Polymerfilm auf dem SPI-Glasträger.

Bestimmung der Dicke des PEC-Polymerfilms auf einem Goldprisma

Die Schichtdickenbestimmung der PEC-beschichteten Goldprismen erfolgte mittels Profilometer. Dieses ist in der Lage, die Rauigkeit einer Oberfläche zu messen. Es wurde ein ca. 1 cm langer „Graben“ in das Polymer geritzt. Dieser wurde dann mit der Spitze des Profilometers abgerastert. Der Höhenunterschied konnte daraufhin im Höhenprofil am Computer ermittelt werden, dieser betrug $70,1 \pm 4,4$ nm.

Zur Messung der PEC-Filmdicke wurde ein Goldprisma eingesetzt, das mit 200 µl einer 0,625 % PEC-Lösung beschichtet wurde.

3.4.4 PEC-Polymerabbau auf der SPI-Messplattform

Bei diesen Bioabbaubarkeitsstudien wurden murine Makrophagen der Zelllinie J774A.1 verwendet. Als Träger dienten PEC-beschichtete SPI-Glasträger, die mit 200 µl einer 2,5 % PEC-Lösung beschichtet wurden.

Ziel dieser Messreihe war es, den Schichtdickenabbau in Korrelation zur Zeit und zur verwendeten Zellzahl zu ermitteln.

Bei Messungen mit dem SPI-Gerät war es wichtig, dass zu Beginn einer jeden Messung eine stabile Basislinie eingestellt wurde. Eine „Drift“ der Basislinie würde eine Schichtdickenänderung vortäuschen.

3.4.4.1 Immobilisierung von Makrophagen in situ auf einem PEC-Polymerfilm

Die Zellen wurden zur Immobilisierung aus einer Makrophagen-Zellsuspension (in DMEM) mit der Zellkonzentration von $8,27 \times 10^3$ Zellen/ml entnommen.

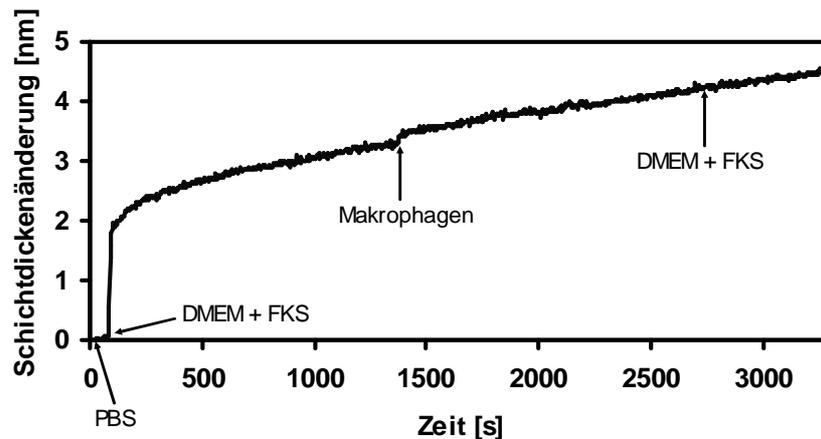


Abb. 3.117: Sensorgramm der Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-beschichteten Glasträger.

Als erster Schritt wurde DMEM+FKS über den PEC-beschichteten Glasträger gegeben, welches eine Schichtdickenzunahme von 3 nm zur Folge hatte. Die Flussrate betrug 144 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nach 1400 s wurden Makrophagen über den PEC-Polymerfilm geleitet, wobei eine Schichtdickenänderung von ca. 0,7 nm eintrat. Zum Schluss folgte das Spülen der Messzelle mit DMEM+FKS. Dies führte aber zu keiner sichtbaren Schichtdickenänderung. Über den Messzeitraum von gut 1 Stunde zeigte das Sensorgramm nach der ersten DMEM+FKS Zugabe einen Driftverlauf. Es konnte nach Zugabe der Makrophagen kein Abbau des PEC verzeichnet werden (Abb. 3.117).

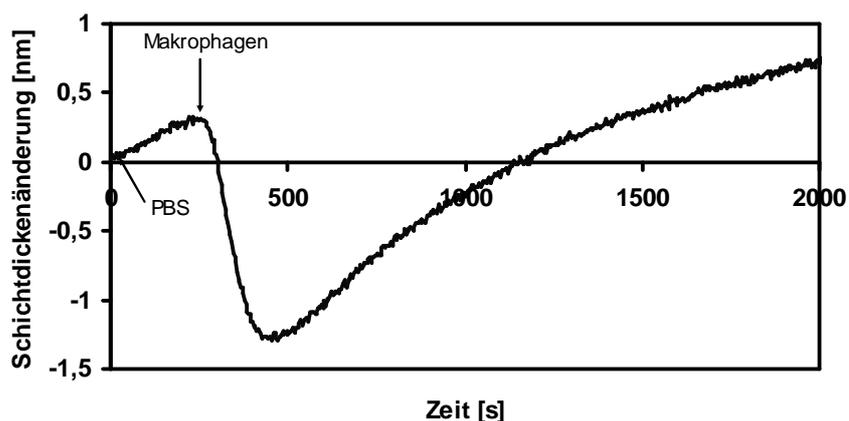


Abb. 3.118: Sensorgramm der Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-beschichteten Glasträger.

Die verwendete Zellkonzentration bei dieser Messung lag bei $1,7 \times 10^5$ Zellen/ml. Aufgrund der Probleme mit dem Driftverhalten des Messsignals wurde die Flussrate auf 36 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert und es wurden nur Zellen auf den PEC-beschichteten

Glasträger gegeben. Nach Zugabe der Zellsuspension wurde eine Schichtdickenabnahme von 1,25 nm erreicht, die aber durch die Drift des Messsignals nicht konstant blieb (Abb. 3.118).

Zusammenfassend war die Versuchsreihe nicht zufriedenstellend. Es wurde mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen und unterschiedlichen Flussraten gearbeitet. Das FKS des Nährmediums scheint sich an den Polymerfilm anzulagern, was sich durch eine Schichtdickenzunahme zeigt. Das Problem der starken Drift des Messsignals konnte nicht unterbunden werden. Das Ziel, die Messung der Schichtdickenabnahme des PEC, wurde nicht erreicht.

3.4.4.2 Prä-Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-Polymerfilm

Die Immobilisierungsstrategie wurde so verändert, dass die Immobilisierung der Makrophagen nicht *in situ*, also während des Versuchs, auf der Polymerschicht stattfand, sondern die Zellen direkt auf einem PEC-beschichteten Glasträger kultiviert wurden. Die Zellzahl wurde für alle weiteren Versuche normiert und lag bei $3,4 \times 10^5$ Zellen/ml. Die beschichteten Träger wurden vor der Kultivierung mit Isopropanol desinfiziert und unter der Werkbank getrocknet. Die Kultivierung wurde in Petrischalen durchgeführt. Es wurde gewartet bis Adhärenz der Zellen eintrat. War das der Fall, wurde der Chip vorsichtig in die Messkammer eingesetzt. Dieser Schritt sollte in einer möglichst kurzen Zeit durchgeführt werden, da die Gefahr des Eintrocknens der Zellen bestand. Der messbereite Chip wurde 1 Minute lang mit DMEM ohne FKS bei einer Flussrate von 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ gespült. Danach wurde die Pumpe ausgeschaltet, der Fluss gestoppt. Dies war nötig, um nicht eine vermeintliche Schichtdickenänderung durch Ablösen von Zellen bzw. Polymer aufgrund der Scherkräfte, die in der Messkammer herrschten, zu erhalten. Zur Versorgung der immobilisierten Zellen wurde stündlich die Pumpe für 1 Minute bei einer Flussrate von 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ gestartet.

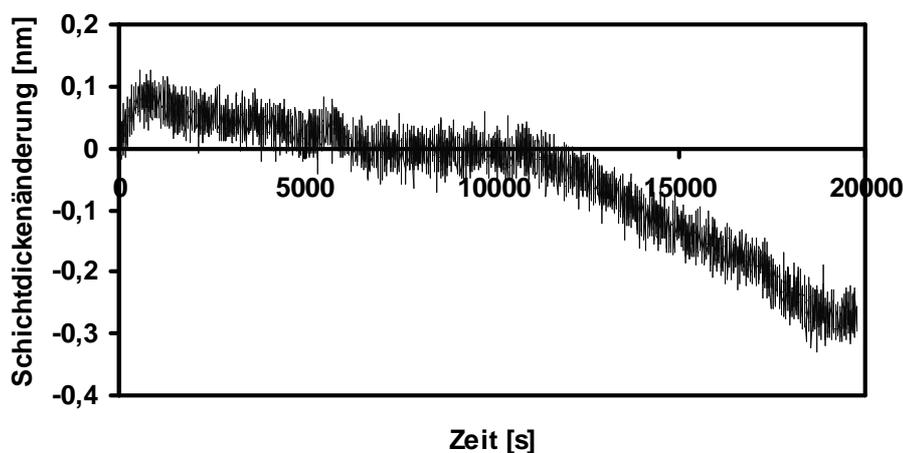


Abb. 3.119: Sensorgramm des PEC-Abbaus durch Makrophagen, die auf einem PEC-beschichteten Glasträger präimmobilisiert wurden.

Der mit Makrophagen ($3,4 \times 10^5$ Zellen/ml) kultivierte Glasträger wurde nach dem Einstellen der Basislinie mit DMEM für 20000 s (5,5 Stunden) vermessen (Abb. 3.119). Die Schichtdickenabnahme der PEC-Polymerschicht lag bei 0,3 nm.

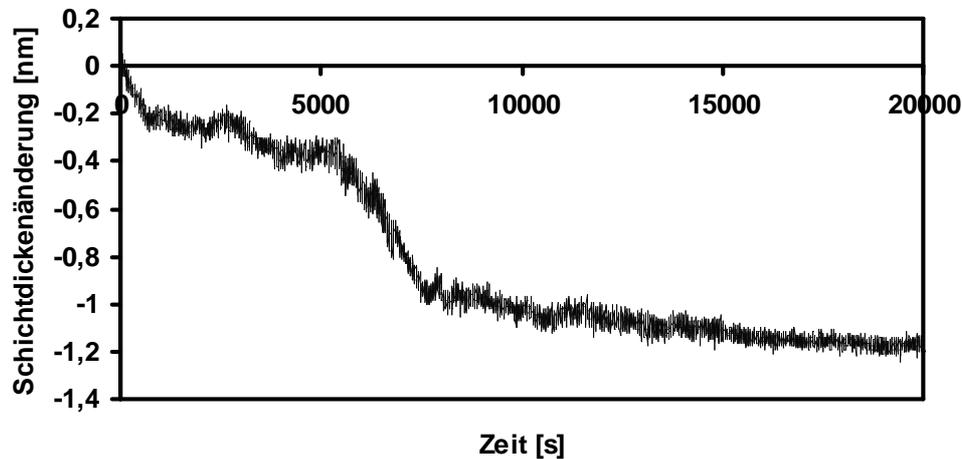


Abb. 3.120: Sensorgramm des PEC-Abbaus durch Makrophagen, die auf einem PEC-beschichteten Glasträger präimmobilisiert wurden.

Im Vergleich zu Abb. 3.119 zeigt das Sensorgramm in Abb. 3.120 einen deutlich anderen Verlauf. Nach Einstellen der Basislinie mit DMEM zeigte sich eine dreistufige Änderung der Schichtdicke. Die erste Stufe hat eine relativ große negative Steigung bis etwa 900 s. Bei diesem Zeitpunkt erreicht das Messsignal das erste Plateauniveau bei -0,2 nm. Bei 2800 s beginnt die zweite Stufe, wobei hier die negative Steigung kleiner ist. Das Plateauniveau ist bei 4000 s erreicht und bleibt bei einem Signalwert von ca. -0,4 nm konstant bis 5400 s. Ab dort ändert sich das Messsignal mit einer ähnlich großen Steigung wie bei der ersten Stufe und erreicht eine Schichtdickenänderung von -1,0 nm, die im weiteren Messverlauf eine Drift weiter in den negativen Bereich hat.

In dieser Bioabbaubarkeitsstudie des PEC konnten relativ große Schichtdickenabnahmen gezeigt werden. Die einzelnen Tests wurden unter den gleichen Bedingungen wie Polymerschichtdicke, Zellzahl, Temperatur, Kulturmedium, Flussrate und Versorgungsintervalle der Zellen während der Messung durchgeführt. Werden jedoch die Sensorgramme aus Abb. 3.119 und Abb. 3.120 miteinander verglichen und ausgewertet, so ist die Reproduzierbarkeit mit diesem Messsystem nicht gewährleistet. Ebenso ist das Maximum des Polymerabbaus nach unterschiedlichen Zeiten erreicht und variiert stark. Beim Kontrollversuch (nur DMEM ohne Zellen und FKS) konnte kein Abbau des Polymers gemessen werden.

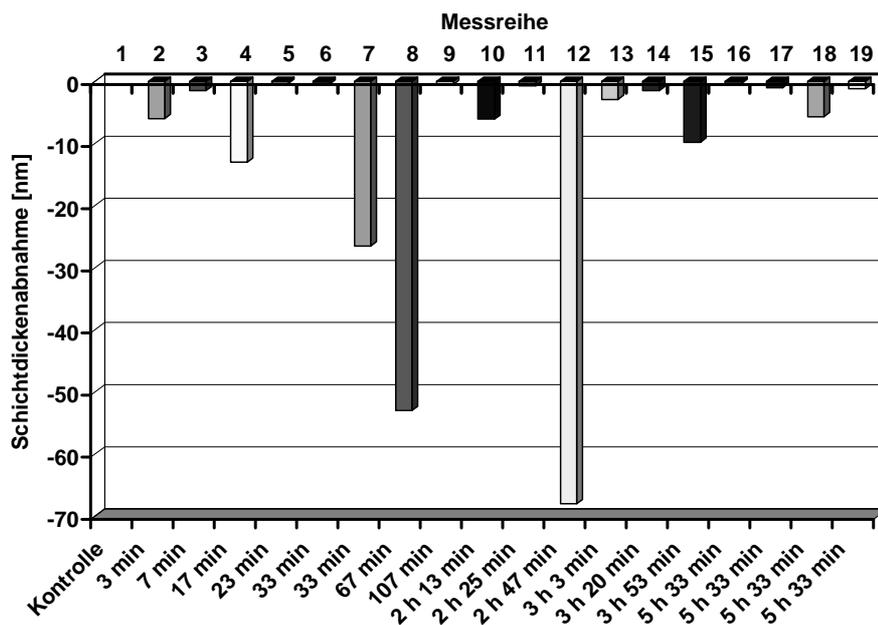


Abb. 3.121: Maximale PEC-Schichtdickenabnahmen bei gleicher Zellzahl.

Der Zeitpunkt des maximalen PEC-Abbaus für die jeweilige Messreihe ist in Abb. 3.121 angegeben. Der Schichtdickenabbau lag in einem Bereich von -0,3 (Messreihe 5) bis -68 nm (Messreihe 12). Trotz gleicher Bedingungen bei den einzelnen Messungen war es nicht möglich gleiche Schichtdickenabnahmen in einem gleichen Zeitfenster zu erreichen. Das Verhalten des Messsignals nach Erreichen der maximalen Schichtdickenabnahme war bei den einzelnen Tests ebenso divergent wie der Zeitpunkt der maximalen Schichtdickenabnahme. In den seltensten Fällen blieb das Messsignal auf dem Minimumplateau, also bei dem Wert für den maximalen Schichtdickenabbau.

Bilder eines PEC-beschichteten Glasträgers nach Polymerabbau

Abb. 3.122 zeigt drei mikroskopische Bilder eines PEC-beschichteten SPI-Glasträgers. Das erste Bild (oben links) zeigt eine Übersichtsaufnahme des Messspots nach einem PEC - Bioabbauversuch. Bei den kleinen weißen Punkten handelt es sich um Makrophagen. Das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer PEC - Polymerschicht zu einem Zeitpunkt kurz nach Adhärenz der Zellen. Die Makrophagen haben bereits mit dem biologischen Abbau des Polymers begonnen und sitzen in kleinen Clustern in von ihnen gebildeten Löchern im Polyethylencarbonat (siehe Kreis). Das untere Bild zeigt den PEC - Polymerfilm zum Schluss des Abbaus. Die Polyethylencarbonat-Beschichtung ist extrem porös; große Teile sind durch die Makrophagen abgebaut worden.

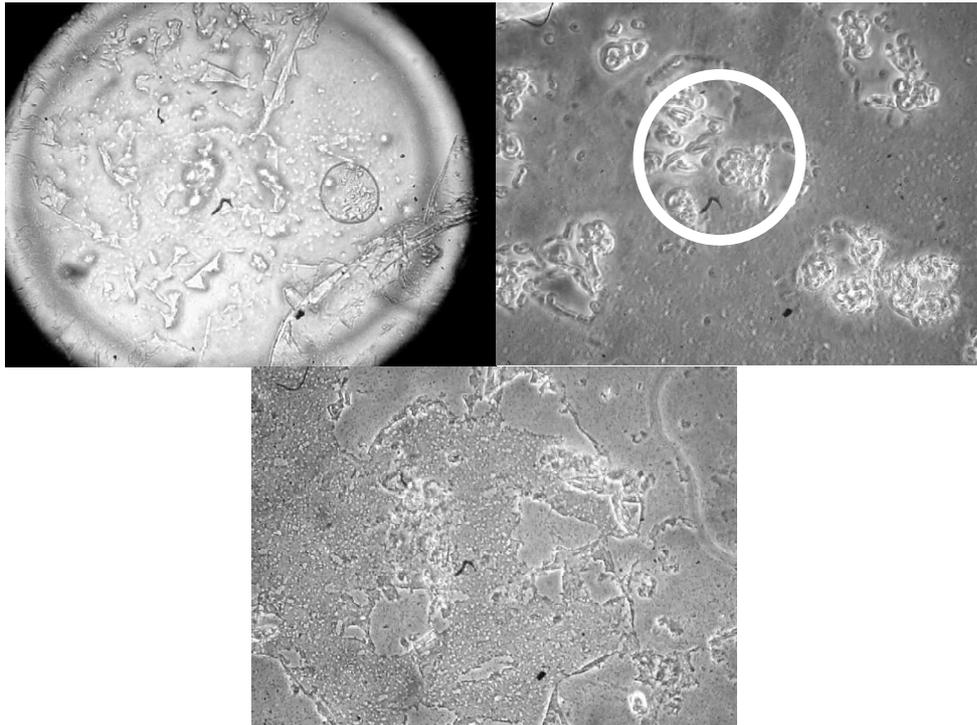


Abb. 3.122: Mikroskopische Bilder von Makrophagen auf einem PEC-beschichteten Glasträger; links oben: Übersichtsbild des Messspots; rechts: Makrophagen befinden sich in „Löchern“, die durch den PEC-Abbau entstanden sind; unten: fortgeschrittener PEC-Abbau.

Zusammenfassung

Da die Bioabbaustudien des Polyethylencarbonats durch Makrophagen mittels SPI nicht zufriedenstellend waren, wurden Messreihen unter Zuhilfenahme der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) durchgeführt.

3.4.5 PEC-Polymerabbau auf der SPR-Messplattform

Die PEC-Abbaustudien wurden wie in Kapitel 3.4.4 mit murinen Makrophagen der Zelllinie J774A.1 durchgeführt. Als Träger dienen PEC-beschichtete Goldprismen, die mit 200 μ l einer 0,625 % PEC-Lösung beschichtet waren.

Das Ziel dieser Messreihen war es, den Umfang des Schichtdickenabbaus des PEC durch die Makrophagen in Relation zur Zeit und zur verwendeten Zellzahl zu ermitteln. Des Weiteren wurde die Auswirkung von Triggerfaktoren auf den Abbau des Polymers untersucht.

3.4.5.1 Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-Polymerfilm

Um eine optimale Immobilisierung der Makrophagen zu gewährleisten, wurde die Zellzahl auf die zur Verfügung stehende Fläche berechnet. Als Grundlage dient die Größe der Makrophagen, die 10 bis 20 μ m beträgt. Bezogen auf die Messspotfläche von 6 mm² können bei einer Makrophagengröße von 20 μ m 19000 Makrophagen auf dem PEC-beschichteten Goldchip immobilisiert werden, bei 10 μ m 76000.

Legt man den Durchschnitt von 15 μm zu Grunde, werden 34000 Makrophagen auf dem Träger immobilisiert.

Für die Versuchsreihen wurde eine niedrige (10500 Zellen/Messspot) und eine hohe (28000 Zellen/Messspot) Zellzahl verwendet.

Nach kurzem Anstieg des Messsignals, der auf die Sedimentation der Makrophagen zurückzuführen ist, fällt das Signal nicht linear bis zum Erreichen eines bestimmten Grenzwertes ab, bei dem der Polymerabbau beendet ist (Abb. 3.123).

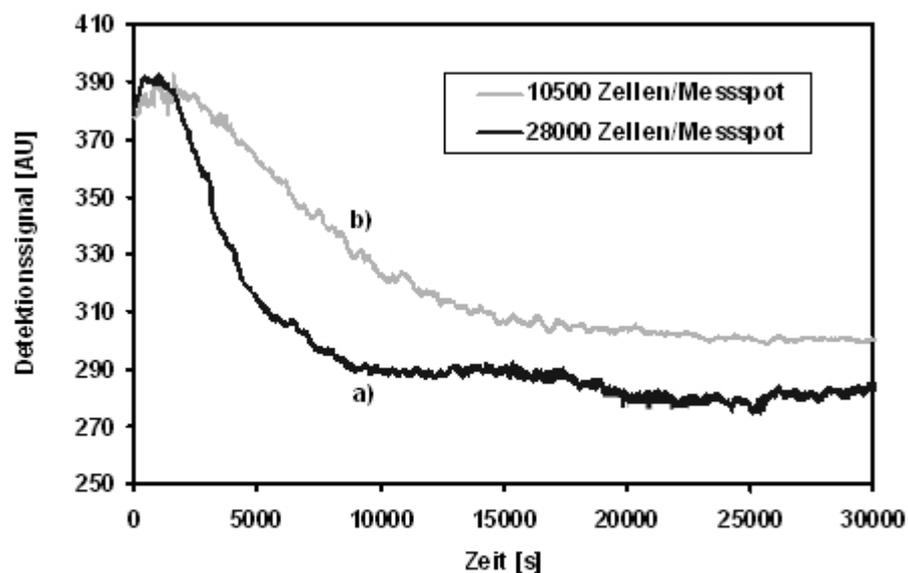


Abb. 3.123: Sensorgramm des PEC-Abbaus durch Makrophagen in Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Die höhere Konzentration a) führt zu einer größeren negativen Steigung als die niedrigere b).

Das Messsignal lag am Ende des Polymerabbaus mit 10500 Zellen/Messspot bei 300,7 AU. Die negative Steigung des Sensorgramms ist relativ klein. Verglichen mit dem Ausgangssignal beträgt die Differenz 80,4 AU. Die höhere Konzentration von 28000 Zellen/Messspot ergab ein Minimumsignal von 280,8 AU, was einer Abnahme von 100,0 AU entspricht (Abb. 3.123).

Beim Kontrollversuch, der ohne Zellen, nur mit Nährmedium auf einem PEC-beschichteten Goldträger durchgeführt wurde, konnte kein Abbau des Polymers festgestellt werden (Abb. 3.124). Es zeigte sich eine Drift des Messsignals von 2,0 AU über einen Zeitraum von 30000 s.

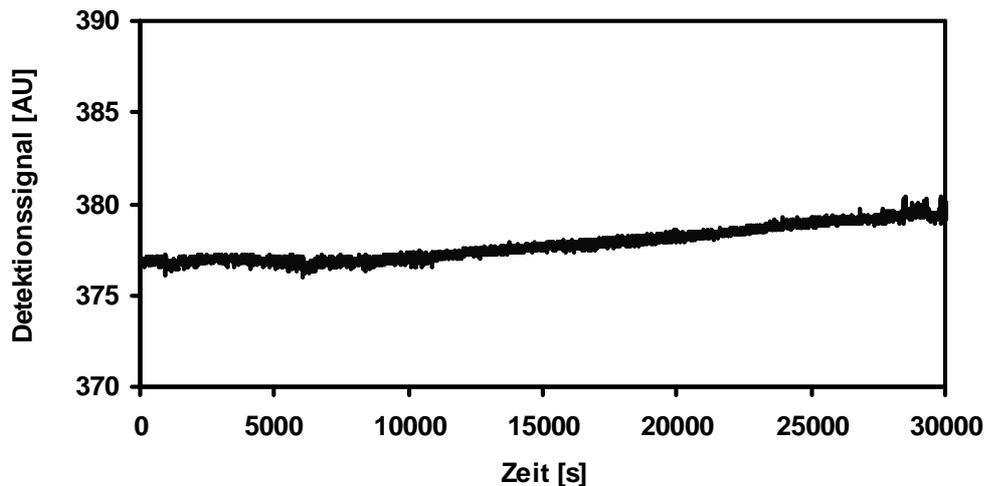


Abb. 3.124: Sensorgramm des Kontrollversuchs des PEC-Abbaus auf der SPR-Messplattform.

Die Tab. 3.21 gibt die Mittelwerte der Dreifachbestimmung (\pm Standardabweichung) für den Polymerabbau in AU auf den Goldprismen in Abhängigkeit der Zeit wieder.

Tab. 3.21: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] ohne Trigger für die Zellzahl 10500 und 28000 Zellen/Messspot.

Zellzahl [Zellen/Messspot]	10500	28000
Zeit [h]		
0,5	8,4 \pm 1,4	2,4 \pm 0,4
1	0,7 \pm 2,9	-41,6 \pm 2,6
1,5	-17,6 \pm 4,8	-68,7 \pm 4,5
2	-34,4 \pm 5,7	-80,1 \pm 1,9
3	-47,5 \pm 3,6	-89,6 \pm 3,1
4	-53,8 \pm 5,4	-90,6 \pm 3,3
5	-72,3 \pm 3,5	-94,3 \pm 2,6
6	-74,9 \pm 4,0	-98,3 \pm 4,6
7	-76,4 \pm 5,0	-98,5 \pm 3,9
8	-76,8 \pm 4,1	-98,1 \pm 2,8
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC	

In Tab. 3.22 sind die maximalen negativen Steigungen der Einzelkurven aufgetragen. Für 10500 Zellen/Messspot lag die maximale negative Steigung bei -1,04 % nach 4850 Sekunden (1 Stunde 20 Minuten 50 Sekunden). Die maximale negative Steigung für die Zellkonzentration von 28000 Zellen/Messspot betrug -2,46 % nach 2501 Sekunden (41 Minuten 41 Sekunden).

Tab. 3.22: Zeitpunkt der maximalen negativen Steigung des PEC-Abbauprozesses durch Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl.

Zellzahl [Zellen/Messspot]	Steigung	Bestimmtheits- mass [R ²]	Zeitpunkt [s]	Steigung [%]
10500	-0,0104	0,9445	4850	-1,04
28000	-0,0246	0,9786	2501	-2,46

3.4.5.2 Bilder von immobilisierten Makrophagen

Die Bilder zeigen immobilisierte Makrophagen auf einem PEC-beschichteten Goldträger (Abb. 3.125):

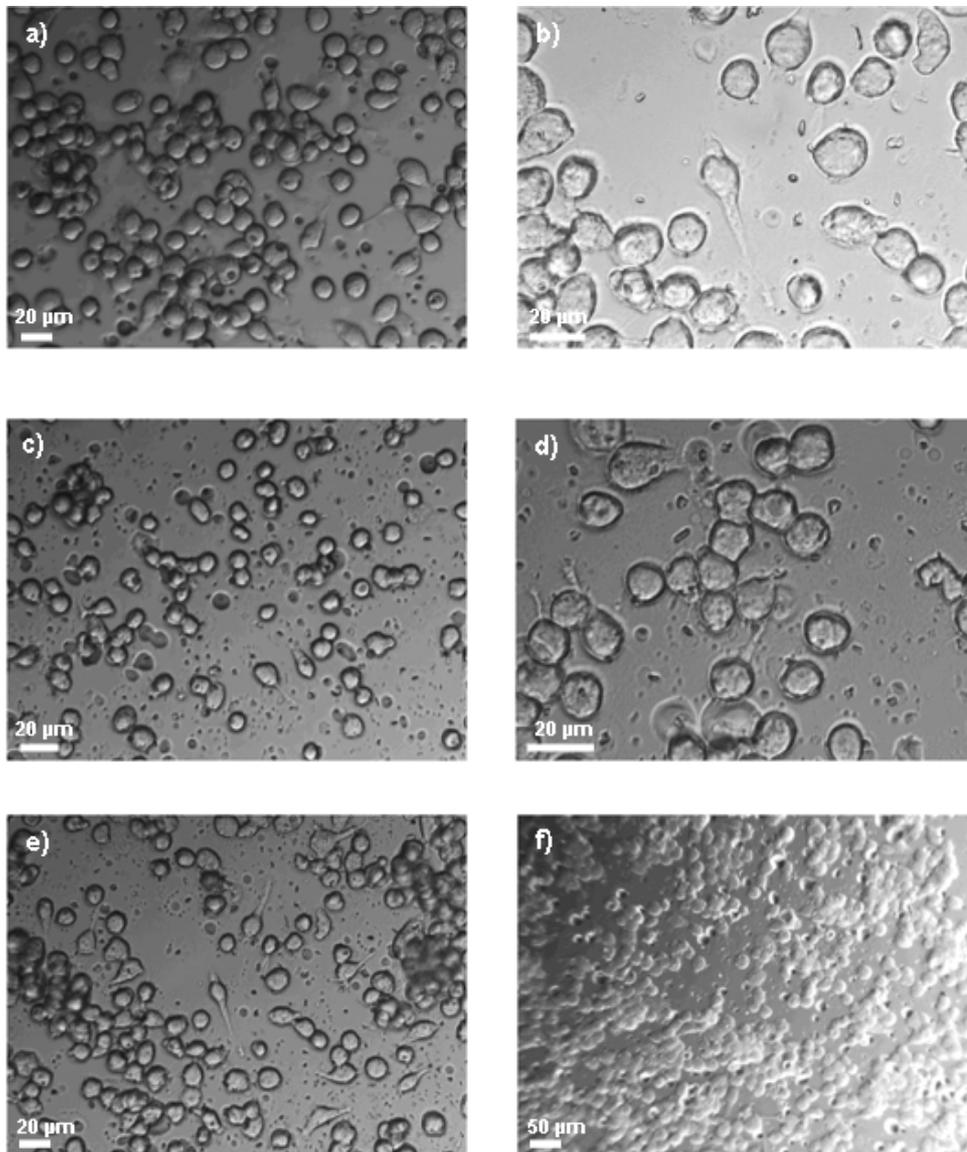


Abb. 3.125: 3D-videomikroskopische Aufnahmen immobilisierter Makrophagen auf einem PEC-beschichteten Goldchip.

(a) Makrophagen 30 Minuten nach Zugabe auf den PEC-beschichteten Goldchip. Die Adhärenz der Zellen ist gut zu erkennen.

(b) Vergrößerung von (a), hier beginnen die Makrophagen mit der Ausdifferenzierung. Sie bilden sogenannte „Füßchen“ aus.

(c) Die Makrophagen beginnen das PEC abzubauen und formen Löcher, in denen sie sich befinden. In der Vergrößerung (d) ist dieses gut zu erkennen.

(e) Das Bild zeigt die Clusterbildung der Makrophagen nach Zugabe auf den PEC-Polymerfilm.

(f) Die Makrophagen bilden keinen geschlossenen Zellverband.

Abb. 3.126 zeigt zwei videomikroskopische Aufnahmen eines PEC-beschichteten Goldträgers nach Beendigung einer PEC-Abbaustudie. Das linke Bild repräsentiert den Übergangsbereich zwischen reiner und polymerbeschichteter Goldoberfläche. Im linken Bereich der Aufnahme befindet sich PEC-freie Goldoberfläche (siehe Pfeil). Im rechten Bereich des Bildes sind die Makrophagen gut zu erkennen, wie sie auf dem Polymerfilm adhärent geworden sind.

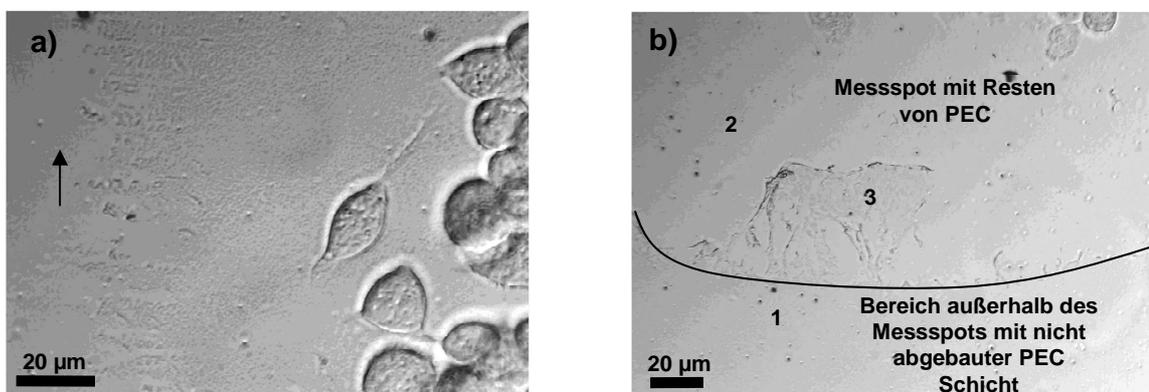


Abb. 3.126: 3D-videomikroskopische Aufnahmen der Randbereiche des Messspots eines PEC-beschichteten Goldchips nach der PEC-Abbaustudie.

Das rechte Bild zeigt den Randbereich des Messspots, der zuvor mit PEC-beschichtet war (1). Das Polymer wurde aufgrund der Adhärenz der Makrophagen abgebaut (2). Oben rechts in dem Bild ist noch ein kleiner Cluster aus drei verbliebenen Makrophagen zu sehen. Der Großteil der Makrophagenpopulation wurde beim Entfernen der Küvette vom Messspot weggespült. Ebenso ist am unteren Rand des rechten Bildes, beim Übergang vom Polymerfilm zur Goldoberfläche, ein beträchtliches Stück Polymerfilm auf dem eigentlich PEC-freien Messspot zu sehen, welches durch das Herausnehmen des Goldchips aus der Halterung entstanden ist (3). Der größte Teil des Polymerfilms auf der Messspotfläche wurde radikalisch durch die Makrophagen abgebaut. Anfangs läuft dieser Abbauprozess erosiv ab. Schaut man sich in diesem Zusammenhang das linke Bild an, so sind deutlich „poröse“ Stellen in der Oberfläche des Polymerfilms zu erkennen. Je länger die Makrophagen in einer Kavität der Küvette auf dem Messspot verbleiben, je stärker ist dieser erosive Effekt des Superoxidradikalanions.

3.4.5.3 Makrophagen mit Triggerfaktoren

Für diese Messreihen wurden die gleichen Zellkonzentrationen pro Messspot gewählt wie bei den Versuchen ohne Triggerfaktoren. Als Trigger dienten: Concanavalin A, LPS aus *Escherichia coli* und LPS aus *Salmonella typhimurium*. Es wurden Stammlösungen

der jeweiligen Trigger hergestellt, die durch weitere Verdünnungen auf die entsprechende Konzentration der Einzellösung gebracht wurden. Für die Versuche lagen die Konzentrationen der Lösungen der Triggerfaktoren in einem Bereich zwischen 1 – 100 ng/ml. Die Makrophagen wurden unter Einfluss eines jeden Triggers immobilisiert. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Darüber hinaus wurde jeweils ein Kontrollversuch ohne Zellen, mit Nährmedium und der höchsten Triggerkonzentration durchgeführt.

Ziel war es, eine Aussage darüber machen zu können, wie die Trigger sich auf den Abbau des Polymers auswirken. Hierzu wurden die Kinetiken der einzelnen Sensorgramme berechnet, indem eine Tangente an den steilsten Punkt der Kurve gelegt und der $\tan\alpha$ des Steigungswinkels berechnet wurde. Um die Kinetik besser bestimmen zu können, wurden die Signaländerungen gegenüber der Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des Triggerfaktors und der Zellkonzentration dargestellt (Abb. 3.127 bis Abb. 3.132). In dieser Art der Darstellung werden auf den ersten Blick die verschiedenen Steigungen der Einzelkurven deutlich. Die Größe der Steigung am Ort x gibt eine Aussage über die Abbaukinetik zum Zeitpunkt x .

Makrophagen getriggert mit ConA

Die 3D-Grafiken (Abb. 3.127, Abb. 3.128) zeigen die interpolierten Abbaukurven des PEC durch Makrophagen unter Einfluss unterschiedlicher ConA- und Zellkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit.

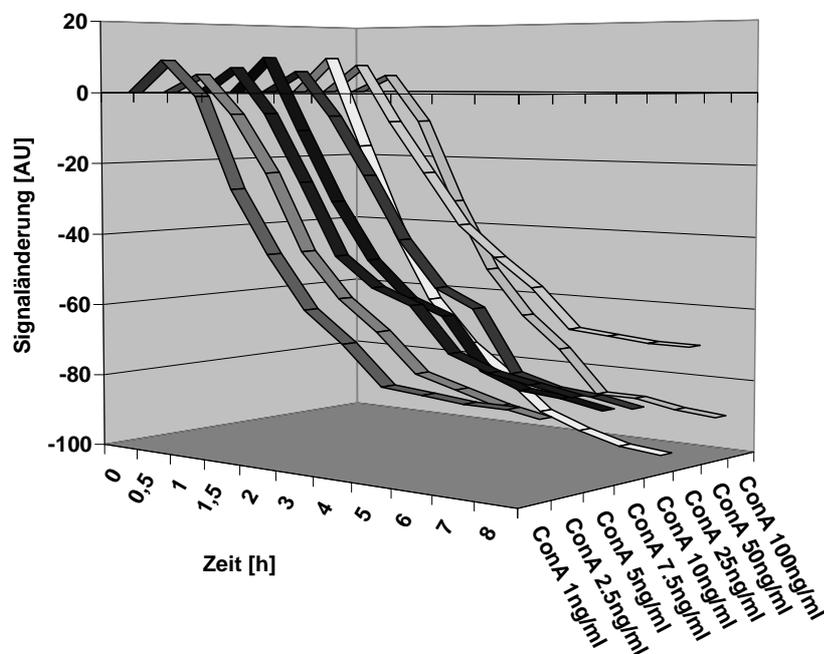


Abb. 3.127: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (10500 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener ConA – Konzentrationen.

Das Maximum des Polymerabbaus lag bei einer Zellkonzentration von 10500 Zellen/Messspot und einer ConA-Konzentration von 25 ng/ml bei $-95,0 \pm 2,6$ AU. Das Minimum des Abbaus lag bei $68,7 \pm 4,5$ AU bei einer ConA-Konzentration von 50 ng/ml ConA (Abb. 3.127).

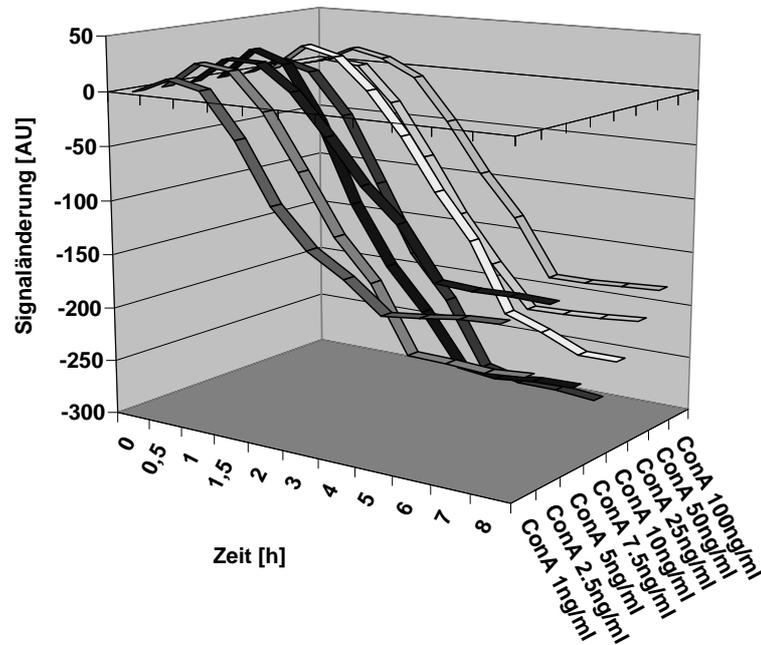


Abb. 3.128: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (28000 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener ConA – Konzentrationen.

Die Zellkonzentration 28000 Zellen/Messspot führte zu einem maximalen Abbau des PEC von $-255,3 \pm 4,7$ AU bei einer ConA – Konzentration von 10 ng/ml. Der minimale Polymerabbau lag bei $-153,0 \pm 4,4$ AU bei 5 ng/ml ConA (Abb. 3.128).

Die Tab. 3.23 und Tab. 3.24 geben die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) für den Polymerabbau in AU auf den Goldprismen in Abhängigkeit des Triggers ConA und der Zeit wieder.

Tab. 3.23: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellzahl 10500 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors ConA.

ConA [ng/ml] Zeit [h]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
0,5	9,7 ±2,1	3,3 ±1,5	5,0 ±2,6	7,3 ±2,5	4,7 ±1,5	7,0 ±2,6	5,7 ±2,5	6,0 ±1,7
1	-1,3 ±1,5	-4,7 ±1,5	-4,3 ±2,1	-8,7 ±2,5	-5,3 ±1,5	-14,3 ±2,9	-6,7 ±2,5	-7,3 ±2,9
1,5	-26,0 ±4,0	-17,0 ±5,0	-18,3 ±6,5	-25,3 ±5,1	-20,3 ±3,5	-38,0 ±3,6	-21,7 ±4,0	-30,7 ±4,0
2	-40,3 ±2,5	-40,3 ±3,8	-40,7 ±4,0	-43,0 ±3,6	-38,0 ±3,6	-58,3 ±2,9	-37,3 ±2,9	-51,3 ±2,9
3	-54,3 ±3,1	-47,7 ±7,5	-47,0 ±6,6	-53,0 ±3,6	-51,3 ±3,5	-68,3 ±3,5	-45,7 ±4,0	-63,7 ±4,0
4	-63,7 ±3,2	-59,7 ±3,5	-55,3 ±2,9	-58,3 ±3,8	-57,7 ±2,5	-77,7 ±2,5	-52,0 ±3,6	-73,3 ±2,9
5	-72,0 ±2,6	-66,7 ±6,0	-63,0 ±5,6	-72,0 ±2,6	-72,0 ±4,4	-83,7 ±4,7	-65,7 ±5,1	-84,7 ±4,0
6	-73,0 ±3,0	-70,3 ±5,1	-70,3 ±2,5	-76,0 ±3,6	-77,0 ±2,6	-91,3 ±2,9	-65,3 ±2,5	-85,3 ±2,9
7	-74,7 ±2,5	-72,0 ±7,0	-69,3 ±5,1	-77,7 ±2,5	-77,7 ±3,5	-93,3 ±3,8	-67,0 ±4,4	-87,3 ±2,9
8	-75,7 ±1,5	-76,3 ±4,0	-72,0 ±5,0	-79,0 ±3,6	-80,3 ±2,5	-95,0 ±2,6	-68,7 ±4,5	-87,7 ±4,0
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

Tab. 3.24: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellkonzentration 28000 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors ConA.

ConA [ng/ml] Zeit [h]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
0,5	12,7 ±2,8	26,3 ±3,2	26,3 ±3,2	31,3 ±3,2	19,0 ±3,6	24,0 ±3,6	9,2 ±1,6	17,0 ±3,0
1	6,7 ±1,5	23,7 ±4,7	26,3 ±4,5	20,2 ±2,6	7,5 ±1,8	19,0 ±2,0	5,0 ±1,0	9,3 ±1,5
1,5	-30,3 ±3,4	-10,0 ±3,6	0,3 ±0,3	-29,0 ±3,6	-29,3 ±2,9	-10,3 ±1,5	-25,3 ±3,4	-7,5 ±0,9
2	-84,3 ±4,2	-60,0 ±4,4	-34,0 ±4,4	-101,7 ±4,0	-88,7 ±4,0	-48,3 ±4,7	-73,3 ±4,7	-44,7 ±4,2
3	-118,7 ±3,2	-113,3 ±3,4	-74,3 ±3,4	-154,3 ±3,4	-148,7 ±3,8	-102,7 ±4,7	-126,3 ±3,4	-92,3 ±3,4
4	-137,7 ±4,5	-148,3 ±4,7	-103,3 ±4,7	-190,3 ±4,7	-187,7 ±4,5	-139,3 ±4,7	-169,3 ±4,2	-131,3 ±4,2
5	-165,0 ±3,0	-207,7 ±3,2	-151,7 ±3,2	-236,7 ±3,2	-245,0 ±3,6	-203,3 ±3,1	-207,7 ±3,2	-184,7 ±3,2
6	-160,0 ±4,4	-207,7 ±4,5	-152,7 ±4,5	-239,7 ±4,5	-252,0 ±4,9	-214,7 ±4,2	-205,7 ±4,5	-183,7 ±4,5
7	-155,3 ±3,4	-210,0 ±3,6	-152,0 ±3,6	-236,0 ±3,6	-253,3 ±3,4	-230,3 ±3,1	-204,0 ±3,6	-182,0 ±3,6
8	-153,3 ±4,2	-207,0 ±4,4	-153,0 ±4,4	-235,0 ±4,4	-255,3 ±4,7	-229,3 ±4,7	-200,7 ±4,5	-179,7 ±4,5
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

In Tab. 3.25 sind die Steigungen der Einzelkurven zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit von der Konzentration des Triggerfaktors ConA aufgetragen. Bei 10500 Zellen/Messspot lag die durchschnittliche Steigung bei -1,05 % zu einem mittleren Zeitpunkt von 5603 Sekunden (1 Stunde 33 Minuten 23 Sekunden). Die minimale negative Steigung (-0,81 %) lag bei einer Triggerkonzentration von 50 ng/ml ConA, die maximale (-1,24 %) bei einer Konzentration von 25 ng/ml ConA.

Für die Zellkonzentration von 28000 Zellen/Messspot ergab sich eine mittlere Steigung von -2,83 % bei einem Durchschnittszeitpunkt von 7902 Sekunden (2 Stunden 11 Minuten 42 Sekunden). Die minimale negative Steigung betrug -1,98 % bei 5 ng/ml ConA, die maximale -3,74 % bei 10 ng/ml ConA.

Tab. 3.25: Zeitpunkt der maximalen negativen Steigung des PEC-Abbauprozesses durch Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl und der Konzentration des Triggerfaktors ConA.

Trigger	Zellzahl [Zellen/Messspot]	Konzentration Trigger [ng/ml]	Steigung	Bestimmtheitsmass [R ²]	Zeitpunkt [s]	Steigung [%]
ConA	10500	1	-0,0113	0,9896	5642	-1,13
		2,5	-0,0101	0,9917	5641	-1,01
		5	-0,0100	0,9879	5953	-1,00
		7,5	-0,0102	0,9940	5140	-1,02
		10	-0,0096	0,9935	5952	-0,96
		25	-0,0124	0,9913	5068	-1,24
		50	-0,0081	0,9916	5594	-0,81
	100	-0,0119	0,9925	5833	-1,19	
	28000	1	-0,0276	0,9959	6386	-2,76
		2,5	-0,0288	0,9992	7723	-2,88
		5	-0,0198	0,9953	8545	-1,98
		7,5	-0,0357	0,9927	7108	-3,57
		10	-0,0374	0,9906	8401	-3,74
		25	-0,0254	0,9965	8841	-2,54
50		-0,0271	0,9985	7820	-2,71	
100	-0,0249	0,9955	8391	-2,49		

Makrophagen getriggert mit LPS aus *Escherichia coli*

Die Abbildungen (Abb. 3.129 und Abb. 3.130) zeigen die interpolierten Abbaukurven des PEC durch Makrophagen unter dem Einfluss unterschiedlicher LPS- und Zellkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit.

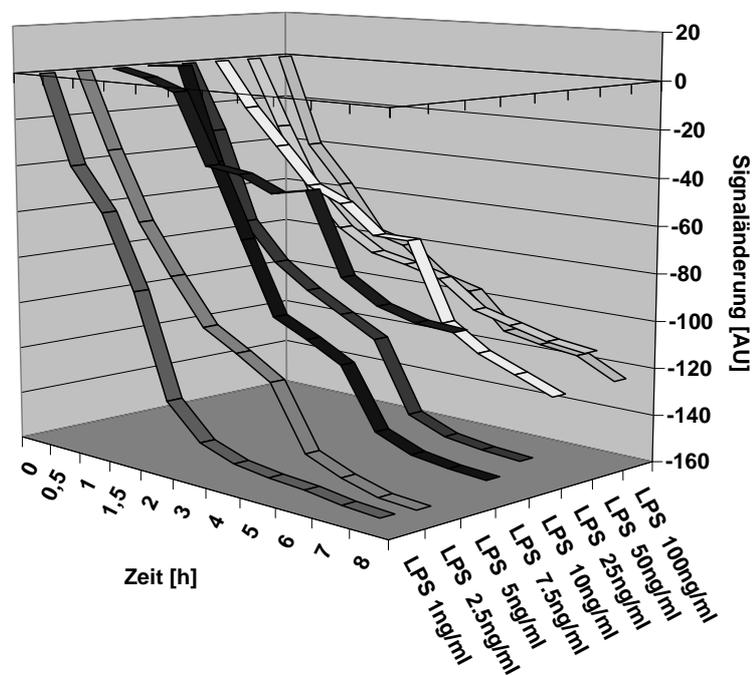


Abb. 3.129: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (10500 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener LPS (aus *Escherichia coli*) Konzentrationen.

Der maximale Polymerabbau lag bei $-154,7 \pm 3,5$ AU bei einer Zellkonzentration von 10500 Zellen/Messspot und einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml. Der minimale Abbau lag bei $-87,0 \pm 4,4$ AU bei 5 ng/ml LPS (Abb. 3.129).

Die Zellkonzentration 28000 Zellen/Messspot führte zu einem maximalen Abbau des PEC von $-311,3 \pm 4,2$ AU bei einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml. Der minimale Polymerabbau lag bei $-174,0 \pm 4,4$ AU bei 2,5 ng/ml LPS (Abb. 3.130).

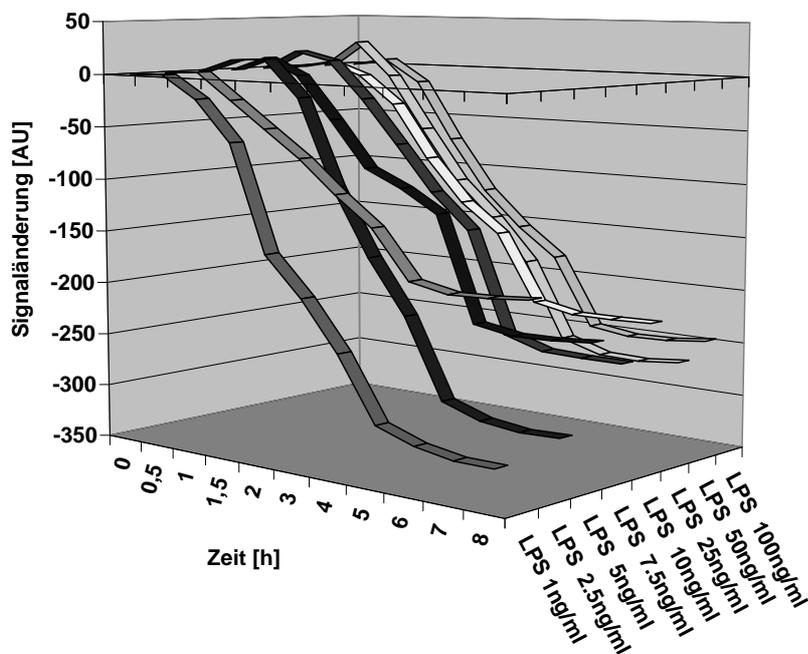


Abb. 3.130: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (28000 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener LPS (aus *Escherichia coli*) Konzentrationen.

Die Tab. 3.26 und Tab. 3.27 geben die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) für den Polymerabbau auf den Goldprismen in Abhängigkeit des LPS aus *Escherichia coli* wieder.

Tab. 3.26: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellzahl 10500 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors LPS aus *Escherichia coli*.

LPS [ng/ml]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
0,5	-39,3 \pm 2,8	-30,7 \pm 3,2	-2,3 \pm 0,6	1,7 \pm 0,6	-26,0 \pm 3,6	-18,0 \pm 2,0	-30,8 \pm 1,9	-38,0 \pm 3,0
1	-53,7 \pm 3,2	-59,7 \pm 2,5	-7,8 \pm 1,3	-38,2 \pm 2,0	-65,5 \pm 2,5	-34,3 \pm 1,5	-58,3 \pm 1,5	-55,0 \pm 2,6
1,5	-84,3 \pm 3,4	-80,0 \pm 3,6	-36,0 \pm 2,6	-69,0 \pm 3,6	-81,7 \pm 3,2	-52,7 \pm 3,1	-70,3 \pm 3,4	-78,2 \pm 3,4
2	-127,3 \pm 4,2	-99,0 \pm 4,4	-38,0 \pm 2,6	-101,3 \pm 3,8	-89,7 \pm 5,1	-54,3 \pm 4,7	-78,3 \pm 4,7	-78,7 \pm 2,5
3	-141,7 \pm 3,2	-107,3 \pm 3,4	-43,3 \pm 3,4	-107,3 \pm 3,4	-98,7 \pm 3,8	-70,3 \pm 2,5	-82,3 \pm 3,4	-90,3 \pm 3,4
4	-145,7 \pm 4,5	-115,3 \pm 4,7	-41,3 \pm 1,5	-114,3 \pm 4,7	-106,7 \pm 4,5	-66,3 \pm 4,7	-86,3 \pm 4,2	-94,3 \pm 4,2
5	-149,0 \pm 3,0	-142,7 \pm 3,2	-73,7 \pm 3,2	-140,7 \pm 3,2	-136,0 \pm 3,6	-103,3 \pm 2,5	-97,7 \pm 3,2	-109,7 \pm 3,2
6	-149,0 \pm 4,4	-147,7 \pm 4,5	-81,7 \pm 4,5	-145,7 \pm 4,5	-141,0 \pm 4,9	-113,0 \pm 2,0	-100,7 \pm 4,5	-111,7 \pm 4,5
7	-151,3 \pm 3,4	-152,0 \pm 3,6	-86,0 \pm 3,6	-148,0 \pm 3,6	-144,3 \pm 3,4	-119,7 \pm 3,1	-105,0 \pm 3,6	-114,0 \pm 3,6
8	-154,7 \pm 3,5	-153,0 \pm 4,4	-87,0 \pm 4,4	-149,0 \pm 4,4	-144,3 \pm 4,7	-122,7 \pm 2,5	-106,7 \pm 4,5	-121,7 \pm 4,5
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

Tab. 3.27: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellzahl 28000 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors LPS aus *Escherichia coli*.

LPS [ng/ml]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
0,5	1,2 ±0,3	3,0 ±1	14,3 ±3,2	14,7 ±2,1	21,0 ±3,6	6,7 ±1,2	24,2 ±1,9	6,8 ±1,0
1	-18,3 ±2,1	-20,7 ±3,2	17,3 ±4,5	-3,0 ±1,0	9,5 ±3,3	-5,0 ±1,0	-7,0 ±1,0	-14,3 ±2,1
1,5	-55,3 ±3,4	-45,0 ±3,6	-20,0 ±1,7	-41,0 ±3,6	-27,7 ±2,9	-31,3 ±1,5	-57,3 ±3,4	-71,5 ±1,5
2	-154,3 ±4,2	-70,0 ±4,4	-100,0 ±4,4	-96,3 ±8,0	-81,0 ±11,8	-80,3 ±4,7	-105,3 ±4,7	-121,7 ±1,5
3	-190,7 ±3,2	-100,3 ±3,4	-162,3 ±3,4	-101,3 ±3,4	-107,7 ±3,8	-118,0 ±8,7	-140,3 ±3,4	-153,3 ±3,4
4	-234,7 ±4,5	-126,3 ±4,7	-211,3 ±4,7	-121,3 ±4,7	-140,7 ±4,5	-147,3 ±4,7	-180,3 ±4,2	-180,3 ±4,2
5	-294,0 ±3,0	-171,7 ±3,2	-285,7 ±3,2	-220,7 ±3,2	-235,0 ±3,6	-208,0 ±7,0	-250,7 ±3,2	-244,7 ±3,2
6	-305,0 ±4,4	-177,7 ±4,5	-296,7 ±4,5	-225,7 ±4,5	-245,0 ±4,9	-216,0 ±5,3	-260,7 ±4,5	-248,7 ±4,5
7	-311,3 ±3,4	-177,0 ±3,6	-301,0 ±3,6	-225,0 ±3,6	-247,3 ±3,4	-221,7 ±4,7	-262,0 ±3,6	-248,0 ±3,6
8	-311,3 ±4,2	-174,0 ±4,4	-300,0 ±4,4	-222,0 ±4,4	-246,3 ±4,7	-215,3 ±4,7	-257,7 ±4,5	-243,7 ±4,5
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

In Tab. 3.28 sind die Steigungen der Einzelkurven zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit von der Konzentration des Triggerfaktors LPS aus *Escherichia coli* angegeben. Bei der Zellzahl 10500 Zellen/Messspot lag die durchschnittliche Steigung bei -2,21 % zu einem mittleren Zeitpunkt von 3459 Sekunden (57 Minuten 39 Sekunden). Die minimale negative Steigung (-0,66 %) lag bei einer Triggerkonzentration von 5 ng/ml LPS, die maximale (-3,81 %) bei einer Konzentration von 1 ng/ml LPS.

Für die Zellzahl 28000 Zellen/Messspot ergab sich eine mittlere Steigung von -2,94 % bei einem Durchschnittszeitpunkt von 6617 Sekunden (1 Stunde 50 Minuten 17 Sekunden). Die minimale negative Steigung betrug -1,47% bei 2,5 ng/ml LPS, die maximale -4,56 % bei 1 ng/ml LPS.

Tab. 3.28: Zeitpunkt der maximalen negativen Steigung des PEC-Abbauprozesses durch Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl und der Konzentration des Triggerfaktors LPS aus *Escherichia coli*.

Trigger	Zellzahl [Zellen/Messspot]	Konzentration Trigger [ng/ml]	Steigung	Bestimmtheitsmass [R ²]	Zeitpunkt [s]	Steigung [%]
LPS aus <i>Escherichia coli</i>	10500	1	-0,0381	0,7723	6650	-3,81
		2,5	-0,0195	0,9764	2100	-1,95
		5	-0,0066	0,7706	5998	-0,66
		7,5	-0,0216	0,9110	6467	-2,16
		10	-0,0209	0,9843	2281	-2,09
		25	-0,0204	0,9259	1190	-2,04
		50	-0,0224	0,9915	1672	-2,24
		100	-0,0270	0,9454	1318	-2,70
	28000	1	-0,0456	0,9878	5665	-4,56
		2,5	-0,0147	0,9972	6383	-1,47
		5	-0,0421	0,9915	7277	-4,21
		7,5	-0,0251	0,9974	5927	-2,51
		10	-0,0222	0,9947	8030	-2,22
		25	-0,0304	0,9969	6857	-3,04
50	-0,0288	0,9985	5775	-2,88		
100	-0,0259	0,9959	7025	-2,59		

Makrophagen getriggert mit LPS aus *Salmonella typhimurium*

Die Abbildungen (Abb. 3.131 und Abb. 3.132) zeigen die interpolierten Abbaukurven des PEC durch Makrophagen unter dem Einfluss unterschiedlicher LPS- und Zellkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit.

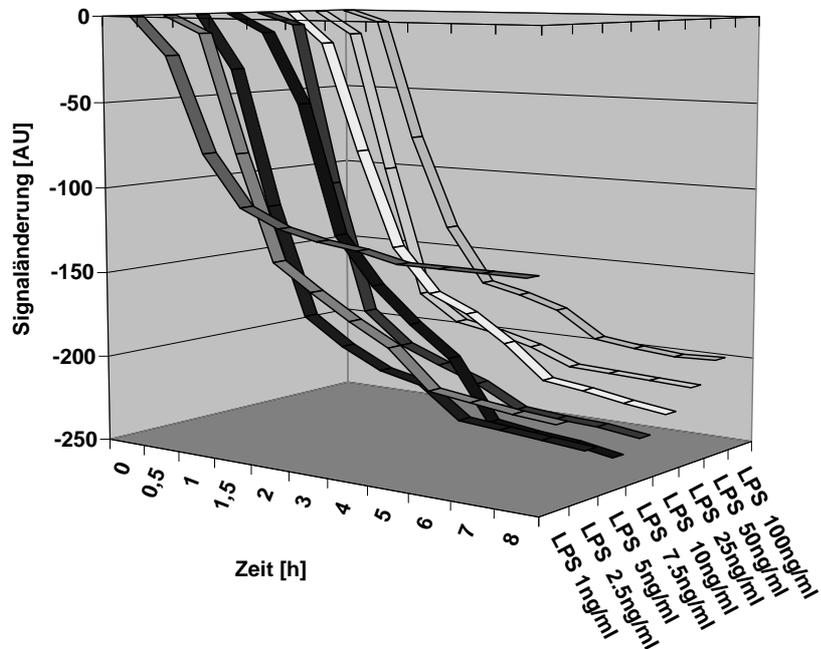


Abb. 3.131: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (10500 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener LPS (aus *Salmonella typhimurium*) Konzentrationen.

Der maximale Polymerabbau lag bei einer Zellkonzentration von 10500 Zellen/Messspot und einer LPS-Konzentration von 7,5 ng/ml bei $-235,0 \pm 4,4$ AU. Der minimale Abbau lag bei $-126,3 \pm 4,2$ AU bei 1 ng/ml LPS (Abb. 3.131).

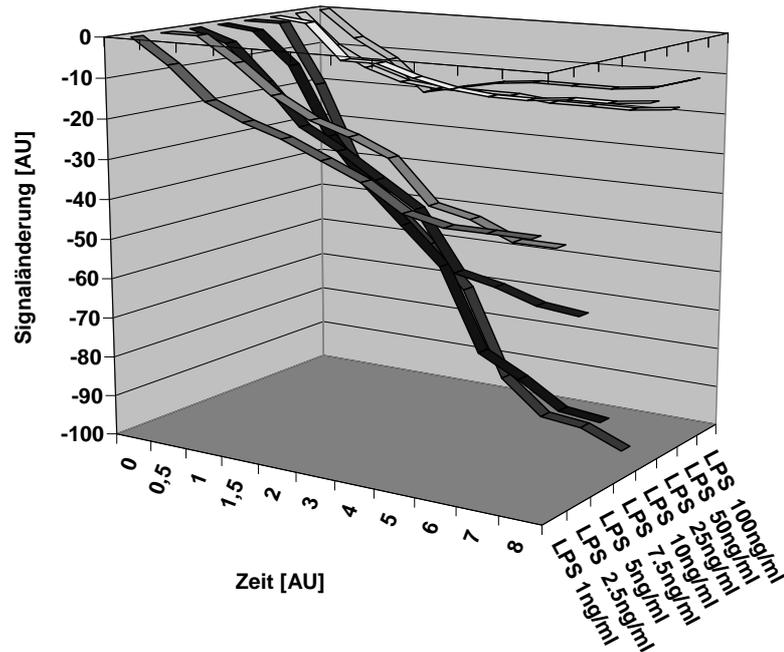


Abb. 3.132: Interpolierte Darstellung des PEC-Abbaus (28000 Zellen/Messspot) unter Einfluss verschiedener LPS (aus *Salmonella typhimurium*) Konzentrationen.

Die Zellkonzentration 28000 Zellen/Messspot führte zu einem maximalen Abbau des PEC von $-93,3 \pm 4,7$ AU bei einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml. Der minimale Polymerabbau lag bei $-9,3 \pm 1,5$ AU bei 100 ng/ml LPS (Abb. 3.132).

Die Tab. 3.29 und Tab. 3.30 geben die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) für den Polymerabbau auf den Goldprismen in Abhängigkeit des Triggerfaktors LPS aus *Salmonella typhimurium* wieder.

Tab. 3.29: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellzahl 10500 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors LPS aus *Salmonella typhimurium*.

LPS [ng/ml]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
Zeit [h]								
0,5	-23,3 \pm 2,8	-7,7 \pm 3,2	-29,7 \pm 3,2	-8,7 \pm 3,2	-5,3 \pm 1,5	-17,0 \pm 2,0	-12,0 \pm 3,0	-6,0 \pm 1,3
1	-78,7 \pm 3,8	-76,0 \pm 4,4	-108,7 \pm 4,5	-50,3 \pm 3,4	-99,7 \pm 3,8	-83,0 \pm 2,0	-95,0 \pm 4,4	-77,0 \pm 4,4
1,5	-103,3 \pm 3,4	-137,0 \pm 3,6	-172,7 \pm 3,2	-127,0 \pm 3,6	-176,0 \pm 3,6	-140,3 \pm 3,1	-172,3 \pm 3,4	-132,7 \pm 4,5
2	-113,3 \pm 4,2	-152,0 \pm 4,4	-187,0 \pm 4,4	-155,0 \pm 4,4	-193,3 \pm 4,7	-165,3 \pm 4,7	-186,3 \pm 4,7	-165,0 \pm 5,3
3	-118,7 \pm 3,2	-166,3 \pm 3,4	-198,3 \pm 3,4	-175,3 \pm 3,4	-202,7 \pm 3,8	-176,0 \pm 3,6	-191,3 \pm 3,4	-171,3 \pm 3,4
4	-120,7 \pm 4,5	-177,3 \pm 4,7	-202,3 \pm 4,7	-191,3 \pm 4,7	-210,7 \pm 4,5	-190,3 \pm 4,7	-197,3 \pm 4,2	-178,3 \pm 4,2
5	-127,0 \pm 3,0	-199,7 \pm 3,2	-220,7 \pm 3,2	-226,7 \pm 3,2	-223,0 \pm 3,6	-208,0 \pm 7,0	-206,7 \pm 3,2	-193,7 \pm 3,2
6	-126,0 \pm 4,4	-201,7 \pm 4,5	-221,7 \pm 4,5	-228,7 \pm 4,5	-224,0 \pm 4,9	-213,3 \pm 3,1	-206,7 \pm 4,5	-195,7 \pm 4,5
7	-126,3 \pm 3,4	-205,0 \pm 3,6	-224,0 \pm 3,6	-231,0 \pm 3,6	-226,3 \pm 3,4	-221,7 \pm 4,7	-208,0 \pm 3,6	-198,0 \pm 3,6
8	-126,3 \pm 4,2	-207,0 \pm 4,4	-226,0 \pm 4,4	-235,0 \pm 4,4	-228,3 \pm 4,7	-219,3 \pm 4,7	-208,7 \pm 4,5	-196,7 \pm 4,5
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

Tab. 3.30: Mittelwerte des PEC-Abbaus [AU] für die Zellzahl 28000 Zellen/Messspot in Abhängigkeit des Triggerfaktors LPS aus *Salmonella typhimurium*.

LPS [ng/ml]	1	2,5	5	7,5	10	25	50	100
Zeit [h]								
0,5	-7,3 ±2,8	0,7 ±0,6	-2,7 ±0,6	-1,3 ±0,6	1,7 ±1,5	-1,3 ±0,6	-6,0 ±3,0	-6,0 ±1,3
1	-15,7 ±3,8	-5,0 ±1,0	-10,5 ±1,5	-7,2 ±2,0	-11,7 ±3,8	-8,0 ±2,0	-11,0 ±2,6	-9,0 ±4,4
1,5	-15,3 ±3,4	-10,0 ±3,6	-19,7 ±3,2	-23,0 ±3,6	-32,0 ±3,6	-7,3 ±3,1	-13,3 ±3,4	-16,7 ±4,5
2	-18,3 ±4,2	-15,0 ±4,4	-24,0 ±4,4	-34,0 ±4,4	-40,3 ±4,7	-9,3 ±4,7	-13,3 ±4,7	-14,0 ±5,3
3	-22,7 ±3,2	-18,3 ±3,4	-30,3 ±3,4	-43,3 ±3,4	-49,7 ±3,8	-12,0 ±3,6	-14,3 ±3,4	-13,3 ±3,4
4	-25,7 ±4,5	-21,3 ±4,7	-35,3 ±4,7	-51,3 ±4,7	-59,7 ±4,5	-12,3 ±4,7	-14,3 ±4,2	-12,3 ±4,2
5	-33,0 ±3,0	-32,7 ±3,2	-50,7 ±3,2	-72,7 ±3,2	-81,0 ±3,6	-14,0 ±2,0	-15,7 ±3,2	-12,7 ±3,2
6	-34,0 ±4,4	-34,3 ±3,4	-51,7 ±4,5	-76,7 ±4,5	-88,0 ±4,9	-12,7 ±2,5	-14,7 ±4,5	-12,7 ±2,8
7	-34,3 ±3,4	-38,0 ±3,6	-55,0 ±3,6	-83,0 ±3,6	-90,3 ±3,4	-13,0 ±2,0	-15,0 ±3,6	-11,0 ±3,6
8	-34,3 ±4,2	-38,0 ±4,4	-56,0 ±4,4	-84,0 ±4,4	-93,3 ±4,7	-12,0 ±2,0	-13,7 ±4,5	-9,3 ±1,5
Kontrolle	Diese zeigte keinen Abbau des PEC.							

In Tab. 3.31 sind die Steigungen der Einzelkurven zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit von der Konzentration des Triggerfaktors LPS aus *Salmonella typhimurium* angegeben. Bei der Zellzahl 10500 Zellen/Messspot lag die durchschnittliche Steigung bei -4,36 % zu einem mittleren Zeitpunkt von 3264 Sekunden (54 Minuten 24 Sekunden). Die minimale negative Steigung (-3,04 %) lag bei einer Triggerkonzentration von 1 ng/ml LPS, die maximale (-7,62 %) bei einer Konzentration von 7,5 ng/ml LPS.

Für die Zellzahl 28000 Zellen/Messspot ergab sich eine mittlere Steigung von -0,53 % bei einem Durchschnittszeitpunkt von 3826 Sekunden (1 Stunde 3 Minuten 46 Sekunden). Die minimale negative Steigung betrug -0,17 % bei 100 ng/ml LPS, die maximale -1,32 % bei 10ng/ml LPS.

Tab. 3.31: Zeitpunkt der maximalen negativen Steigung des PEC-Abbauprozesses durch Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl und der Konzentration des Triggerfaktors LPS aus *Salmonella typhimurium*.

Trigger	Zellzahl [Zellen/Messspot]	Konzentration Trigger [ng/ml]	Steigung	Bestimmtheitsmass [R ²]	Zeitpunkt [s]	Steigung [%]
LPS aus <i>Salmonella typhimurium</i>	10500	1	-0,0304	0,9936	3284	-3,04
		2,5	-0,0379	0,9959	3841	-3,79
		5	-0,0390	0,9950	3490	-3,90
		7,5	-0,0762	0,9666	2435	-7,62
		10	-0,0521	0,9962	3045	-5,21
		25	-0,0357	0,9988	3205	-3,57
		50	-0,0424	0,9945	3237	-4,24
	28000	100	-0,0353	0,9890	3573	-3,53
		1	-0,0046	0,9906	2842	-0,46
		2,5	-0,0035	0,9572	4351	-0,35
		5	-0,0054	0,9617	2686	-0,54
		7,5	-0,0057	0,9899	8008	-0,57
		10	-0,0132	0,9775	3535	-1,32
		25	-0,0056	0,9791	2798	-0,56
50	-0,0024	0,9783	3092	-0,24		
100	-0,0017	0,8993	3300	-0,17		

3.5 Bakterienmembran-Modellsystem auf Basis von Liposomen

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit biologischen Membranen bieten Liposomen vielseitige Einsatzmöglichkeiten als Modellsysteme zur Untersuchung von Membranprozessen. Ein Bakterienmembranmodell auf Basis von Liposomen, welches die äußere Membran Gram negativer Bakterien simuliert, wurde etabliert. Dabei wurde das LPS aus *Legionella pneumophila* bzw. *Salmonella typhimurium* in die Bilayer der Liposomen inkorporiert und mittels SPR durch den spezifischen Antikörper detektiert.

Ein Modellsystem in Form von „künstlichen Bakterien“ auf Basis von Liposomen (Abb. 3.133) bietet folgende Vorteile: Es muss nicht mit lebenden Bakterien gearbeitet werden. Die Gefahr der Kontamination mit dem Endotoxin ist für den Experimentator geringer. Der wichtigste Vorteil, um ein solches System zu etablieren, ist die Tatsache, dass der Fokus nur auf einen ganz speziellen Bereich der Bakterienoberfläche gelegt wird. In diesem Fall handelt es sich um die Lipopolysaccharide aus *Legionella pneumophila* und *Salmonella typhimurium*.

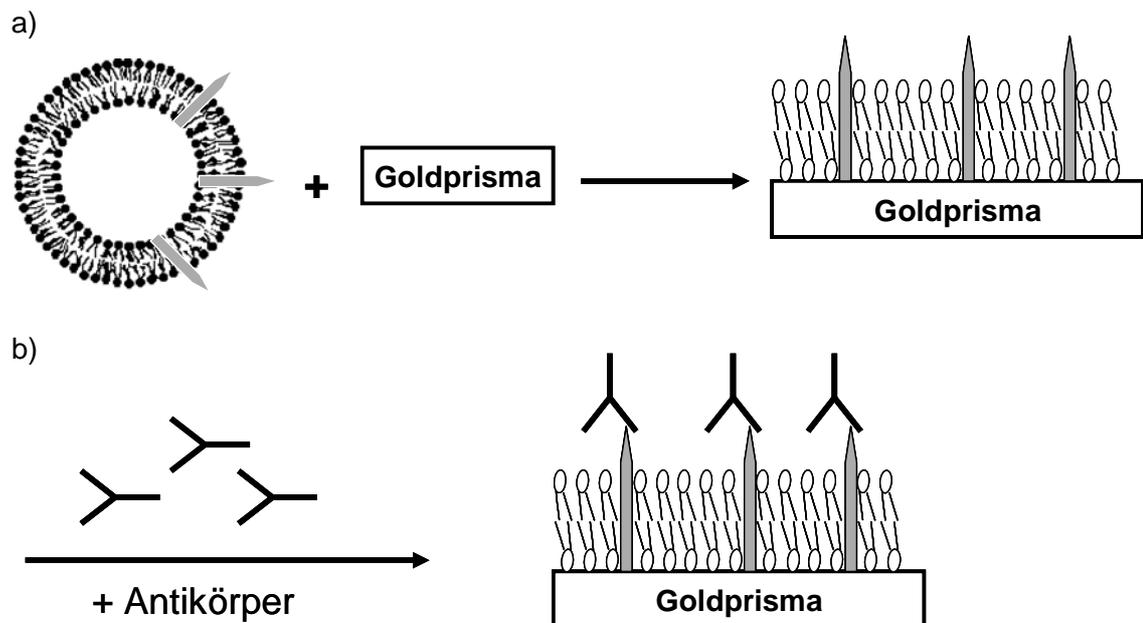


Abb. 3.133: Schematischer Ablauf des Assays mit „künstlichen Bakterien“: Die mit LPS modifizierten Liposomen werden auf einem C_{18} -alkylierten Goldträger immobilisiert (a), zur Detektion dient ein LPS-spezifischer Antikörper (b).

3.5.1 Liposomenformulierung

Um feststellen zu können, ob die Ladung der Liposomen Einfluss auf die Inkorporation des LPS sowie auf die Ergebnisse des Assays hat, wurden verschieden geladene Liposomenformulierungen getestet.

Tab. 3.32: Molares Verhältnis der unterschiedlichen Liposomenformulierungen.

	neutrale Liposomen	kationische Liposomen	anionische Liposomen
DMPC	8	7	6
DMPG	--	--	2
Cholesterol	2	2	2
Stearylamin	--	1	--

In Tab. 3.32 sind die molaren Verhältnisse der eingesetzten Komponenten für die Liposomenformulierungen aufgeführt. Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) ist für die fluiden Eigenschaften (Phasenübergangstemperatur 23 °C) der Liposomen verantwortlich, wohingegen das Cholesterol den Vesikeln eine gewisse Stabilität und Form gibt. Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) ist für die negative Ladung verantwortlich und hat eine Phasenübergangstemperatur von 30 °C. Die Verwendung von DMPG führt zu rigideren Liposomen. Stearylamin (SA) sorgt in der Mischung für die positive Ladung der entstehenden Liposomen.

Für die Modifizierung der Liposomen wurde eine LPS (aus *Legionella pneumophila*) Konzentration von $4,0 \times 10^5$ Partikel /ml eingesetzt.

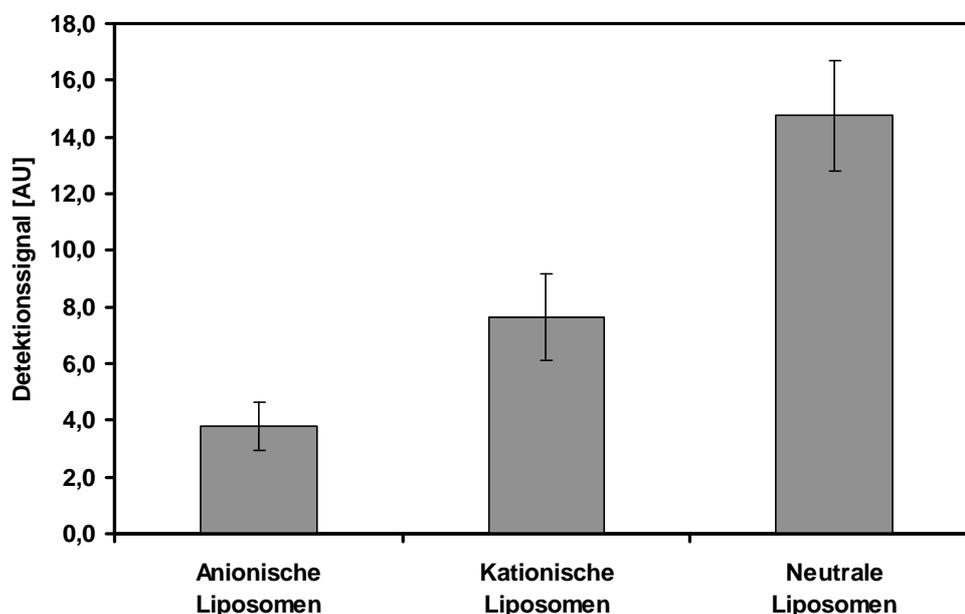


Abb. 3.134: Detektionssignal des Anti-Legionella-Antikörpers nach Interaktion mit „künstlichen Legionellen“ unterschiedlicher Ladung.

Die Signalzuwächse der Dreifachbestimmung für den Anti-Legionella-Antikörper betragen: $3,8 \pm 0,9$ AU (anionische Liposomen), $7,7 \pm 1,5$ AU (kationische Liposomen) und $14,8 \pm 2,0$ AU (neutrale Liposomen) (Abb. 3.134).

Bei den Versuchsreihen mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen zeigten sich die besten Ergebnisse mit neutralen Liposomen. Betrachtet man dazu den Aufbau des LPS wird diese Tatsache durch die lipophile Eigenschaft des Lipid A-Teils (vgl. Abb. 1.17) erklärt. Dadurch ist die Inkorporation des LPS in die Liposomenmembran neutraler Liposomen besser als in geladene.

3.5.1.1 ζ -Potential und Vesikelgröße

Die Größenverteilung der neutralen Liposomen für die „künstlichen Bakterien“ wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Tab. 3.33 gibt den Mittelwert (Z-Average) der Verteilung, den durchschnittlichen Polydispersitätsgrad und das ζ -Potential wieder. Die Messungen wurden je dreimal durchgeführt.

Tab. 3.33: Größe, ζ -Potential und Polydispersitätsindex (PI) der neutralen Liposomen.

Lipidzusammensetzung (molare Verhältnisse)	Größe		ζ -Potential
	Z-Average [nm]	PI	[mV]
DMPC/Cholesterol 8:2	162,9 ± 0,9	0,413 ± 0,04	-1,2 ± 0,44

3.5.2 „Künstliche Bakterien“

3.5.2.1 Membranmodell für *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila, der Erreger der Legionärskrankheit, ist ein Umweltkeim, der in der Lage ist, sich intrazellulär in Protozoen sowie in humanen Monozyten und Makrophagen zu vermehren. Das natürliche Vorkommen der Legionellen ist vornehmlich der aquatische Bereich fließender und stehender Oberflächengewässer. Die Keime sind äußerst widerstandsfähig. Chlorkonzentrationen, wie sie in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzt werden, sind für Legionellen tolerierbar. Unter günstigen Bedingungen vermehren und verbreiten sich die Keime über Wasserverteilungssysteme. Die Übertragung erfolgt durch tiefe Inhalation mit Keimen kontaminierter Aerosole aus Klimaanlage oder Luftbefeuchtern. Weitere Infektionsquellen können Vernebler, Beatmungsgeräte und –schläuche oder Magensonden sein, die mit verkeimtem Wasser betrieben oder gereinigt werden. Die Vermehrung der Legionellen zu unterbinden beruht im Wesentlichen auf Prävention, was zum Beispiel durch Anheben der Wassertemperatur auf über 60 °C erfolgen kann, praktisch aber nicht immer möglich ist. Eine Weitergabe des Keims von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht beobachtet [Ruef und Francioli, 1997; Berthelot et al., 1998].

Die mit LPS modifizierten neutralen Liposomen wurden auf ein C₁₈-alkyliertes Goldprisma gegeben. Anschließend wurden eventuell vorhandene unspezifische Bindungsstellen mit BSA (c=200 µg/ml in PBS-Puffer) passiviert und der *Legionella pneumophila* spezifische Detektionsantikörper (c=150 µg/ml in PBS-Puffer) zugegeben.

Optimierung der LPS-Konzentration

Als Antigen wurde das *Legionella pneumophila* Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Die LPS-Stammlösung ($c=1,0 \times 10^8$ Partikel/ml) wurde in geeigneter Weise mit PBS-Puffer auf die entsprechenden LPS-Konzentrationen verdünnt.

Das Sensorgramm in Abb. 3.135 gibt den Assay für die „künstlichen Legionellen“ wieder. Der erste Schritt war die Zugabe der mit LPS modifizierten Liposomen. Nach dem Passivieren des Messspots wurde im zweiten Schritt der Anti-*Legionella*-Antikörper zugegeben. Zum Schluss erfolgten Spülschritte, um nicht spezifisch gebundene Stoffe zu entfernen. Im Vergleich zum Kontrollversuch (Liposomen ohne inkorporiertes LPS) erfolgte eine spezifische Bindung zwischen dem Anti-*Legionella*-Antikörper und den „künstlichen Legionellen“.

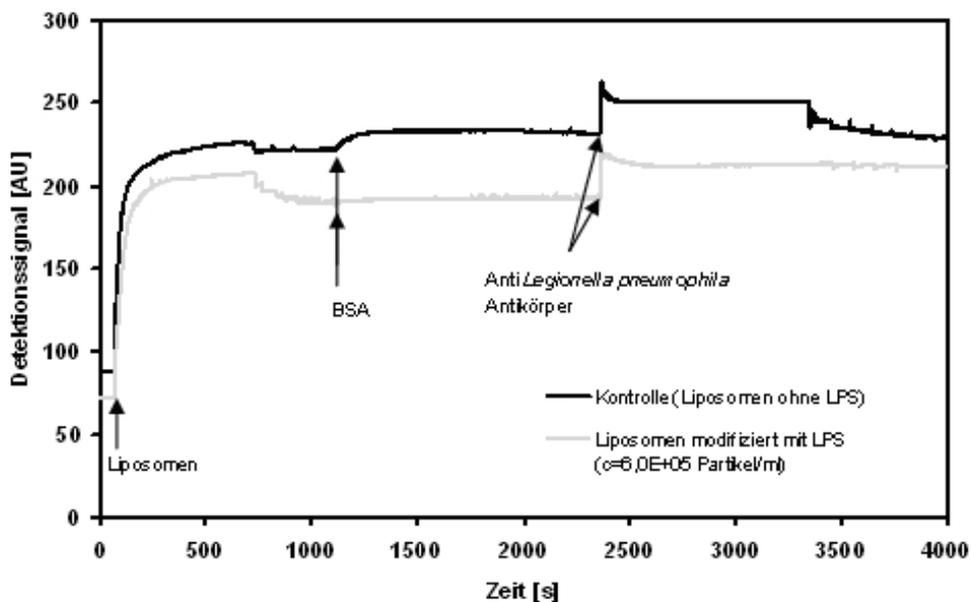


Abb. 3.135: Das Sensorgramm zeigt die Kurvenverläufe des Legionellen-Assays für die LPS-Konzentration $6,0 \times 10^5$ Partikel/ml und des Kontrollversuchs.

Empirisch wurde die Konzentration an LPS ermittelt, die zur Inkorporation in die Liposomenmembran verwendet werden sollte. Dazu wurden vier verschiedene LPS-Lösungen eingesetzt. Die resultierenden Messsignale der Dreifachbestimmung sind in Abb. 3.136 dargestellt.

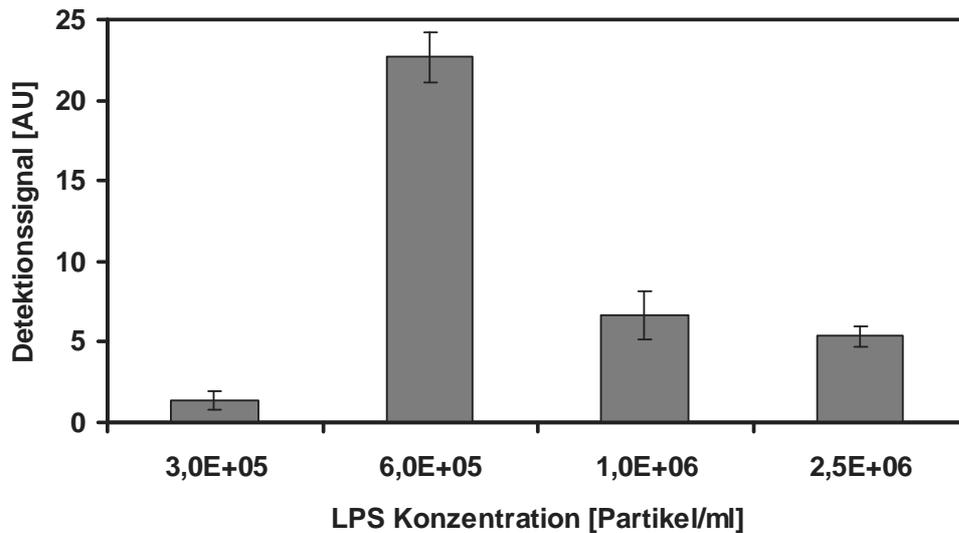


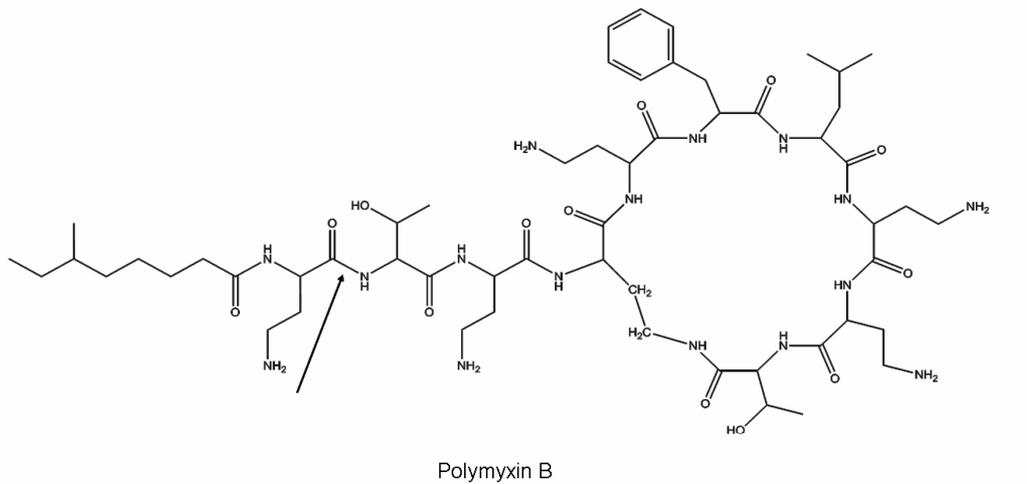
Abb. 3.136: Detektionssignal nach Zugabe des Anti-Legionella-Antikörpers zu den mit LPS modifizierten Liposomen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die LPS-Konzentrationen, die zur Inkorporation in die Liposomen verwendet wurden.

Eine Partikelkonzentration von $6,0 \times 10^5$ Partikel/ml führte zum besten Ergebnis von $22,7 \pm 1,5$ AU. Die weiteren Partikelkonzentrationen führten zu folgenden Detektionswerten: $6,7 \pm 1,5$ AU für $1,0 \times 10^6$ Partikel/ml, $5,3 \pm 0,6$ AU für $2,5 \times 10^6$ Partikel/ml und $1,3 \pm 0,6$ AU für $3,0 \times 10^5$ Partikel/ml.

Verwendung von Polymyxinen

Polymyxin B (PMB) ist ein natürlich vorkommendes Deka-peptid isoliert von *Bacillus polymyxa* [Ainsworth et al., 1947; Benedict und Langlykke, 1947]. PMB hat ein hohes bakterizides Potential gegenüber Gram negativen Bakterien und einen großen Einfluss auf die Permeabilität der Außenmembran der Bakterienhülle [Danner et al., 1989]. Diese Eigenschaften liegen in der hohen Affinität gegenüber Lipid A begründet [Moore et al., 1986].

Polymyxin B-Nonapeptid (PMBN) ist ein cyclisches Peptid, welches ein Derivat des Polymyxin B darstellt, das durch proteolytisches Abspalten des endständigen Aminoacylrestes entsteht (Abb. 3.137) [Chihara et al., 1973]. Die Eigenschaft, dass PMBN mit einer sehr hohen Affinität an Bakterien bindet und die Permeabilität der Außenmembran erhöht, wird oft als sensitizing activity bezeichnet [Duwe et al., 1986; Vaara und Vaara, 1983; Ofek et al., 1994]. Polymyxin B-Nonapeptid bindet genauso stark an LPS wie PMB.



enzymatische Umsetzung

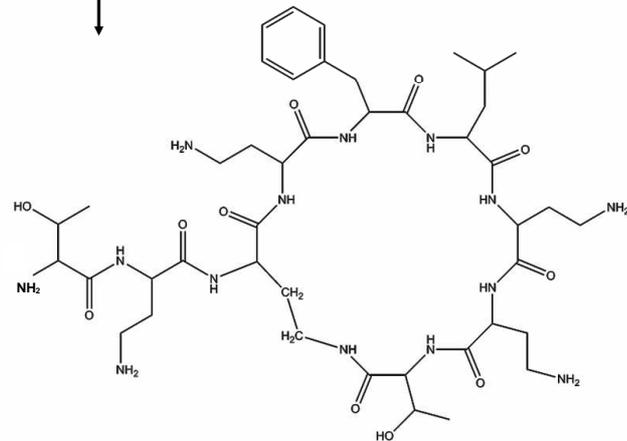


Abb. 3.137: Enzymatische Umwandlung von Polymyxin B in Polymyxin B-Nonapeptid.

Nach der Bestimmung der optimalen LPS-Konzentration wurde versucht, das Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers durch ein Konjugat aus PMB/LPS bzw. PMBN/LPS weiter zu verbessern. Hierzu wurde eine Lösung aus LPS und PMB bzw. PMBN im Verhältnis von 1:5 (V/V) angesetzt. Diese wurde dann zu gleichen Volumenteilen mit neutraler Liposomenformulierung versetzt. Die Mischung wurde bei 50 °C 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt.

Die LPS/PMB- und LPS/PMBN-Komplexe wurden über eine Sepharose CL-4B Säule gegeben und mittels Größenausschlusschromatographie von überschüssigem Polymyxin B und Polymyxin B-Nonapeptid getrennt. Somit war gewährleistet, dass zur Modifizierung der Liposomen nur der reine LPS/PMB- bzw. LPS/PMBN-Komplex eingesetzt wurde.

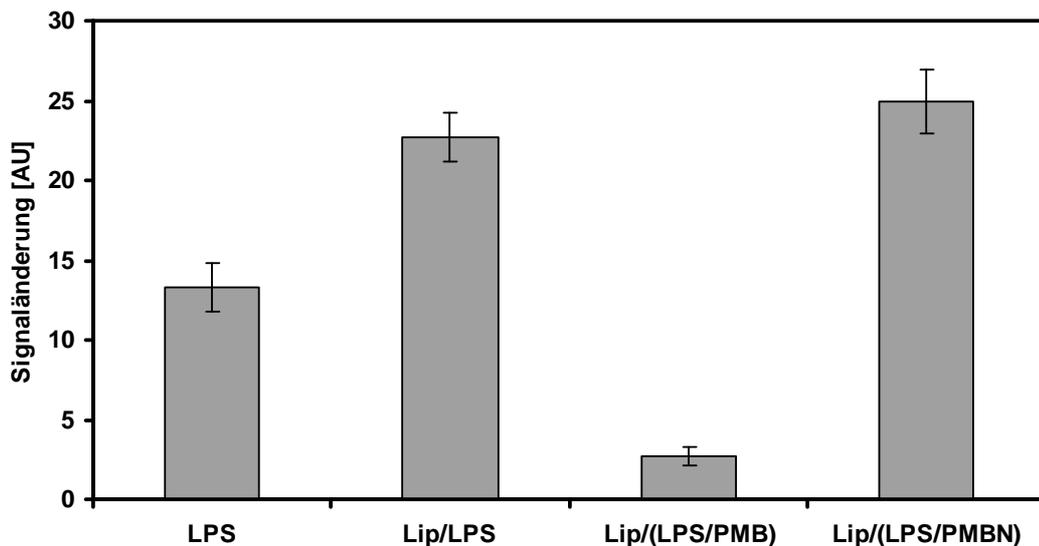


Abb. 3.138: Signaländerung des Anti-*Legionella*-Antikörpers. Die Konzentration des LPS zur Modifizierung der Liposomen lag in allen Messreihen bei $6,0 \times 10^5$ Partikel/ml. (LPS = Lipopolysaccharid (aus *Legionella pneumophila*), Lip/LPS = Liposomen modifiziert mit LPS (aus *Legionella*), Lip/(LPS/PMB) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus *Legionella*) und Polymyxin B, Lip/(LPS/PMBN) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus *Legionella*) und Polymyxin B-Nonapeptid).

Das Balkendiagramm (Abb. 3.138) zeigt die durchschnittlichen Signaländerungen der Dreifachmessungen nach Zugabe des Anti-*Legionella*-Antikörpers. Wurden die Liposomen mit LPS aus *Legionella pneumophila* modifiziert, ergab sich ein durchschnittlicher Wert für die Antikörperbindung von $22,7 \pm 1,5$ AU. Bei den Liposomen mit inkorporiertem LPS/PMB-Komplex lag das Signal bei $2,7 \pm 0,6$ AU. Die Modifizierung der Liposomen mit dem Komplex aus LPS und PMBN führte zu einem Messsignal von $25,0 \pm 2,0$ AU. Als Vergleich ist reines LPS aufgeführt, welches ohne Inkorporation in Liposomen auf dem C₁₈-beschichteten Goldträger immobilisiert wurde. Bei der Detektion durch den spezifischen *Legionella pneumophila* Antikörper lag die Bindung bei $13,3 \pm 1,5$ AU.

AFM Aufnahmen

Die Oberflächenbeschaffenheit eines „künstlichen Bakteriums“ ist in Abb. 3.139 dargestellt. Die Ausmaße des LPS modifizierten Liposoms betragen für den Durchmesser 60 nm und für die Höhe 7 nm.

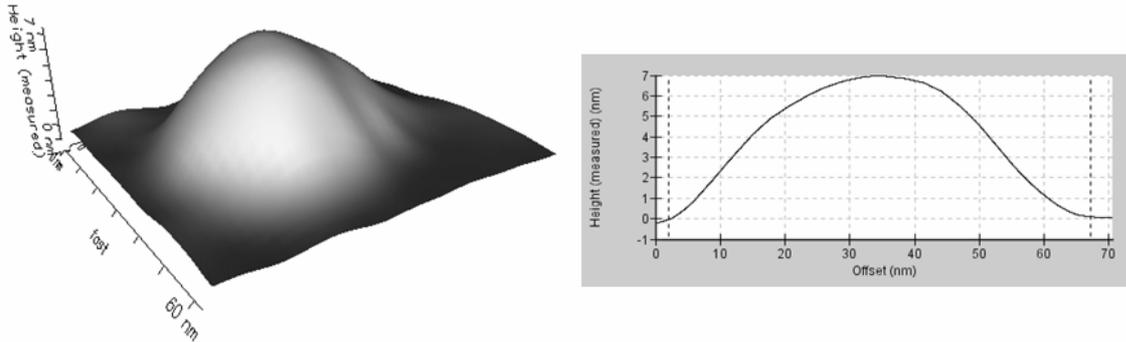


Abb. 3.139: Höhenprofil nach der AFM Messung eines LPS (aus Legionella) modifizierten Liposoms ohne Interaktion mit dem spezifischen Antikörper.

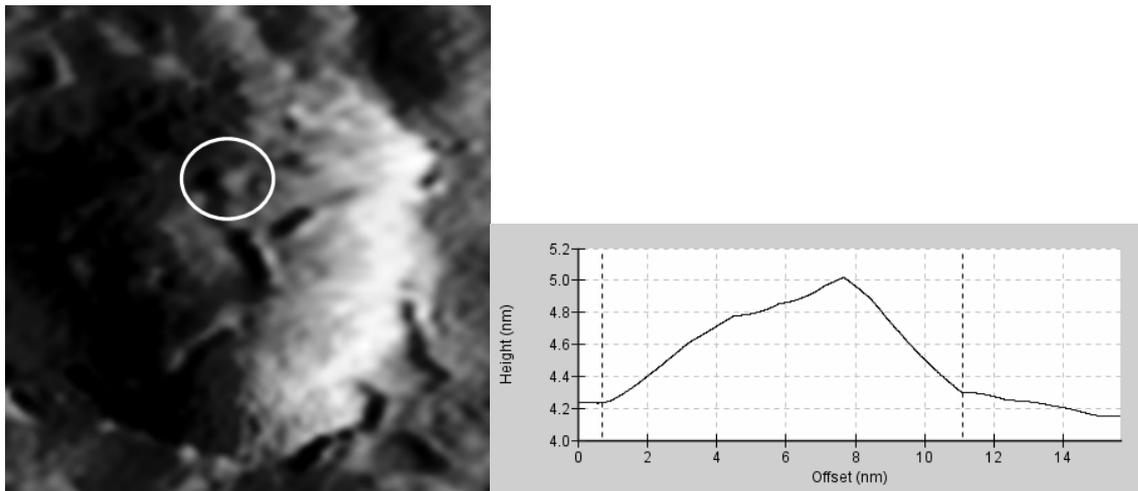


Abb. 3.140: AFM Aufnahme eines LPS (aus Legionella) modifizierten Liposoms nach Interaktion mit einem spezifischen Antikörper. Die Messung erfolgte auf einem Wafer als Träger.

Das AFM Bild (Abb. 3.140) zeigt ein mit LPS modifiziertes Liposom nach Interaktion mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper. Von der gekennzeichneten Fläche (siehe Kreis in Abb. 3.140) wurde ein Höhenprofil erstellt (Diagramm rechts). Die maximale Erhebung beträgt 0,8 nm, was der Höhe eines Antikörpers entspricht. Auf der Oberfläche des Liposoms sieht man Agglomerationen von Antikörper/Antigen-Komplexen in einer länglichen (Stäbchen) Form.

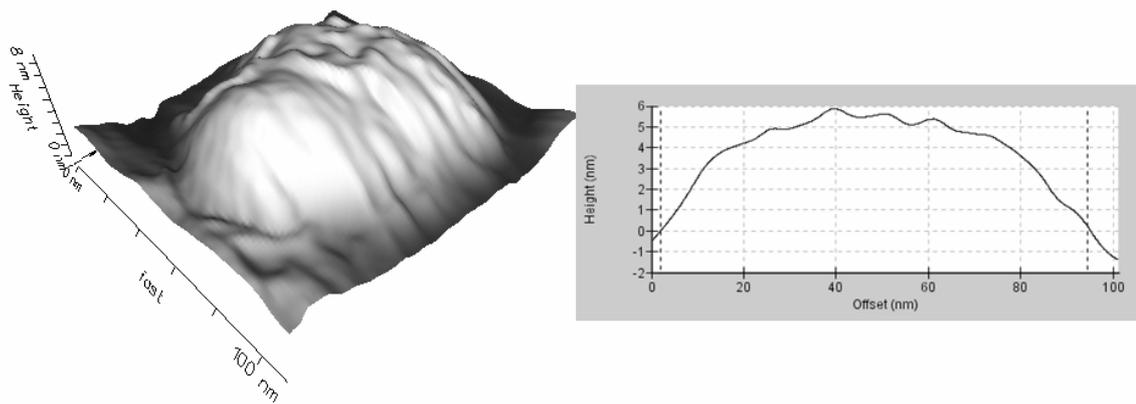


Abb. 3.141: Höhenprofil des LPS modifizierten Liposoms nach Interaktion mit dem spezifischen Antikörper.

Das Höhenprofil des LPS modifizierten Liposoms nach Reaktion mit spezifischen Antikörpern aus Abb. 3.140 ist in Abb. 3.141 dargestellt. Sehr gut erkennbar ist die wellige Oberfläche. Durchmesser und Höhe betragen 95 bzw. 6 nm. In der Cross Section (rechts) ist die Oberflächentopographie quantifiziert. Diese beträgt ungefähr 1 nm.

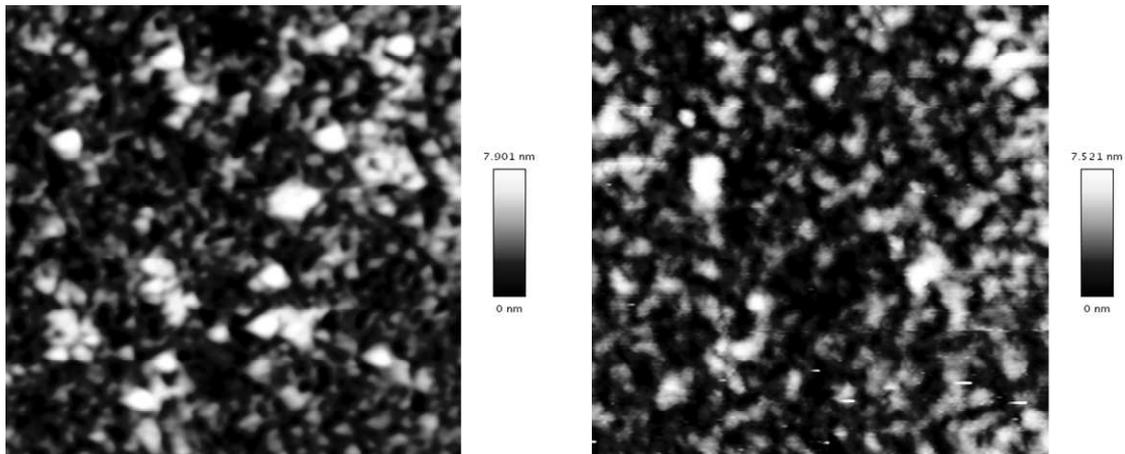


Abb. 3.142: AFM Aufnahmen von LPS (aus *Legionella pneumophila*) modifizierten Liposomen nach der Interaktion mit dem Anti-*Legionella*-Antikörper auf einem Goldträger (links) und der reinen Goldoberfläche des SPR-Chips (rechts).

AFM – Aufnahmen konnten nicht zufriedenstellend auf der Goldoberfläche durchgeführt werden, da diese von Natur aus schon eine zu große Rauigkeit aufweist. Die maximalen Höhenunterschiede betragen nach einem Versuch mit Liposomen 7,901 nm und auf unbehandeltem Gold (ohne Liposomen) 7,521 nm (Abb. 3.142). Aufnahmen bezüglich der Antigen/Antikörper - Komplexe auf der Liposomenoberfläche waren auf den SPR-Goldprismen daher nicht möglich.

Zusammenfassung der Messreihe mit „künstlichen Legionellen“

Zusammengefasst waren die Versuchsreihen mit den „künstlichen Legionellen“ nicht zufriedenstellend. Die Verwendung von Polymyxin B brachte nicht die gewünschte Verbesserung des Detektionssignals. Die Modifizierung der Liposomen mit einem Komplex aus LPS und Polymyxin B-Nonapeptid führte lediglich zu einer Erhöhung des Detektionssignals von 2,3 AU im Vergleich zu LPS modifizierten Liposomen (Abb. 3.138).

Daraufhin wurde versucht das Modell der künstlichen Bakterien unter Verwendung des LPS aus *Salmonella typhimurim* zu etablieren.

3.5.2.2 Membranmodell für *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium ist ein Gram negatives Bakterium und gehört zu den Enteritidis Salmonellen. Diese rufen beim Menschen schwere Durchfallerkrankungen hervor. Der Ansteckungsprozess verläuft über das Konsumieren von kontaminierten Speisen [Crilly et al., 2001]. Eine Ausbreitungsquelle ist der Weg über unpasteurisierte Milch bzw. rohe Milch [Cody et al., 1999]. Pasteurisieren zerstört die Gram negativen Bakterien und reduziert dadurch maßgeblich das Risiko für die menschliche Gesundheit. Die Pathogenese der Salmonellosis ist bei Mensch und Tier gleich. Der Beginn ist die Darmbesiedlung mit *Salmonella*, gefolgt von der Penetration und Passage durch das Darmlumen in das Epithel des Dünndarms. Die entstehende Entzündung wird begleitet von der Enterotoxinfreisetzung in den Enterozyten [Patterson und Isaacson, 2003]. Typische klinische Zeichen einer Infektion mit *Salmonella* sind: Fieber, schwerwiegende Durchfälle mit anschließender Entstehung einer Dehydratisierung [D'Aoust, 1997]. Ist der Schaden im Hinblick auf die Abdichtung der Enterozyten zu groß, können Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und systemische Infektionen hervorrufen.

Der *Salmonella*-Assay wurde analog zum *Legionella*-Assay durchgeführt. Die mit LPS modifizierten neutralen Liposomen wurden auf ein C₁₈-alkyliertes Goldprisma gegeben. Anschließend wurden eventuell vorhandene unspezifische Bindungsstellen mit BSA (c=200 µg/ml in PBS-Puffer) passiviert und der *Salmonella typhimurium* spezifische Detektionsantikörper (c=150 µg/ml in PBS-Puffer) zugegeben.

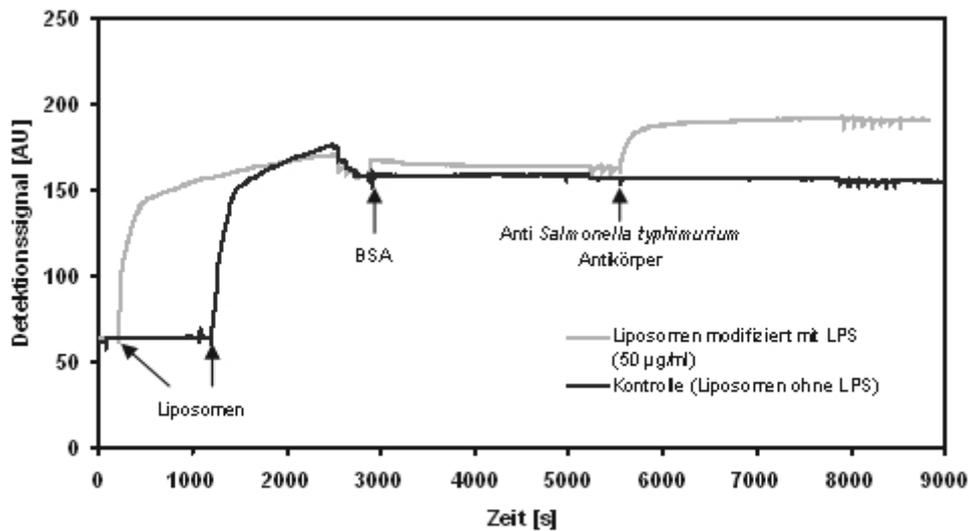


Abb. 3.143: Sensorgramm des Salmonellen-Assays und des Kontrollversuchs. Zur Modifizierung der Liposomen wurde eine LPS-Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

Das Sensorgramm in Abb. 3.143 gibt den Assay für die „künstlichen Salmonellen“ wieder. Der erste Schritt ist die Zugabe der mit LPS modifizierten Liposomen. Nach der Passivierung der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA ($c=200\ \mu\text{g/ml}$ in PBS-Puffer) konnte eine Anlagerung des Detektionsantikörpers festgestellt werden, die einer Signaländerung von 26,2 AU entsprach. Im Kontrollversuch wurde keine Anlagerung des Detektionsantikörpers festgestellt

Verwendung von Polymyxin B-Nonapeptid

Da in den Versuchsreihen mit den „künstlichen Legionellen“ Polymyxin B keine Verbesserung des Messsignals ergab, wurde in dem Modellsystem für die „künstlichen Salmonellen“ direkt mit Polymyxin B-Nonapeptid (30 mM in PBS-Puffer) gearbeitet. Das LPS wurde mit dem PMBN in einem Verhältnis von 1:5 (V/V) eingesetzt.

Der LPS/PMBN-Komplex wurde über eine Sepharose CL-4B Säule gegeben und mittels Größenausschlusschromatographie von überschüssigem Polymyxin B-Nonapeptid getrennt. Somit war gewährleistet, dass zur Modifizierung der Liposomen nur der reine LPS/PMBN-Komplex eingesetzt wurde.

Das Balkendiagramm (Abb. 3.144) gibt das Messsignal der Bindung des spezifischen Anti-*Salmonella*-Antikörpers wieder. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Wurden die Liposomen mit LPS aus *Salmonella typhimurium* modifiziert, ergab sich ein durchschnittlicher Wert für die Antikörperbindung von $10,0 \pm 1$ AU. Bei den Liposomen mit inkorporiertem LPS/PMBN-Komplex lag das Signal bei $77,3 \pm 7,5$ AU. Als Vergleich ist reines LPS aufgeführt, welches ohne Inkorporation in Liposomen auf dem

C₁₈-alkylierten Goldträger immobilisiert wurde. Bei der Detektion durch den spezifischen *Salmonella* Antikörper lag die Bindung bei $26,3 \pm 1,2$ AU.

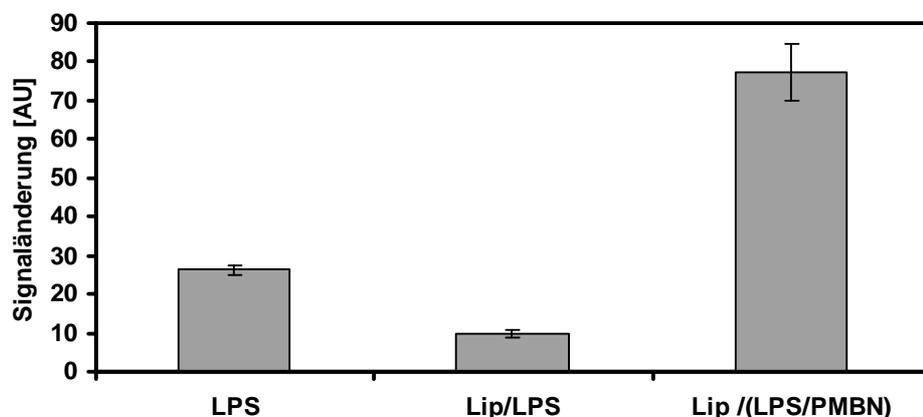


Abb. 3.144: Signaländerung des Anti-*Salmonella*-Antikörpers. Die Konzentration des LPS zur Modifizierung der Liposomen lag in allen Messreihen bei $200 \mu\text{g/ml}$. (LPS = Lipopolysaccharid (aus *Salmonella typhimurium*), Lip/LPS = Liposomen modifiziert mit LPS (aus *Salmonella*), Lip/(LPS/PMBN) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus *Salmonella*) und Polymyxin B-Nonapeptid).

Nachweis- und Bestimmungsgrenze des *Salmonella*-Assays

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Modifizierung der Liposomen mit dem LPS/PMBN-Komplex die besten Ergebnisse lieferte, sollten nun die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt werden.

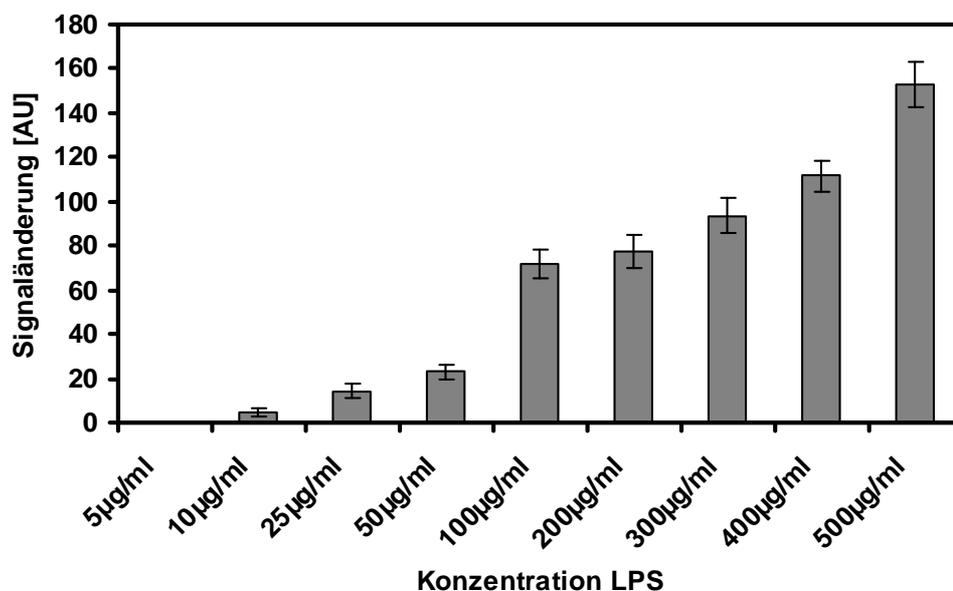


Abb. 3.145: Abhängigkeit des Messsignals des Anti-*Salmonella*-Antikörpers von der LPS-Konzentration, die im LPS/PMBN-Komplex zur Modifizierung der Liposomen eingesetzt wurde.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des LPS wurde eine Konzentrationsreihe mit LPS/PMBN modifizierten Liposomen in einem Bereich von 5 bis 500 µg/ml LPS dreimal vermessen (Abb. 3.145).

Hierbei ist zu beachten, dass die verwendete LPS-Konzentration nicht der tatsächlichen Konzentration in der Liposomenmembran entspricht. Für die zur Modifizierung eingesetzten 200 µg/ml LPS wurden mittels LAL-Test und LPS-Quantifizierungsmethode (HPLC-MS) $19,3 \pm 1,6$ µg/ml und $30,9 \pm 1,9$ µg/ml LPS in der Liposomenmembran wiedergefunden (vgl. Kapitel 3.5.2.3).

Folgende Signalzuwächse wurden nach der Interaktion des LPS mit dem Anti-*Salmonella*-Antikörper gemessen: 5 µg/ml 0 AU, 10 µg/ml $4,7 \pm 1,5$ AU, 25 µg/ml $14,3 \pm 3,5$ AU, 50 µg/ml $23,0 \pm 3,0$, 100 µg/ml $71,7 \pm 6,5$ AU, 200 µg/ml $77,3 \pm 7,5$ AU, 300 µg/ml $93,7 \pm 7,8$ AU, 400 µg/ml $111,7 \pm 7,0$ AU, 500 µg/ml $153,0 \pm 10,1$ AU.

Das Detektionssignal für die LPS-Konzentration 10 µg/ml unterschied sich deutlich von der „Basislinie“, d.h. dem Signalwert vor der Antikörperzugabe. Das Signal betrug bei dieser LPS-Konzentration das 11,75 fache des Grundrauschens (0,4 AU). Damit war die Bedingung, dass die Bestimmungsgrenze im zehnfachen Bereich des Grundrauschens liegt, erfüllt. Kein Detektionssignal des Anti-*Salmonella*-Antikörpers konnte bei einer LPS-Konzentration von 5 µg/ml festgestellt werden. Die Nachweisgrenze (der dreifache Wert des Grundrauschens) muss somit bei einer LPS-Konzentration zwischen 5 und 10 µg/ml liegen.

Zusammenfassung der *Salmonella typhimurium* Versuche

Die Versuchsreihe mit den „künstlichen Salmonellen“ ergab gute Ergebnisse. Es ist gelungen, eine Bakterienmembran mit dem LPS aus *Salmonella typhimurium* als Antigen nachzuahmen, um Interaktionen mit dem spezifischen Antikörper zu untersuchen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze konnten für das *Salmonella* LPS ermittelt werden.

3.5.2.3 Quantifizierung des Lipopolysaccharids (LPS)

LAL-Test

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) beruht darauf, dass Bakterien-Endotoxine mit den Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebsses (*Limulus polyphemus*) unter Koagulation bzw. Gelbildung reagieren. Die Vorteile liegen vor allem in der schnellen Durchführbarkeit und der hohen Empfindlichkeit. Ein Nachteil des Tests ist die Störanfälligkeit gegenüber anderen Substanzen.

Quantifizierung von LPS mittels LAL-Test

Zur Reduktion von Störparametern wurde eine Untersuchungsmethode entwickelt, die sich an den klassischen LAL-Test anlehnt. Der wesentliche Unterschied liegt im Gebrauch eines Chromophors, welches bei Anwesenheit von Endotoxinen zu einem farbigen Produkt abgespalten wird. Dabei wird die Probe mit LAL-Lysat inkubiert,

welches ein Proenzym enthält, das zum aktiven Enzym gespalten wird. Dieses ist in der Lage, von einem nitroanierten Substrat den p-Nitroanilin-Rest (pNA) abzuspalten. Die Freisetzung des p-Nitroanilins kann photometrisch bei 405 - 410 nm im Mikrotiterplatten Reader quantifiziert werden.

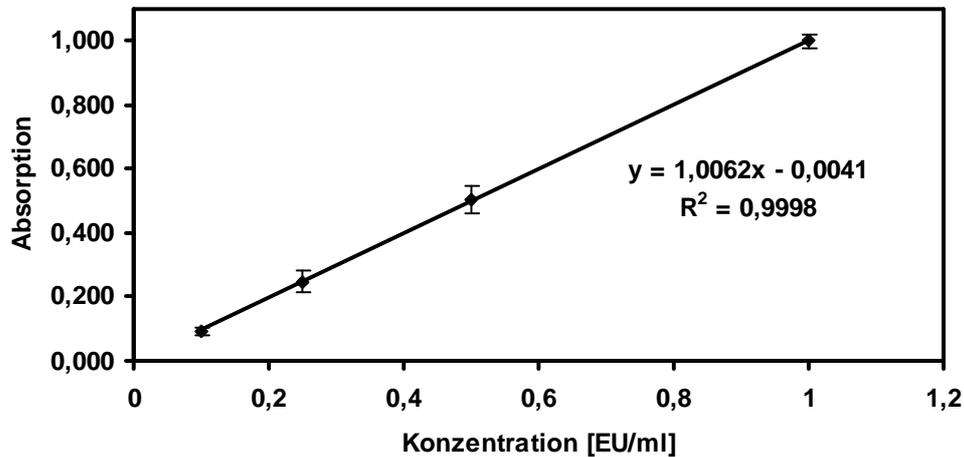


Abb. 3.146: Kalibriergerade des QCL-1000 LAL-Tests.

Zur Quantifizierung des LPS wurde der QCL-1000 Chromogenic LAL-Test der Firma Cambrex eingesetzt. Es wurde eine Kalibriergerade (Abb. 3.146) mit dem zertifizierten Endotoxin des QCL-1000 Tests erstellt. Dazu diente ein Endotoxin-Lyophilisat von *E. coli* (Bakterienstamm O111:B4), das mit 1,0 ml LAL-Reagenzwasser zu einer Stammlösung von 32 EU/ml gelöst wurde.

Als Proben dienten mit LPS aus *Salmonella typhimurium* modifizierte neutrale Liposomen. Die Probenvorbereitung wurde folgendermaßen durchgeführt: 1 ml LPS/PMBN-Lösung von *Salmonella typhimurium* ($c_{LPS}=400 \mu\text{g/ml}$) wurden mit 1 ml Liposomen gemischt und für 5 min bei 50 °C im Ultraschallbad behandelt. Mit Hilfe der FPLC wurde überschüssiges LPS/PMBN durch eine Sepharose CL-4B Säule von den modifizierten Liposomen abgetrennt. Von der 2 ml Liposomenfraktion wurden 10 μl mit PBS-Puffer auf 2 ml verdünnt. Anschließend wurden 50 μl dieser Verdünnung mit einer 20 % Tween 20 Lösung zu 5 ml aufgefüllt und durchmischt. 5 μl dieser Lösung wurden mit PBS-Puffer auf 50 μl aufgefüllt, in die entsprechende Kavität der Mikrotiterplatte gegeben und mit 50 μl des LAL-Reagenzes gemischt. Die Lösung wurde bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Der nächste Schritt war die Zugabe von 100 μl Substratlösung mit anschließendem Mischen. Nach weiteren 6 Minuten Inkubation wurde die Farbreaktion mit 100 μl des Stopp-Reagenzes beendet. Der durchschnittliche Absorptionswert der Dreifachmessung lag bei $0,965 \pm 0,08$. Dies entsprach einer Konzentration von $0,963 \pm 0,08$ EU/ml. Unter Einbeziehung des Verhältnisses von 10 EU = 1 ng LPS und der Verdünnungsschritte bei der Probenvorbereitung ergab sich eine LPS-Konzentration von $19,3 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$.

In Bezug auf die eingesetzte Konzentration von 200 µg/ml LPS zur Liposomenmodifizierung entsprach dies einer LPS-Inkorporation von 9,7 %.

Quantifizierung von LPS mittels HPLC-MS

Die Quantifizierung des LPS beruht auf der Bestimmung der 3-Hydroxymyristinsäure, die durch alkalische Hydrolyse aus dem Lipid-A Teil abgespalten wurde. Zur Quantifizierung wurden die mit LPS aus *Salmonella typhimurium* modifizierten neutralen Liposomen eingesetzt. Die HPLC-MS-Proben wurden wie in Kapitel 2.2.7.5 beschrieben vorbereitet.

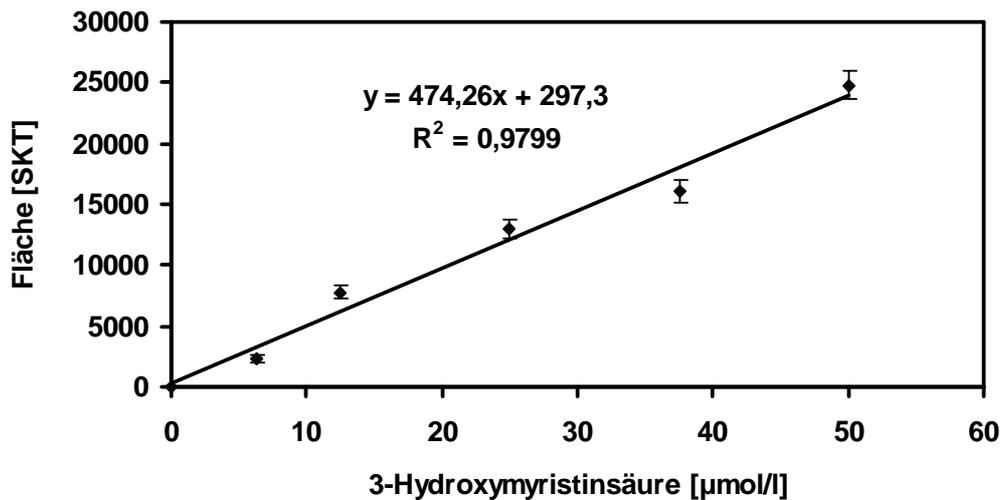


Abb. 3.147: Kalibriergerade für 3-Hydroxymyristinsäure.

Die Abb. 3.147 zeigt die Kalibriergerade für 3-Hydroxymyristinsäure. Für die mit LPS aus *Salmonella typhimurium* modifizierten Liposomen ergab sich aus der Dreifachmessung eine Fläche von 6080 ± 371 SKT. Dies entsprach einer Stoffmengenkonzentration von $12,2 \pm 0,8$ µmol/l 3-Hydroxymyristinsäure. 1 Mol des LPS aus *Salmonella typhimurium* enthält 4 Mol 3-Hydroxymyristinsäure [Tran et al., 2005], so dass nach Umrechnung die LPS-Konzentration bei $30,9 \pm 1,9$ µg/ml lag. In Bezug auf die eingesetzte Konzentration von 200 µg/ml LPS lag eine LPS-Inkorporation in den Liposomenmembranen von 15,5 % vor.

Es wurde sowohl die alkalische als auch die saure Hydrolyse mit Inkubationszeiten von 2, 4, 6 und 24 Stunden durchgeführt. Zufriedenstellende Ergebnisse lieferte nur die alkalische Hydrolyse von 6 Stunden.

Den Vergleich zwischen saurer und alkalischer Hydrolyse zeigen Abb. 3.148 und Abb. 3.149. Bei der alkalischen Hydrolyse kann ein eindeutiger Peak im Einzelionenstrom des Q1 bei m/z 243 für 3-Hydroxymyristinsäure im Chromatogramm erkannt werden. Dies ist bei der sauren Hydrolyse nicht der Fall. Die Chromatogramme bei allen durchgeführten Inkubationszeiten der sauren Hydrolyse waren nicht auswertbar.

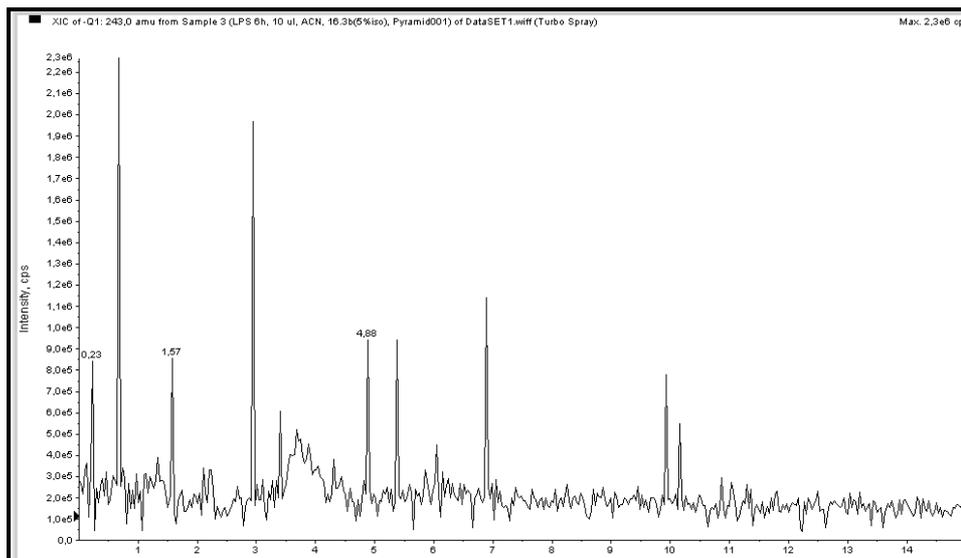


Abb. 3.148: Chromatogramm des Einzelionenstroms des Q1 bei m/z 243 von LPS aus *Salmonella typhimurium* nach 6 h saurer Hydrolyse. Es ist kein Peak für 3-Hydroxymyristinsäure erkennbar.

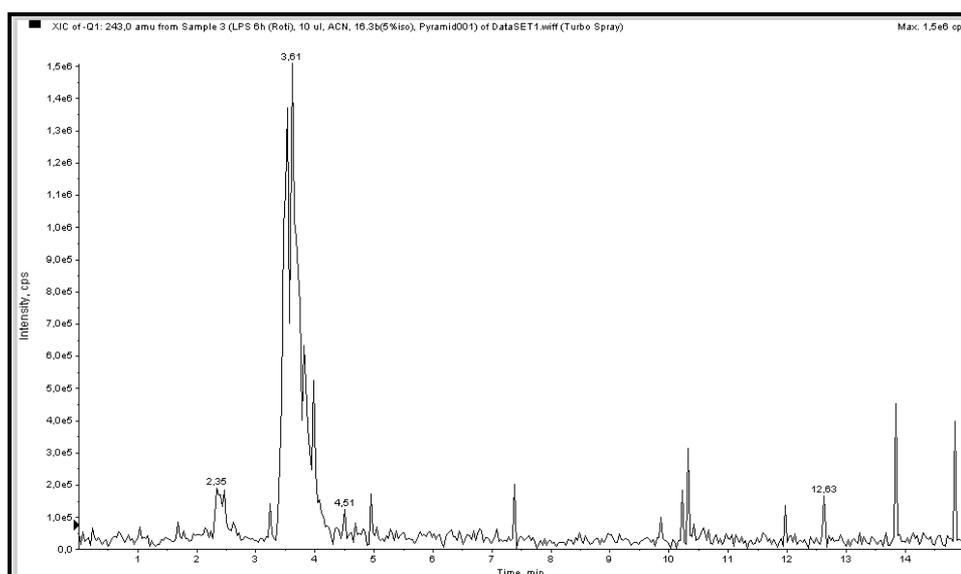


Abb. 3.149: Chromatogramm des Einzelionenstroms des Q1 bei m/z 243 von LPS aus *Salmonella typhimurium* nach 6 h alkalischer Hydrolyse. Für 3-Hydroxymyristinsäure ist ein eindeutiger Peak zu erkennen.

Zusammenfassung der Quantifizierung von LPS

Die Quantifizierung des inkorporierten LPS aus *Salmonella typhimurium* in Liposomenmembranen war mit dem QCL-1000 Chromogenic LAL-Test möglich. Über die Entwicklung einer entsprechenden HPLC-MS-Methode konnte ebenfalls das in den Membranen inkorporierte LPS der Liposomen bestimmt werden. Die Ergebnisse der beiden Methoden weichen jedoch relativ stark voneinander ab.

3.6 „Magnetic Beads“ kombiniert mit LAPS

Zielsetzung war eine mögliche lokale Adressierung muriner Makrophagen der Zelllinie J774A.1 durch LPS modifizierte Magnetic Beads als Stimulus. Der lokale Stimulus der Makrophagen erfolgte durch die Präsenz der präparierten Magnetic Beads auf den verschiedenen Messspots. Die so aktivierten Makrophagen führten zu einer Erniedrigung des pH-Wertes der Messlösung, der gemessen wurde. Unter Zuhilfenahme eines Permanentmagneten konnte ein Konzentrationsgradient der mit LPS-gekoppelten Magnetic Beads in der Messlösung erzeugt werden (Abb. 3.150).

Die Untersuchungen wurden in enger Zusammenarbeit mit Torsten Wagner von der Fachhochschule Aachen, Standort Jülich, durchgeführt. Teile dieses Experiments wurden in Wagner et al. (2008_{a,b}) publiziert.

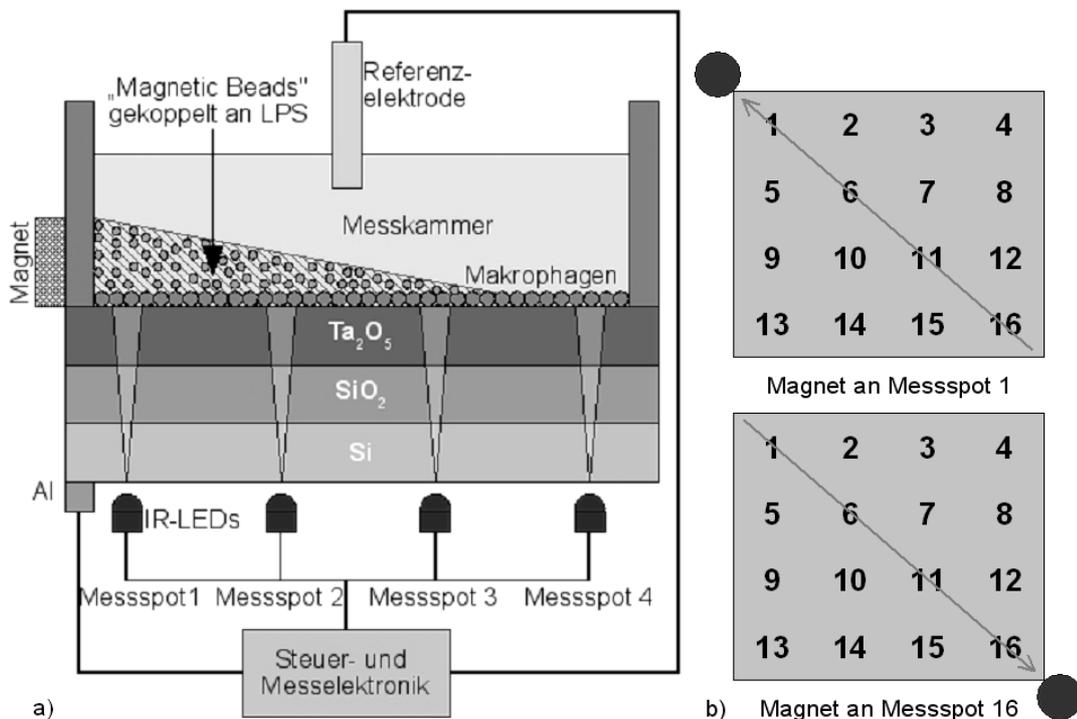


Abb. 3.150: a) Schematischer Versuchsaufbau für die Bestimmung der Ansäuerungsrate von Makrophagen (J774A.1) mit einem künstlich erzeugten Konzentrationsgradienten eines Triggers (LPS) in der Messlösung. Der Gradient wird mittels eines magnetischen Feldes und „Magnetic Beads“ erzeugt. b) Illustration der Position des Permanentmagneten während der Messreihe [Wagner, 2008].

Die paramagnetischen Fe_3O_4 -Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $0,86 \mu\text{m}$ wurden in folgender Weise behandelt (Abb. 3.151):

- Beschichtung der Fe_3O_4 -Partikel mit Streptavidin.
- Biotinylierung von Anti-*Salmonella*-Antikörpern.
- Reaktion des Antikörpers mit dem LPS aus *Salmonella typhimurium*.
- Kopplung des biotinylierten Antikörper-Antigen-Komplexes an die mit Streptavidin beschichteten „Magnetic Beads“.

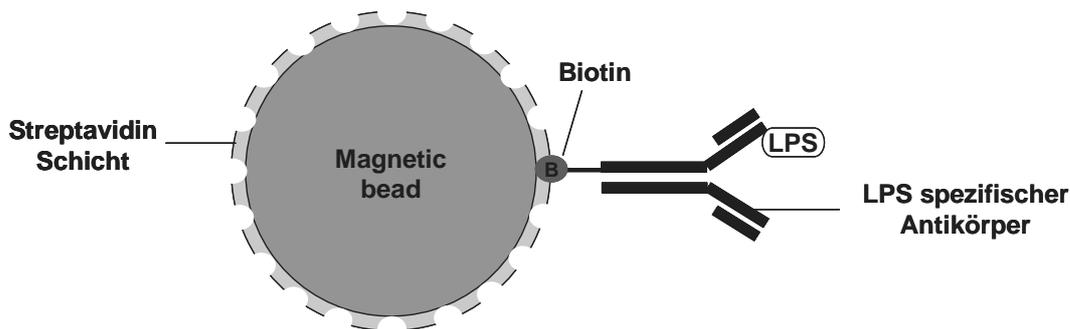


Abb. 3.151: Schematische Darstellung des Magnetic Bead-Antikörper-LPS-Komplexes.

Nach Reinigung und Desinfektion der Messkammer wurden die Makrophagen direkt auf der Ta_2O_5 -LAPS Struktur kultiviert. Zur Kultivierung und zu den Messungen kamen entsprechend zwei verschiedene Kulturmedien zum Einsatz. Diese waren, bis auf den fehlenden Carbonatpuffer für das Messmedium, identisch und bestanden aus:

- 90 % DMEM
- 10 % FKS

Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 Stunde wurde die Messzelle auf das LAPS-System aufgesetzt und mit der Messung begonnen. Die Messspots wurden kurz nach dem Zuführen des frischen Messmediums und unmittelbar vor dem Wechseln des Messmediums mittels I/V-Kurven vermessen. Zusätzlich wurden am Anfang die präparierten „Magnetic Beads“ mit einer Konzentration von $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ hinzugefügt. Der Permanentmagnet (NdFeB N40) wurde unterhalb von Messspot 1 am IR-LED-Array befestigt.

Abb. 3.152 a) zeigt exemplarisch die Verschiebung der Biasspannung über den Messzyklen für Messspot 1 und Messspot 16. Das Messmedium wurde eingefüllt, anschließend wurden unmittelbar die 16 I/V-Kurven zu Beginn der Ansäuerung und abermals nach 5 min ausgelesen. Danach wurde die Messlösung erneut gewechselt. Dieser Zyklus wurde zehnmal wiederholt. In Abb. 3.152 b) sind die einzelnen Steigungen zwischen der „frischen“ und der „angesäuerten“ I/V-Kurven als Ansäuerungsrate in $\mu\text{V s}^{-1}$ exemplarisch für Messspot 1 und Messspot 16 aufgetragen.

Ab dem fünften Messzyklus wurde die Position des Permanentmagnets von Messspot 1 an Messspot 16 gewechselt.

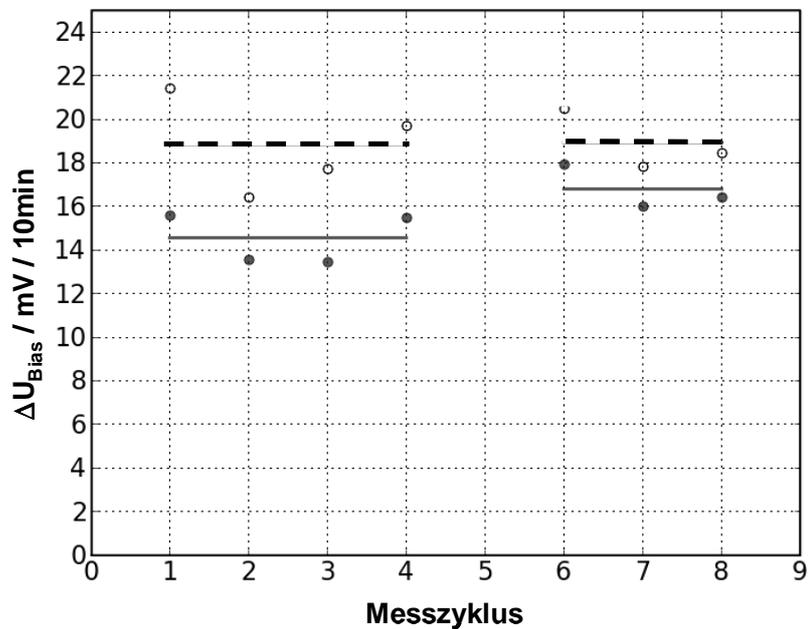
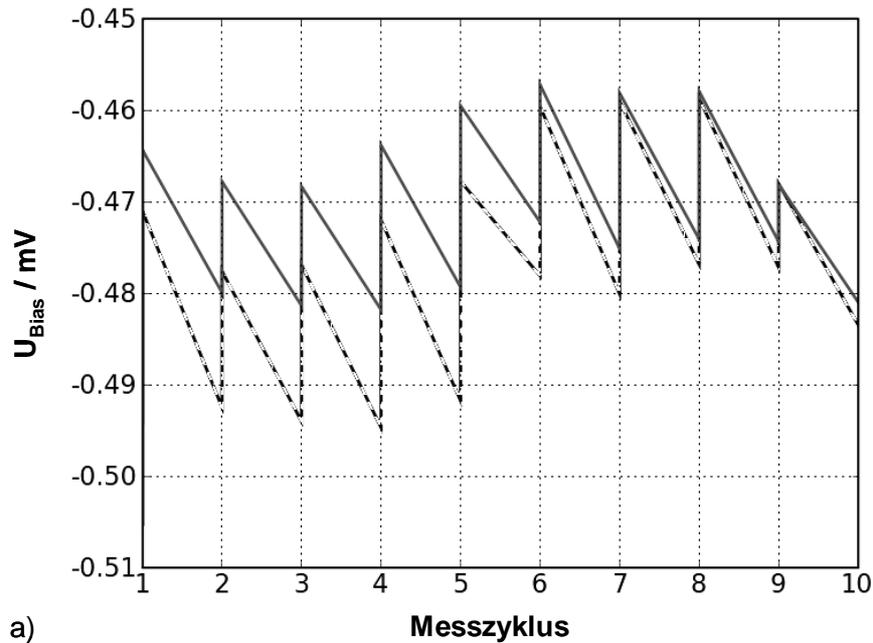


Abb. 3.152: a) Exemplarische Messung der Ansäuerungsrate von Messspot 1 (durchgezogene Linie) und Messspot 16 (gestrichelte Linie). Die Position des Permanentmagneten wurde nach Messzyklus 5 von Messspot 1 auf Messspot 16 gewechselt. b) Die daraus resultierenden Ansäuerungsraten aufgetragen über dem jeweiligen Messzyklus, jeweils für Messspot 1 (durchgezogene Linie) und Messspot 16 (gestrichelte Linie).

In Abb. 3.153 ist die resultierende Ansäuerungsrate der diagonal verlaufenden Messspots 1, 6, 11 und 16, jeweils als gemittelte Werte der Vierfachbestimmung, vor und nach dem Wechsel der Magnetposition, dargestellt. Hier ist eine Zunahme um 16 % für Messspot 16 erkennbar, nachdem der Magnet an diese Position geführt wurde. Eine signifikante Abnahme an Messspot 1 konnte dagegen nicht beobachtet werden. Alle anderen Messspots verhielten sich analog zu ihrer entsprechenden Position.

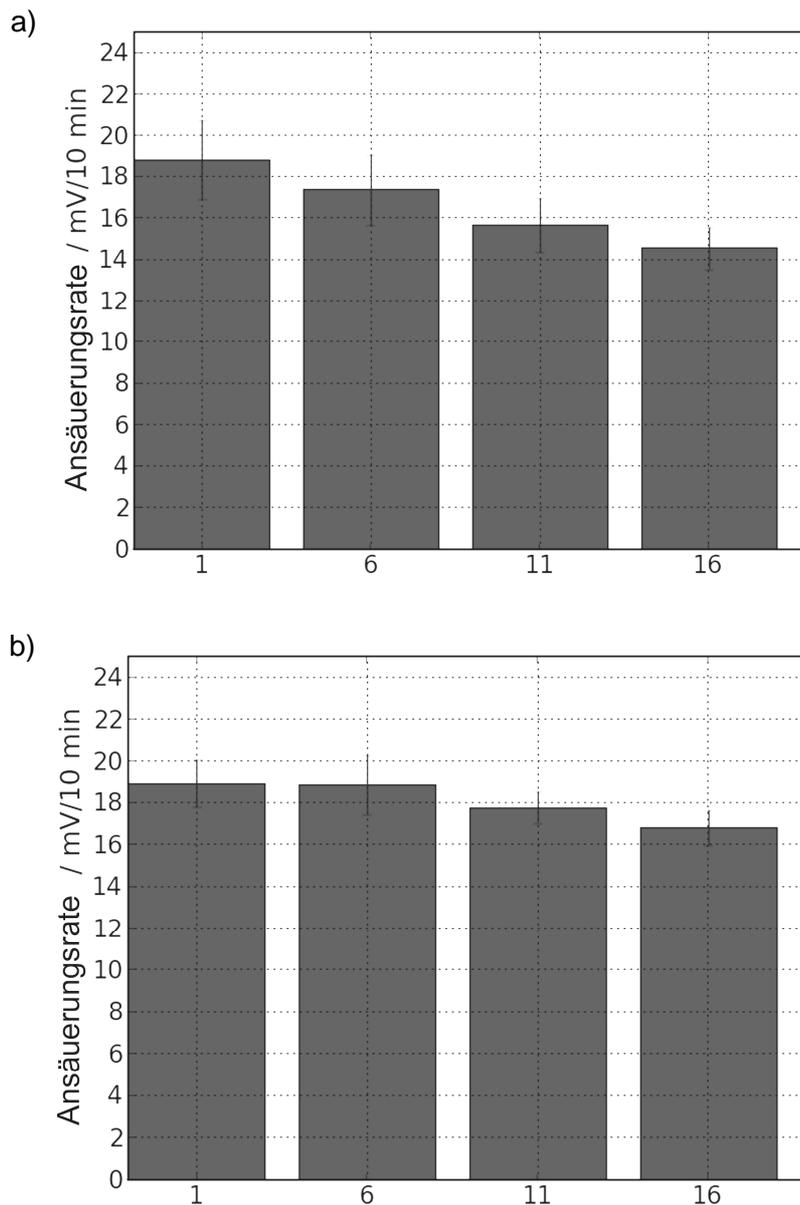


Abb. 3.153: Darstellung der mittleren Ansäuerungsraten der diagonal über dem Sensor verlaufenden Messspots 1, 6, 11 und 16. a) Position des Magneten an Messspot 1, b) Position des Magneten an Messspot 16.

Abb. 3.154 zeigt einen Bereich der Chipoberfläche mittels 3D-Videomikroskopie von Messspot 1 mit adhärenierten Makrophagen auf der Ta_2O_5 -Oberfläche kurz vor und nach

der Messung. Deutlich sind nach der Messung „Magnetic Beads“ an bzw. in den Makrophagen zu erkennen, wohingegen sich auf der Ta₂O₅-Oberfläche keine „Magnetic Beads“ abgelagert haben.

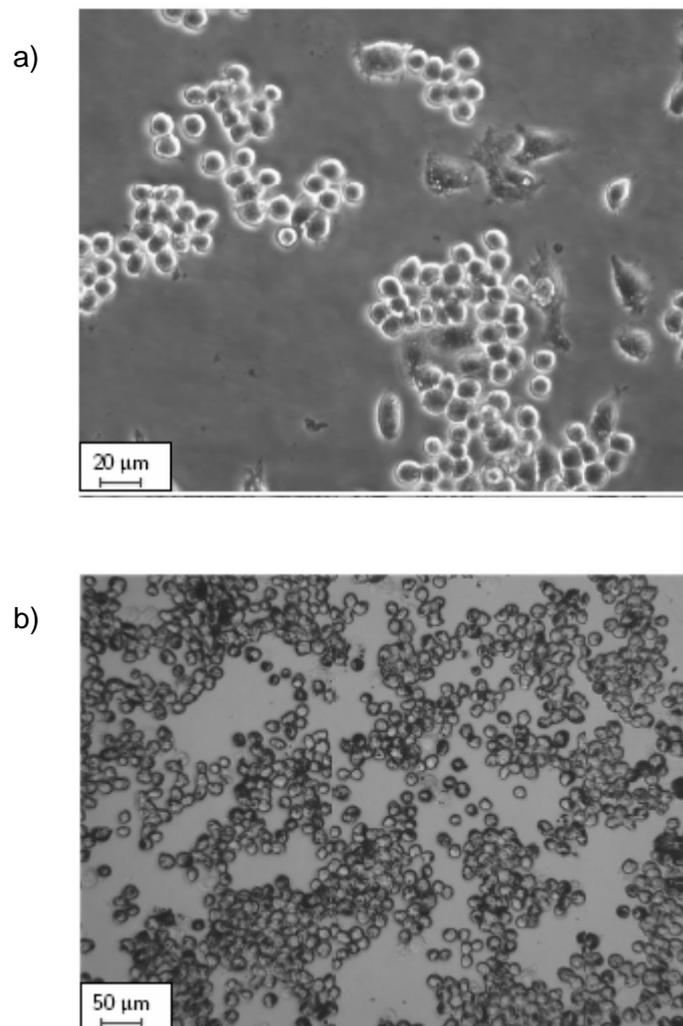


Abb. 3.154: 3D-videomikroskopische Aufnahmen von Makrophagen auf der LAPS-Struktur. a) vor der Messung und b) nach der Messung. Nach der Messung sind die „Magnetic Beads“ deutlich als schwarze Punkte auf bzw. in den Makrophagen erkennbar.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Modellapplikationen unter Verwendung der SPR – Technologie etabliert werden. Eukaryotische Zellen wurden näher charakterisiert, wobei hier die Immobilisierung der Zellen über ein Zucker-Lektin-System im Vordergrund stand. Über solche selbstorganisierende Systeme können einerseits Glykoproteine, andererseits aber auch Zellen effizient immobilisiert werden. Ein geeignetes Zucker-Lektin Paar wurde durch ein Lektin-Screening bestimmt.

Im Hinblick auf Mistellektinbestimmungen in Fertigarzneimitteln zur Krebstherapie wurde zusätzlich ein Testsystem für Mistellektin I (MLI) auf der SPR-Technologie-Plattform etabliert.

Eine Bioabbaubarkeitsstudie des Polyethylencarbonats (PEC) mittels muriner Makrophagen wurde durchgeführt. Hiermit sollte gezeigt werden, wie sich der Abbau des Polymers in Abhängigkeit von der Zellzahl, Zeit und Anwesenheit von Triggerfaktoren verhält bzw. verändert. Als Triggerfaktoren dienten Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*, Lipopolysaccharide (LPS) aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*.

Um möglichst nah an den natürlichen Zustand der Gram negativen Bakterien heranzureichen, wurden sogenannte „künstliche Bakterien“ in einem Modellsystem etabliert, um diese in einem weiteren Schritt als „natürlichen“ Triggerfaktor für die Makrophagen einzusetzen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit sollte die Übertragung der etablierten Systeme auf eine LAPS – (Licht Adressierbarer Potentiometrischer Sensor) Plattform sein.

4.1 Lektin–Screening

Lektine sind aus Pflanzen oder Tieren isolierte Glykoproteine, die spezifisch mit membranständigen und gelösten Kohlenhydratstrukturen reagieren. Diese Eigenschaft sollte zu einem Screening genutzt werden. Ein Screening ist von großem Interesse, da Lektine sowohl in der Pharmazie als auch in der Analytik von Bedeutung sind (vgl. Kapitel 1.6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Screening so durchgeführt, dass eine Testlösung von Lektinen über verschiedene zuckerbeschichtete Goldprismen gegeben wurde. Über die spezifische Interaktion der Lektine zu bestimmten Zuckern können dann anhand der Bindungskurven (Sensorgramme) Aussagen über Bindungskinetiken und -stärken gemacht werden.

Für das Screening wurden folgende Lektine eingesetzt: ConA (*Canavalia ensiformis*), Wheat Germ Agglutinin (*Triticum vulgare*), *Helix pomatia* Agglutinin (*Helix pomatia*), *Ulex europaeus* I Agglutinin (*Ulex europaeus* I), *Viscum album* I Agglutinin

(*Viscum album l*) und Lentil (*Lens culinaris*). Tab. 3.14 führt die eingesetzten Lektine mit der zugehörigen Kohlenhydratspezifität auf.

Zur Oberflächenbeschichtung dienten folgende Kohlenhydrate: Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae*, Fucoidan aus *Fucus vesiculosus*, Hyaluronsäure aus *Streptococcus equi*, Maisstärke und N-Acetyl-D-Galactosamin.

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens der eingesetzten Lektine zu den Zuckeroberflächen zeigt, dass eine Charakterisierung mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz grundsätzlich möglich und somit ein Screening auf Lektine sehr gut zu realisieren ist.

Concanavalin A

ConA aus *Canavalia ensiformis* wies die höchste Affinität zu einem mannanbeschichteten Goldprisma auf. Es folgten die Kohlenhydrate Stärke, Fucoidan, N-Acetyl-D-Galactosamin und Hyaluronsäure. Das Bindungsverhalten von ConA entspricht weitestgehend der in der Literatur beschriebenen Spezifität [Kanellopoulos et al., 1996_a]. Der Literatur zufolge ist ConA hauptsächlich in der Lage, α -D-Mannose- und α -D-Glucosereste zu binden, wobei die Affinität zu Mannoseresten größer ist als zu Glucoseresten [Goldstein et al., 1965; Seftalioglu und Dalcik, 1994]. Dies konnte auch bei den Affinitätsmessungen mit der Oberflächenplasmonresonanz festgestellt werden.

Der durch ConA bedingte Schichtdickenzuwachs betrug auf einem stärkebeschichteten Träger 35,7 % des Zuwachses auf einem mannanbeschichteten. Die mit Hilfe der Ellipsometrie ermittelte Affinität von ConA zu D-Glucose beträgt 21 % der Affinität zu D-Mannose [Horisberger, 1980]. Mögliche Ursache für die differierenden Werte könnten Affinitätsunterschiede zwischen Monomeren und Polymeren der entsprechenden Substanzen sein. Generell besitzt ConA zu Oligo- und Polysacchariden eine höhere Affinität als zu Monomeren [Goldstein et al., 1965]. Brewer und Bhattacharyya (1986) beziffern beispielsweise die Inhibitionskraft eines Trisaccharids aus Mannose auf die ConA-bedingte Agglutination roter Kaninchenblutkörperchen im Vergleich zu der des Monosaccharids als 70-mal höher. Denkbar ist, dass sich mit zunehmender Zahl monomerer Einheiten die Affinität zu Kohlenhydraten auf Glucosebasis in anderem Umfang ändert als bei denen auf Mannosebasis.

Da der Schichtdickenzuwachs neben der Spezifität und der Affinität des Lektins zu dem jeweiligen Kohlenhydrat auch von der Zahl der Bindungsstellen auf dem Träger abhängt, ist auch von einem Einfluss der Bindungskapazität des kohlenhydratbeschichteten Goldprismas auszugehen. Der kritisch zu betrachtende Parameter ist die Größe des Lektins. Die Abmessungen von ConA betragen 3,9 nm x 4,0 nm x 4,2 nm. Die Kontaktfläche zur Mannanoberfläche des Messspots beträgt nahezu 32 nm² [Bakowsky et al., 2000]. Resultierend aus diesen Angaben ist eine theoretische Belegung der Oberfläche des mannanbeschichteten Messspots mit

$1,875 \times 10^{10}$ Molekülen ConA möglich. Dies wären nur 0,054 % der zur Verfügung stehenden Moleküle bei einer ConA-Konzentration von 600 µg/ml.

Auf einem fucoidanbeschichteten Träger wies ConA einen Zuwachs von 26,2 %, bezogen auf den Zuwachs auf einem Mannanträger, auf. Fucoidan ist ein verzweigtes Polysaccharid aus α -L-Fucose und sulfatierter α -L-Fucose, für das ConA keine Spezifität aufweist. Es enthält darüber hinaus Spuren von Glucuronsäure, Galactose, Mannose und Xylose [Beitze-Breyhan, 2000]. Obwohl eine Bindung zwischen dem Lektin und einer endständigen Zuckereinheit bevorzugt ist, ist ConA auch in der Lage, an intern gelegene Zuckermoleküle zu binden [Seftalioglu und Dalcik, 1994]. Damit kann die Affinität von ConA zu einem fucoidanbeschichteten Träger über dessen Gehalt an Mannose erklärt werden, selbst wenn es sich nicht um endständige Mannoseeinheiten handelt.

Hyaluronsäure ist ein Polymer aus N-Acetyl- β -D-Glucosamin und D-Glucuronsäure. Nach Khoursandi (2000) und Seftalioglu und Dalcik (1994) besitzt ConA auch eine Affinität zu N-Acetyl- β -D-Glucosaminen, die aber schwächer ist als diejenigen zu α -D-Mannose- und α -D-Glucoseresten. Die Anlagerung von ConA an einen hyaluronsäurebeschichteten Träger ist somit durch die Affinität zu N-Acetyl- β -D-Glucosaminen zu erklären. Jedoch ist der Schichtdickenzuwachs mit 13,1 % des Zuwachses auf einem Mannanträger doch wesentlich geringer. Dies korreliert mit den Literaturangaben, dass die Affinität zu N-Acetyl- β -D-Glucosaminen niedriger ist als zu α -D-Mannose- und α -D-Glucoseresten. Eine Affinität aufgrund der D-Glucuronsäure zu vermuten ist zu vernachlässigen, auch wenn eine gewisse Strukturverwandtschaft zur Glucose vorhanden ist. Um ConA binden zu können, ist eine Hydroxylgruppe am C6-Atom essentiell [Goldstein et al., 1965]. Die Oxidation von Glucose zu Glucuronsäure erfolgt am C6-Atom, so dass dieses von der sp^3 in die sp^2 Konfiguration übergeht. Demzufolge ist die räumliche Ausrichtung der OH-Gruppe am oxidierten C-Atom eine andere. Darüber hinaus ist die entstandene Carboxylgruppe auch in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen auszubauen, die sich aber intermolekular zwischen zwei Glucuronsäuremolekülen in Form von Dimeren ausbilden. Die Ausbildung zu ConA als Partner für solch eine „Brücke“ wäre somit ausgeschlossen. Insgesamt ist es daher eher unwahrscheinlich, dass die Affinität von ConA zu Hyaluronsäure durch die Anwesenheit von D-Glucuronsäure bedingt ist.

Eine Anlagerung von ConA war auch auf einem N-Acetyl-D-Galactosamin-beschichteten Goldprisma möglich. Dabei lag der Schichtdickenzuwachs bei 17,9 % des Zuwachses auf einem Mannanträger. Nach Goldstein et al. (1965) sind für die Wechselwirkung zwischen ConA und einem Zuckermolekül die Hydroxylgruppen der C-Atome drei, vier und sechs entscheidend. Somit lässt sich die Affinität gegenüber ConA erklären, da diese Bedingungen in N-Acetyl- α -D-Galactosamin erfüllt sind.

Zusammenfassend ist in Tab. 4.34 das Bindungsverhalten von Concanavalin A dargestellt.

Tab. 4.34: Bindungsverhalten des Lektins ConA gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, + hoch, o mittel, - niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten ConA	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	++	++	Spezifität für α -D-Mannosereste
Stärke	+	++	Spezifität für α -D-Glucosereste
Fucoidan	+	-	Fucoidan enthält in Spuren Mannose
Hyaluronsäure	o	++	Spezifität für N-Acetyl- β -D-Glucosamin, Affinität geringer als zu Mannose- und Glucoseresten
N-Acetyl-D-Galactosamin	+	-	Spezifität für N-Acetyl- α -D-Galactosamin, Affinität geringer als zu Mannose- und Glucoseresten

Im Zuge des Lektin-Screenings wurde die Assoziations- und Dissoziationskonstante nach Edwards und Leatherbarrow (1997) für das Zucker-Lektinsystem Mannan-ConA bestimmt. Die aus den Bindungsdaten der konzentrationsabhängigen ConA-Anlagerung ermittelte Assoziationskonstante (k_{ass}) lag bei $9,70 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und stimmt mit den Werten, die mit dem SPI-Gerät generiert wurden, überein [Hartmann, 2004].

Die Dissoziationskonstante (k_{diss}) konnte nur näherungsweise ermittelt werden, da es sich beim Plasmonic[®] SPR-Gerät um ein Küvetten-system handelt. Dadurch kommt es zu keiner kontinuierlichen Auswaschung des gebundenen Liganden durch PBS-Puffer. Es resultiert somit keine stetig abnehmende Dissoziationskurve, sondern eine stufenförmige Abnahme der Dissoziationskurve.

Die Berechnung des k_{diss} -Wertes ergab $3,95 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, der K_{D} -Wert betrug $4,07 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. Smith et al. (2003) ermittelten für das System ConA-Mannan einen K_{D} -Wert von $2,00 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. Eine mögliche Begründung für den doppelt so hohen K_{D} -Wert kann im sequentiellen Austausch des Liganden bei der Dissoziation liegen. Durch die sprunghafte Abnahme wird eine zu hohe Dissoziation vorgetäuscht.

***Lens culinaris* Agglutinin**

Das, wie ConA, für α -D-Glucose- und α -D-Mannosereste spezifische Lektin aus *Lens culinaris* bewirkte den größten Zuwachs ebenfalls auf der Mannanoberfläche. Der Zuwachs auf der Stärkeoberfläche lag bei 43 % des Zuwachses eines Mannanträgers. Dies korreliert mit den Literaturangaben. Nach Kosenko (2002) und Schwarz et al. (1993) ist die Affinität von *Lens culinaris* Agglutinin zu D-Mannose größer als zu D-Glucose. In einem Inhibitionstest der Agglutinationsaktivität des Lektins ermittelte Kosenko, dass die Stoffmenge, die zur vollständigen Hemmung der Aktivität erforderlich ist, bei D-Glucose doppelt so hoch ist wie bei D-Mannose. Schwarz et al. (1993) fanden mittels Titrationskalorimetrie ebenfalls eine doppelt so hohe Affinität für D-Mannose heraus. Unterschiede zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messung bestehen darin, dass sich die Werte bei Schwarz et al. (1993) und

Kosenko (2002) zum einen auf Zuckermonomere beziehen und sie zum anderen in homogener Phase ermittelt wurden.

Auch das *Lens culinaris* Agglutinin zeigte auf einem fucoidanbeschichteten Träger eine Anlagerung von 21,4 % des Zuwachses auf einer Mannanoberfläche. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf das Vorhandensein von Mannose in Fucoidan zurückzuführen [Beitze-Breyhan, 2000]. Das Lektin besitzt keine Affinität zu L-Fucose, dem Monomer des Fucoidans. Dies bestätigen auch die Untersuchungen von Kosenko (2002).

Der Schichtdickenzuwachs auf dem hyaluronsäurebeschichteten Träger betrug 35,7 % des Zuwachses eines mannanbeschichteten. *Lens culinaris* Agglutinin besitzt wie ConA eine Affinität zu N-Acetyl-D-Glucosaminen, die schwächer ist als diejenige zu α -D-Glucose- und α -D-Mannoseresten [Seftalioglu und Dalcik, 1994]. Da Hyaluronsäure ein Polymer aus N-Acetyl- β -D-Glucosamin und D-Glucuronsäure ist, erklärt sich die Anlagerung an diesen Träger.

Der Schichtdickenzuwachs auf dem N-Acetyl-D-Galactosamin-beschichteten Träger lag bei 28,6 % des Zuwachses eines mannanbeschichteten Trägers. Zur Kohlenhydratbindung bei *Lens culinaris* Agglutinin sind die Hydroxylgruppen der gleichen C-Atome entscheidend wie bei ConA [Loris et al., 1994]. Da es sich bei dem Grundmolekül von N-Acetyl-D-Galactosamin um D-Galactose handelt und sich dieses nur in der Konformation zur D-Glucose am C1-Atom unterscheidet, ist für die Bindung des Lektins an das Kohlenhydrat die Bedingung, dass am C3-, C4- und C6-Atom eine Hydroxylgruppe vorhanden ist, erfüllt [Goldstein, 1965].

Tab. 4.35 stellt zusammenfassend das Bindungsverhalten des *Lens culinaris* Agglutinins zu den unterschiedlichen Kohlenhydratoberflächen und die möglichen Gründe für das gezeigte Verhalten dar.

Tab. 4.35: Bindungsverhalten des *Lens culinaris* Agglutinins gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, + hoch, o mittel, - niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten <i>Lens culinaris</i> Agglutinin	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	++	++	Spezifität für α -D-Mannosereste
Stärke	+	++	Spezifität für α -D-Glucosereste
Fucoidan	-	o	Fucoidan enthält Mannose in Spuren
Hyaluronsäure	o	+	Spezifität für N-Acetyl- β -D-Glucosamin, Affinität geringer als zu Mannose- und Glucoseresten
N-Acetyl-D-Galactosamin	o	-	Aufgrund der Ähnlichkeit zu D-Glucose gutes Bindungsverhalten, Affinität geringer als zu Mannose- und Glucoseresten

***Viscum album* I Agglutinin**

Viscum album I Agglutinin bewirkte den größten Schichtdickenzuwachs auf der Fucoidanoberfläche. Die Zuwächse auf den anderen Oberflächen waren für Stärke 25 %, N-Acetyl-D-Galactosamin 18,8 %, Mannan 12,5 % und Hyaluronsäure 6,3 % des Zuwachses auf dem fucoidanbeschichteten Träger.

Viscum album I Agglutinin bindet spezifisch D-Galactose. Da Fucoidan in geringen Mengen auch D-Galactose enthält [Beitze-Breyhan, 2000], ist die Anlagerung wahrscheinlich auf diesen Gehalt zurückzuführen. Im Vergleich zu ConA, das möglicherweise aufgrund von Mannoseresten an den Träger bindet, ist der absolute Zuwachs durch *Viscum album* I Agglutinin mit $16,0 \pm 2,2$ AU um mehr als 25 % geringer als der von ConA mit $22,0 \pm 3,3$ AU. Zum Vergleich des Bindungsverhaltens zweier Lektine auf einer Oberfläche ist es notwendig, die Molekulargewichte der Lektine zu berücksichtigen. Erforderlich ist dies, weil die mit Hilfe der SPR gemessenen Schichtdickenzuwächse sowohl von der Stoffmenge an gebundenem Agens als auch von deren Masse bzw. Größe abhängen. Unter Einbeziehung der Molekulargewichte von 60 kDa (*Viscum album* I Agglutinin) und 104 kDa (ConA) ist die Stoffmenge des auf der Fucoidanoberfläche gebundenen Lektins von *Viscum album* I größer als die von ConA.

Betrachtet man die absoluten Schichtdickenzunahmen, so waren diese für *Viscum album* I Agglutinin auf Stärke ($4,0 \pm 1,4$ AU) und N-Acetyl-D-Galactosamin ($3,0 \pm 0,8$ AU) sehr gering.

Für mannan- und hyaluronsäurebeschichtete Prismen lagen die Signale im Bereich des Grundrauschens. Diese Schichtdickenzuwächse können nicht als Affinität zwischen Lektin und entsprechendem Kohlenhydrat angesehen werden.

Eine Zusammenfassung des Bindungsverhaltens des *Viscum album* I Agglutinins zu den unterschiedlich beschichteten Kohlenhydratträgern sowie die möglichen Gründe für das gezeigte Verhalten sind in Tab. 4.36 dargestellt.

Tab. 4.36: Bindungsverhalten des *Viscum album* I Agglutinins gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, + hoch, - niedrig, -- sehr niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten <i>Viscum album</i> I Agglutinin	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	--	++	keine Spezifität für α -D-Mannosereste
Stärke	-	++	keine Spezifität für α -D-Glucosereste
Fucoidan	+	++	enthält Galactose in Spuren
Hyaluronsäure	--	++	keine Spezifität für N-Acetyl- β -D-Glucosamin
N-Acetyl-D- Galactosamin	-	++	keine Spezifität für N-Acetyl- α -D-Galactosamin

***Ulex europaeus* I Agglutinin**

Ulex europaeus I Agglutinin kann spezifisch an α -L-Fucose binden. Erwartungsgemäß war daher der Schichtdickenzuwachs auf der Fucoidanoberfläche am größten. Die Zuwächse auf den anderen, für das Lektin unspezifischen, Oberflächen waren mit 64,3-85,7 % des Zuwachses der Fucoidanoberfläche unerwartet hoch. Dass alle Kohlenhydrate, die zur Herstellung der Zuckeroberflächen genutzt wurden, mit α -L-Fucose verunreinigt waren, ist auszuschließen. Würde man von einer herstellungsbedingten Verunreinigung des *Ulex europaeus* I Lektins ausgehen, käme dafür höchstens das *Ulex europaeus* II Lektin in Frage. Dieses weist aber ebenfalls keine Spezifität zu den entsprechenden Oberflächen auf. Eine mögliche Ursache für die hohen Signalzuwächse könnte in der unzureichenden Passivierung der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA liegen. Somit wäre das Lektin *Ulex europaeus* I aufgrund seines hohen Molekulargewichts (170 kDa) in der Lage, unspezifische Bindungen zu den verschiedenen Zuckeroberflächen auszubilden.

Tab. 4.37 stellt zusammenfassend das Bindungsverhalten des *Ulex europaeus* I Agglutinins zu den unterschiedlich beschichteten Kohlenhydrat-trägern sowie die möglichen Gründe für das gezeigte Verhalten dar.

Tab. 4.37: Bindungsverhalten des *Ulex europaeus* I Agglutinins gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, + hoch, o mittel, - niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten <i>Ulex europaeus</i> I Agglutinin	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	+	o	identisch zu Stärke
Fucoidan	++	++	Spezifität für α -L-Fucose
Stärke, Hyaluronsäure, N-Acetyl-D- Galactosamin	+	-	1. Unspezifische Bindung trotz Passivierung mit BSA 2. Literaturangaben beziehen sich auf homogene Phase, Messung erfolgte in heterogener Phase

Wheat Germ Agglutinin

Das Wheat Germ Agglutinin aus *Triticum vulgare* besitzt eine Spezifität gegenüber N-Acetyl- β -D-Glucosamin [Nagata und Burger, 1974] und zeigte erwartungsgemäß auf einem hyaluronsäurebeschichteten Träger den höchsten Schichtdickenzuwachs. Hyaluronsäure besteht aus der Struktureinheit von N-Acetyl- β -D-Glucosamin und D-Glucuronsäure und besitzt somit die Voraussetzung zur Ausbildung einer spezifischen Bindung gegenüber dem Wheat Germ Agglutinin.

Die Zuwächse auf den für das Lektin unspezifischen Kohlenhydratoberflächen lagen zwischen 4,9 % und 19,5 % des Zuwachses der Hyaluronsäuroberfläche. Im Einzelnen waren das je 4,9 % für die Stärke- und fucoidanbeschichteten Träger, 7,3 % für die N-Acetyl-D-Galactosaminoberfläche und 19,5 % für einen mannanbeschichteten Träger. Auch hier muss näher auf die absoluten Schichtdickenzuwächse eingegangen werden, da diese, mit Ausnahme von dem Mannanträger, sehr gering waren. Der Schichtdickenzuwachs lag bei dem Stärke-, Fucoidan- und N-Acetyl-D-Galactosaminträger zwischen 1,0 und 1,5 AU. Bei allen drei Oberflächen kann nicht von einer Affinität des Wheat Germ Agglutinins gesprochen werden, da sich die Zuwächse im Bereich des Grundrauschens befanden. Bei Mannan lag der absolute Zuwachs bei $4,0 \pm 0,8$ AU. Dieses geringe Bindungsverhalten könnte auf die strukturelle Ähnlichkeit zwischen D-Mannose und N-Acetyl- β -D-Glucosamin zurückzuführen sein.

Eine Zusammenfassung des Bindungsverhaltens des Wheat Germ Agglutinins zu den unterschiedlich beschichteten Kohlenhydratträgern sowie die möglichen Gründe für das gezeigte Verhalten sind in Tab. 4.38 dargestellt.

Tab. 4.38: Bindungsverhalten des Wheat Germ Agglutinins gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, - niedrig, - - sehr niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten Wheat Germ Agglutinin	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	-	++	keine Spezifität für α -D-Mannosereste
Stärke	--	++	keine Spezifität für α -D-Glucosereste
Fucoidan	--	++	keine Spezifität für α -L-Fucose
Hyaluronsäure	++	++	Spezifität für N-Acetyl- β -D-Glucosamin
N-Acetyl-D-Galactosamin	--	++	keine Spezifität für N-Acetyl- α -D-Galactosamin

Helix pomatia Agglutinin

Das Lektin aus *Helix pomatia* bindet spezifisch an terminale N-Acetyl- α -D-Galactosaminreste [Hammarström und Kabat, 1971]. Erwartungsgemäß erfolgte der höchste Schichtdickenzuwachs auf dem N-Acetyl-D-Galactosamin-beschichteten Träger. Auf der Stärke- und Fucoidanoberfläche betrug der Zuwachs 0,5 und 1,0 AU, was dem Grundrauschen nahezu entspricht.

Für einen mannanbeschichteten Träger lag der Wert bei $4,0 \pm 0,8$ AU und bei einem hyaluronsäurebeschichteten bei $3,0 \pm 0,8$ AU. Dass sehr geringe Affinitäten auf diesen beiden Trägern erhalten wurden, könnte in der Strukturähnlichkeit der Mannose und der Hyaluronsäure zu N-Acetyl- α -D-Galactosamin begründet sein.

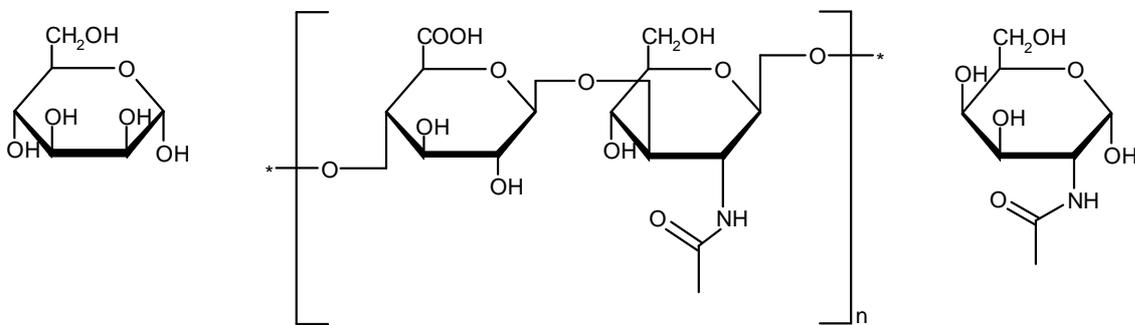


Abb. 4.155: Strukturähnlichkeit zwischen Mannose, Hyaluronsäure und N-Acetyl- α -D-Galactosamin (von links nach rechts).

Helix pomatia Agglutinin hat eine Spezifität zu N-Acetyl- α -D-Galactosamin. Sanchez et al. (2006) zeigten in der Strukturanalyse des *Helix pomatia* Agglutinins (HPA), dass HPA mit höherer Affinität zu N-Acetyl- α - als zu N-Acetyl- β -D-Galactosamin bindet. Die Bindung erfolgt hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxylgruppen der C-Atome C3, C4, und C6. Diese Bedingungen sind bei der Mannose erfüllt. Dies würde die Affinität von Mannan zum *Helix pomatia* Agglutinin erklären. Die Affinität zur Hyaluronsäure könnte auf die Acetylfunktion am C2-Atom zurückzuführen sein. Diese scheint aber nur im Zusammenhang mit den Bedingungen nach Sanchez für eine Affinität zu sorgen. Bei der Hyaluronsäure sind aber nur die C-Atome C4 und C6 mit einer Hydroxylgruppe versehen. Die Hydroxylgruppe des C3-Atoms bildet die Etherbrücke zur Glucuronsäure. Das würde auch die um 25 % niedriger liegende Affinität zwischen *Helix pomatia* Agglutinin und Hyaluronsäure gegenüber *Helix pomatia* Agglutinin und Mannan erklären.

Tab. 4.39 stellt zusammenfassend das Bindungsverhalten des *Helix pomatia* Agglutinins zu den unterschiedlich beschichteten Kohlenhydratträgern sowie die möglichen Gründe für das ermittelte Verhalten dar.

Tab. 4.39: Bindungsverhalten des *Helix pomatia* Agglutinins gegenüber verschiedenen Kohlenhydratträgern im Vergleich zu Literaturangaben (++ sehr hoch, o mittel, - niedrig - - sehr niedrig).

Kohlenhydrat	Bindungsverhalten <i>Helix pomatia</i> Agglutinin	Übereinstimmung mit Literaturangaben	Ursache für das Bindungsverhalten
Mannan	-	++	keine Spezifität für α -D-Mannosereste
Stärke	--	++	keine Spezifität für α -D-Glucosereste
Fucoidan	--	++	keine Spezifität für α -L-Fucose
Hyaluronsäure	-	++	keine Spezifität für N-Acetyl- β -D-Glucosamin
N-Acetyl-D-Galactosamin	o	++	Spezifität für N-Acetyl- α -D-Galactosamin

4.2 Krebszellen unter Einfluss von Concanavalin A

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Strategien angewendet werden, um cancerogene Zellen auf einer Zuckeroberfläche zu immobilisieren. Es wurden zwei unterschiedliche Zelllinien verwendet. Hierbei handelt es sich zum einen um Adenokarzinomzellen der Zelllinie NCI-H125- und um Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC). Da bisher noch keine Daten in Bezug auf eukaryotische Zellen auf der SPR-Messplattform vorhanden waren, sollte das grundlegende Verhalten der Zellen auf einer Mannanoberfläche unter Einfluss von ConA untersucht werden.

Bindungskurven der NCI-H125- und LLC-Zellen

Die Bindungskurven der Zellen waren in den Messreihen teilweise sehr unterschiedlich, was sich in der Steigung und der Höhe der Messsignale zeigte.

In der Assoziationsphase (Zeit von der Zugabe der Zellen bis zum maximalen Messsignal) zeigten die Zellen in einigen Messreihen einen sehr steilen Anstieg der Bindungskurve, was eine gute Interaktion (spezifische Bindung) mit dem jeweiligen Interaktionspartner widerspiegelt. Ein flacher Anstieg der Bindungskurve in der Assoziationsphase könnte auf Sedimentationseffekte der Zellen zurückzuführen sein. Die Zeit, die die Zellen benötigen, um auf einer Oberfläche adhären zu werden, differiert. Im Falle einer längeren Adhärenzzeit zeigt sich dies in einem flacheren Anstieg der Bindungskurve.

Während der Inkubationsphase muss mit weiterer Motilität der Zellen auf der Sensoroberfläche gerechnet werden, was sich in einem stetig flachen Anstieg der Bindungskurve nach Erreichen des maximalen Messsignals zeigt, und eine vermeintliche Signaländerung vortäuschen kann. Zelltrümmer, die beim Ablösen der Zellen während der Kultivierung entstehen und mit auf den Sensor gelangen, können ebenfalls Sedimentation hervorrufen.

Die Ursache für so divergentes Verhalten der Zellen kann in der Verwendung verschiedener Zellpassagen an unterschiedlichen Tagen liegen. Da es sich bei Zellen um lebende Systeme handelt, ist eine Fehlentwicklung von Zellpassagen möglich. Somit ist eine Standardisierung in Bezug auf die Eigenschaften der Zellen (z.B. das Verhalten auf einer mannanbeschichteten Sensoroberfläche) schwierig. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an unterschiedlichen Tagen war daher problematisch.

In den Kontrollversuchen auf der Goldoberfläche zeigten die Zellen über den Messzeitraum einen flachen Anstieg. Nach den Spülschritten konnten geringe Signalzuwächse von durchschnittlich 4,0 und 5,5 AU gemessen werden. Insbesondere bei den NCI-H125-Zellen scheinen Sedimentationseffekte ausgeprägter vorhanden zu sein, was sich an dem stetig flachen Anstieg während der Inkubationsphase zeigt (vgl. Abb. 3.57). Dass eine sehr niedrige Signaländerung hervorgerufen wurde, kann in der Beschaffenheit der Goldoberfläche begründet sein. Diese weist von Natur aus

schon eine hohe Rauigkeit auf (vgl. Abb. 3.142), so dass die Möglichkeit der Adhärenz der Zellen oder möglicher Zelltrümmer auf der unbehandelten Goldoberfläche bestand.

4.2.1 Immobilisierung von NCI-H125-Zellen

Für die Immobilisierungsversuche wurden NCI-H125-Zellen mit einer Zellkonzentration von 8000 Zellen/Messspot eingesetzt. Diese wurden aus einer Hautmetastase eines Patienten mit Adenokarzinom der Lunge etabliert. Die Zellen sind mittelgroß und gering kohäsiv. In der Monolayerkultur wachsen die Tumorzellen adhärent mit einer Generationszeit von 39 Stunden.

Immobilisierung von NCI-H125-Zellen ohne BSA Passivierung

Die Schichtdickenzuwächse von NCI-H125-Zellen auf einem mannanbeschichteten Träger ohne vorherige Passivierung mit BSA sind in Abb. 4.156 dargestellt.

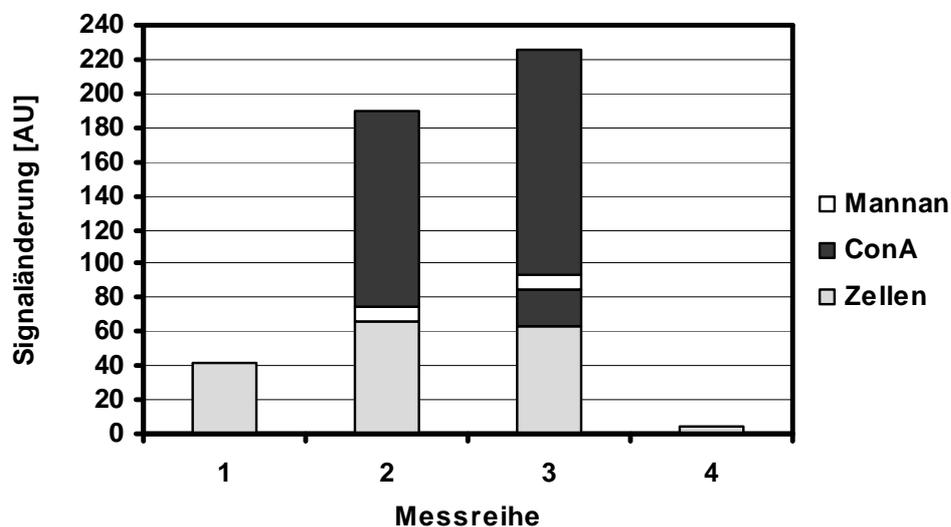


Abb. 4.156: Schichtdickenzuwächse auf einem mannanbeschichteten Träger ohne Passivierung mit BSA. Schichtaufbau der Assays: (1) Zellen, (2) Zellen-Mannan-ConA, (3) Zellen-ConA-Mannan-ConA, (4) Kontrolle: Zellen auf einer Goldoberfläche.

Um das Verhalten der Zellen auf der SPR-Plattform zu charakterisieren, wurden in der ersten Versuchsreihe nur die Zellen auf den mannanbeschichteten Träger gegeben. Die durchschnittliche Signaländerung betrug 41,0 AU. Dies ist in Anbetracht der Größe der Zellen (20 µm), sowie deren Gewicht recht gering. Vergewärtigt man sich die Signaländerung bei einer Antikörperzugabe so ist das resultierende Signal wesentlich höher. Auch die Molekulargewichte bzw. die Massen der Substanzen, die in einem Assay auf der Oberflächenplasmonresonanz verwendet werden, haben direkten Einfluss auf die Höhe des Messsignals.

In der zweiten Messreihe wurden die NCI-H125-Zellen immobilisiert, mit Mannan behandelt und anschließend wurde ConA zugegeben. Dabei ergab sich eine Signaländerung von 66,5 AU für die Zellen, 8,0 AU für Mannan und 115,0 AU für ConA.

Im Vergleich zur ersten Messreihe ergibt sich für die Zellen bei gleicher Zellzahl ein um 62 % höheres Messsignal. Eine Ursache könnte in der Kultivierung der Zellen für Messreihe 1 liegen. Dabei kann es bei den Zellen zu Fehlentwicklungen gekommen sein, die dann zu einem unterschiedlichen Verhalten auf einer Mannanoberfläche führten. Dies resultiert dann in einem niedrigeren Messsignal. Dass das Mannan eine sehr geringe Messsignaländerung hervorruft, ist im Hinblick auf das Molekulargewicht nicht erklärbar. Dieses beträgt bei Mannan etwa 100 kDa [Harworth et al., 1937] und liegt damit in dem Bereich des Molekulargewichtes von ConA. Ein Signal in Höhe des Messsignals von ConA wäre zu erwarten gewesen. Eine Ursache hierfür könnten die wenigen für Mannan spezifischen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche der NCI-H125-Zellen sein. Die gute Anlagerung und somit die hohe Signaländerung des ConA liegt in der Spezifität zu Mannan begründet.

Die dritte Messreihe wurde in Form eines ConA-Mannan-Sandwiches durchgeführt. Nach der Immobilisierung der Zellen, welche eine Signaländerung von 63,5 AU hervorrief, wurden diese mit ConA-Mannan-ConA behandelt und es resultierten folgende Signaländerungen: Erste ConA-Zugabe 21,0 AU, Mannan 9,0 AU und die zweite ConA-Zugabe 132,0 AU. Auch in dieser Messreihe ergab sich für Mannan nur eine sehr geringe Signaländerung. Im Gegensatz zur zweiten Messreihe wurden jedoch vor der Mannanzugabe die Zellen mit ConA behandelt. Somit hätte die Interaktion zwischen Mannan und der ersten ConA-Zugabe aufgrund der Spezifität zwischen ConA und D-Mannoseresten wesentlich größer sein müssen. Die zweite ConA-Zugabe ergab einen der Spezifität angemessenen Signalzuwachs von 132,0 AU. Hier spielt wahrscheinlich der Mannanschritt eine wichtige Rolle. Vermutlich sind die D-Mannosereste bei einer „frischen“ Mannanschicht besser ausgerichtet als auf einem mannanbeschichteten Träger, der getrocknet gelagert für die Messung eingesetzt wurde (vgl. Abb. 4.157, Messreihe 4-6). Nach Zugabe des Mannans scheinen die D-Mannosereste in Lösung besser mit den Bindungsstellen des ConA nach der zweiten ConA-Zugabe zu interagieren. Ein Grund für die ausbleibende Interaktion des Mannans mit der ersten ConA-Zugabe könnte sein, dass der größte Teil der vier ConA-Bindungsstellen durch Kohlenhydratstrukturen besetzt ist und somit nur noch wenige Bindungsstellen für D-Mannosereste frei sind. Ein weiterer Grund kann in der Oberflächenstruktur der Zelloberfläche liegen. Ist diese stark zerklüftet und das ConA darin „versunken“ ist eine Interaktion des Mannans mit den D-Mannoseresten aus sterischen Gründen nicht möglich.

Immobilisierung von NCI-H125-Zellen mit BSA Passivierung

In weiteren Messreihen wurden die Zellen auf einem Mannanträger immobilisiert, bei dem zuvor die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA passiviert wurden. Die Schichtdickenzuwächse sind in Abb. 4.157 dargestellt.

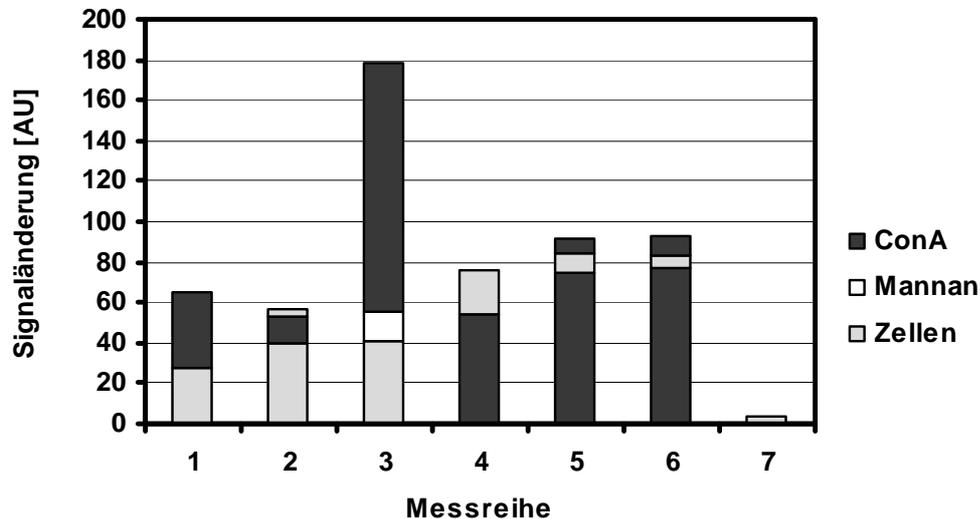


Abb. 4.157: Schichtdickenzuwächse auf einem mit BSA passivierten Mannanträger. Schichtaufbau der Assays: (1) Zellen-ConA, (2) Zellen-ConA-Zellen, (3) Zellen-Mannan-ConA, (4) ConA-Zellen, (5) ConA-Zellen-ConA, (6) ConA-Zellen-ConA-Zellen, (7) Kontrolle: Zellen auf einer Goldoberfläche.

Bei den Messreihen eins bis drei wurde als erster Schritt die Immobilisierung der NCI-H125-Zellen durchgeführt. Die Messsignaländerungen lagen durchschnittlich bei 28,0 AU (Messreihe 1), 39,5 AU (Messreihe 2) und 41,5 AU (Messreihe 3). Die Werte bei den Reihen zwei und drei sind nahezu identisch. Wohingegen der Messwert für Messreihe eins nur 69 % des Messwertes der beiden anderen Messreihen betrug. Die Begründung kann in den Zellen liegen. Da es sich bei Zellen um lebende Systeme handelt, kann es selbst unter gleichen Kulturbedingungen zu unterschiedlichem Verhalten der Zellen kommen. Beim Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wird zunächst das Kulturmedium verworfen und die Zellen werden mit PBS-Puffer gewaschen, um Zelltrümmer und zweiwertige Kationen zu entfernen. Bei diesem Schritt können Zelltrümmer auf den Zellen zurückbleiben. Diese Zellrückstände ergeben bei den Messungen dann ein geringeres Signal. Dies könnte eine mögliche Erklärung bei der Zellzugabe in der ersten Messreihe sein.

Das Messsignal der ConA-Zugabe war in der ersten Messreihe um 180 % größer als in der zweiten (36,5 AU vs. 13,0 AU). Geht man davon aus, dass ein hohes Signal für eine hohe Anzahl an immobilisierten Zellen steht, müsste auch das Signal für ConA größer sein, da mehr spezifische Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche zur Verfügung stünden. Da aber große Moleküle bzw. Substanzen ebenfalls ein hohes Signal hervorrufen, kann es im Fall von Messreihe zwei sein, dass die Zellen evtl. nicht adhärent auf dem Messspot waren, sondern Schichten bildeten. Dies würde das

höhere Messsignal der ersten Zellzugabe (Messreihe 2) gegenüber der Zellzugabe in Messreihe eins erklären. Durch die Schichten wären viele Bindungsstellen für das ConA sterisch nicht erreichbar, was die verminderte Bindung zu ConA widerspiegeln würde. Des Weiteren wäre es möglich, dass ConA in den sich ausgebildeten Zellschichten „versinkt“. In diesem Fall würden ebenfalls zu wenig Bindungsstellen für die Zellen der zweiten Zellzugabe in Messreihe zwei zur Verfügung stehen. Dies erklärt dann auch das geringe Messsignal für die zweite Zugabe der NCI-H125-Zellen von 4,0 AU.

Bei der dritten Messreihe wurde als zweiter Assayschritt Mannan zugegeben, welches eine Signaländerung von 13,5 AU ergab. Dieser Wert ist für das Molekulargewicht des Mannans zu gering. Da es sich bei der Immobilisierung der Zellen auf dem mannanbeschichteten Goldträger aufgrund der Passivierung mit BSA um eine spezifische Bindung handeln muss, müsste auch die Anlagerung von Mannan an die Zellmembran spezifisch sein. Tumorzellen sind in der Lage, Lektine zu exprimieren. Daher ist eine spezifische Bindung zu einem entsprechenden Kohlenhydrat möglich [Lotan und Raz, 1988]. Jedoch ist eine eindeutige Bestimmung der Spezifität der Lektine auf der Zelloberfläche schwierig, da wenig über die Oberflächenlektine bekannt ist. Diese müssten in aufwendigen Verfahren isoliert und aufgereinigt werden [Gabius und Gabius, 1990]. Die ConA-Zugabe der dritten Messreihe zeigte erwartungsgemäß eine große Signaländerung (123,0 AU), was für die Spezifität des ConA gegenüber Mannan spricht.

In den Messreihen vier bis sechs liegen die Signaländerungen für die erste ConA-Zugabe in einem Bereich von 54,5 bis 77,5 AU. Normalerweise sollten die Signale für ConA nahezu identisch sein, da die gleichen Konzentrationen an ConA (310 µg/ml) verwendet wurden. Eine mögliche Erklärung, dass das Messsignal der ersten ConA-Zugabe der sechsten Messreihe um 42 % höher liegt, kann zum einen an einer unvollständigen Passivierung der Mannanoberfläche gelegen haben. Somit hätten noch unspezifische Bindungsstellen für eine Bindung zur Verfügung gestanden. Eine weitere Möglichkeit liegt in einer fehlerhaften Beschichtung des Goldträgers mit Mannan, so dass die D-Mannosereste ungerichtet für eine spezifische Bindung zum ConA auf der Oberfläche zur Verfügung standen.

Betrachtet man die Zellzugaben bei den Messreihen vier bis sechs, ist das resultierende Signal im Verhältnis zur Masse der NCI-H125-Zellen sehr gering [22,0 AU (Messreihe 4), 9,0 AU (Messreihe 5), 6,0 AU (Messreihe 6)]. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, korreliert das SPR-Messsignal mit der Masse des zugegebenen Agens. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte die fehlende Spezifität der Zellen gegenüber ConA sein.

Die Messsignale lagen bei der zweiten Zugabe von ConA (5. und 6. Messreihe) bei 7,5 AU und 9,0 AU. Eine Erklärung hierfür wäre die geringe Anzahl spezifischer Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche. Des Weiteren könnte es sein, dass alle für die Bindung mit ConA spezifischen Zuckerstrukturen durch das ConA der ersten

Zugabe für eine Bindung besetzt sind. Dies ist unwahrscheinlich, da die Zellen bei einer Größe von 20 µm nur mit einem Teil der Oberflächenstrukturen mit dem ConA der ersten Zugabe eine Bindung eingehen können. Somit ist die Theorie der geringen Anzahl an ConA spezifischen Zuckerstrukturen die naheliegendere.

Bei der sechsten Messreihe wurde als letzter Schritt versucht, ein weiteres Mal Zellen auf die vorhandenen Schichten zu immobilisieren. Dies blieb aber erfolglos. Eine Signaländerung konnte nicht gemessen werden. Grund hierfür könnte das Verlassen des evaneszenten Feldes sein, somit würde die zweite Anlagerung der NCI-H125-Zellen messtechnisch nicht mehr erfasst. Das Ausbleiben einer weiteren Anlagerung der Zellen könnte auch auf das Fehlen freier spezifischer Bindungsstellen des ConA zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit läge in der Veränderung der NCI-H125-Zellen während der Versuche. Da es sich bei Zellen um lebende Systeme handelt, könnte sich die Zusammensetzung der Zellmembranoberflächenmoleküle verändern. Die Möglichkeit, dass Apoptose ausgelöst wird, besteht ebenfalls. So beschreiben Kulkarni und McCulloch (1995) in ihren Untersuchungen zur Funktion von Kohlenhydraten auf der Zelloberfläche bei der Apoptose, dass ConA in der Lage ist, an die Oberfläche von nichtapoptotischen Fibroblasten zu binden und nach einigen Stunden die Apoptose zu induzieren. Da zwischen den einzelnen NCI-H125-Zellzugaben ca. 2 Stunden lagen, ist diese Erklärung sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassung

Vergleicht man die Messreihen der NCI-H125-Zellen auf einem nicht passivierten mit einem passivierten Mannanträger, ist die Immobilisierung der Zellen direkt auf dem mannanbeschichteten Goldträger unterschiedlich intensiv. Liegt die Signaländerung für die Zellen der Messreihen eins, zwei und drei (NCI-H125-Zellen ohne BSA Passivierung) bei durchschnittlich 57,0 AU, so beträgt das durchschnittliche Signal der Messreihen eins, zwei und drei (NCI-H125-Zellen mit BSA Passivierung) 36,0 AU. Dieser Wert ist um 37 % geringer, was mit dem Passivieren der unspezifischen Bindungsstellen zu begründen ist.

Im Hinblick auf die Kurvengeometrien zeigten die Bindungskurven der Zellen in den Versuchen ohne BSA einen steilen Anstieg (gute Anlagerung) in der Assoziationsphase, wohingegen der Kurvenverlauf in den Versuchen auf einer passivierten Mannanoberfläche flacher war (Anlagerung nicht so gut, Sedimentationseffekte).

Aufgrund der Kurvengeometrie und den Signalzuwächsen scheint es so zu sein, dass die Immobilisierung der Zellen auf einer nicht passivierten Oberfläche die besseren Ergebnisse geliefert hat. Hierbei ist zu bedenken, dass spezifische und unspezifische Bindungsstellen für die Zellimmobilisierung zur Verfügung standen. Da jedoch nur spezifische Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Mannanoberfläche erfasst werden sollen, muss in weiteren Messungen überprüft werden, ob eine BSA Passivierung der Oberfläche sinnvoll ist.

Bei den Messreihen vier bis sechs des passivierten Trägers betrogen die Signale für die Zellzugaben 22,0 AU (Messreihe 4), 9,0 AU (Messreihe 5) und 6,0 AU (erste Zellzugabe der Messreihe 6). Eine mögliche Ursache für das relativ niedrige Signal in Bezug auf Größe und Masse der Zellen könnte in der Interaktion mit dem ConA liegen. Wie zuvor schon erwähnt, kann ConA in der Lage sein Apoptose bei Zellen auszulösen [Kulkarni und McCulloch, 1995]. Die Ergebnisse der Messreihen unterstützen diese Theorie. In REM Aufnahmen konnten deutliche Veränderungen der NCI-H125-Zellen festgestellt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf apoptotische Vorgänge zurückzuführen sind (vgl. 3.2.3).

4.2.2 Immobilisierung von Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC)

Für diese Versuchsreihen wurden Lewis Lung Carcinom Zellen (LLC) mit einer Zellkonzentration von 8000 Zellen/Messspot verwendet. Dabei sollte ein möglichst dichter Zellrasen erzeugt werden. Bei den Zellen handelt es sich um eine murine Zelllinie des Lewis Lung Carcinoms. Diese Zelllinie wurde aus einem Lungentumor aus C57/BL Mäusen etabliert. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen, die Multilayer bilden können. Die Zellen werden hauptsächlich als Modell für Metastasierung und für die Untersuchung der Wirkmechanismen von Chemotherapeutika eingesetzt.

Immobilisierung von LLC-Zellen ohne BSA Passivierung

Die Ergebnisse der Messreihen mit LLC-Zellen auf einem nicht passivierten Mannanträger sind in Abb. 4.158 dargestellt.

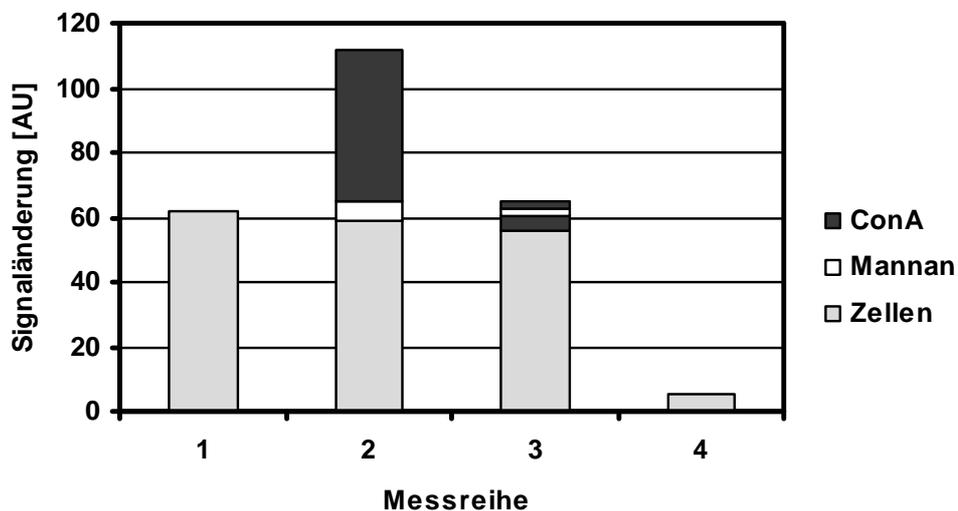


Abb. 4.158: Schichtdickenzuwächse auf einem Mannanträger ohne Passivierung mit BSA. Schichtaufbau der Assays: (1) Zellen (2) Zellen-Mannan-ConA (3) Zellen-ConA-Mannan-ConA, (4) Kontrolle: Zellen auf einer Goldoberfläche.

Um das Verhalten der LLC-Zellen auf dem Mannanträger zu beobachten, wurden in der ersten Messreihe nur Zellen auf den Messspot gegeben. Die durchschnittliche Signaländerung lag bei 62,0 AU. Aufgrund der Größe der Zellen (20 μm) wäre auch ein wesentlich größerer Wert möglich gewesen. Da die Größe bzw. Masse eines Agens unmittelbaren Einfluss auf das SPR-Messsignal hat, ist das Signal von 62,0 AU relativ zur Größe/Masse der Zelle klein.

In der zweiten Messreihe wurden LLC-Zellen immobilisiert, mit Mannan behandelt und anschließend wurde ConA zugegeben. Dabei ergab sich für die Zellen eine Signaländerung von 58,5 AU, 6,5 AU für Mannan und 46,5 AU für ConA. Im Vergleich zur ersten Messreihe ist das Messsignal für die Zellimmobilisierung in der gleichen Größenordnung. Der Wert für Mannan ist mit 6,5 AU sehr gering. Betrachtet man nur das Molekulargewicht des Mannans von durchschnittlich 100 kDa, müsste eine deutlich höhere Signaländerung gemessen werden. Eine mögliche Begründung könnten fehlende spezifische Strukturen gegenüber Mannan auf der Zelloberfläche der LLC-Zellen sein. Solche Lektine oder lektinähnliche Strukturen sind jedoch auf Krebszellen exprimiert [Gabius und Gabius, 1990; Lotan und Raz, 1988]. Roche et al. (1983) beschrieben für die LLC-Zellen eine spezifische Bindung von fluoreszenzmarkierten Neoglykoproteinderivaten, die einen hohen Gehalt an α -D-Glucoseresten aufwiesen. Diese Bindung konnte kompetitiv durch nichtmarkierte Neoglykoproteine mit einem hohen Gehalt an α -D-Glucoseresten und durch Mannan inhibiert werden. Es müssen demnach Lektine oder lektinähnliche Strukturen mit einer Spezifität gegenüber α -D-Glucoseresten auf der Zellmembran der LLC-Zellen vorhanden sein. Da D-Mannosereste aus dem Mannan strukturell ähnlich zu D-Glucose sind, kommt es zu einer schwachen Bindung auf der Zelloberfläche. Die Signaländerung der abschließenden ConA-Zugabe lag bei 46,5 AU. Vergleicht man diesen Zuwachs mit den Werten für ConA aus den Messreihen zwei und drei (zweite ConA-Zugabe) in Abb. 4.156, so lag die Bindung von ConA an das Mannan in der zweiten Messreihe (LLC-Zellen ohne BSA Passivierung) bei durchschnittlich 37 %. Eine Begründung dafür könnte die nahezu vollständige Belegung der D-Mannosereste des Mannans durch die zuckerbindenden Strukturen auf der Zellmembran der LLC-Zellen sein.

In der dritten Messreihe wurden die Zellen immobilisiert und anschließend in der Reihenfolge ConA-Mannan-ConA behandelt. Das Signal für die erste ConA-Zugabe lag bei 5,0 AU. Dieser Wert ist sehr niedrig, da ConA durch sein relativ hohes Molekulargewicht von 104 kDa ein höheres Messsignal zur Folge haben müsste. Die Begründung dafür könnten die nur sehr wenig vorhandenen oder fehlenden spezifischen Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche sein. Die Signaländerung für die Mannanzugabe (1,0 AU) entspricht nicht der hohen Affinität zu ConA wie sie in der Literatur beschrieben ist [Goldstein, 1965]. Das Signal von 2,5 AU nach der abschließenden ConA-Zugabe ist aufgrund der normalerweise hohen Affinität zum Mannan viel zu gering. Eine Ursache hierfür könnten die sich ausgebildeten Multilayer von LLC-Zellen sein. Durch dieses Verhalten der Zellen wäre es möglich, dass das

ConA der ersten Zugabe und das Mannan sich wegen fehlender Zielstrukturen auf den Zellen in den Zellzwischenräumen angelagert haben. Dadurch würden die Substanzen nur partiell für eine Interaktion mit der zweiten ConA-Zugabe zur Verfügung stehen.

Immobilisierung von LLC-Zellen mit BSA Passivierung

In weiteren Messreihen wurden die Lewis Lung Carcinom Zellen auf einem passivierten Mannanträger immobilisiert. Abb. 4.159 stellt zusammenfassend die Signaländerungen auf einem passivierten Mannanträger dar.

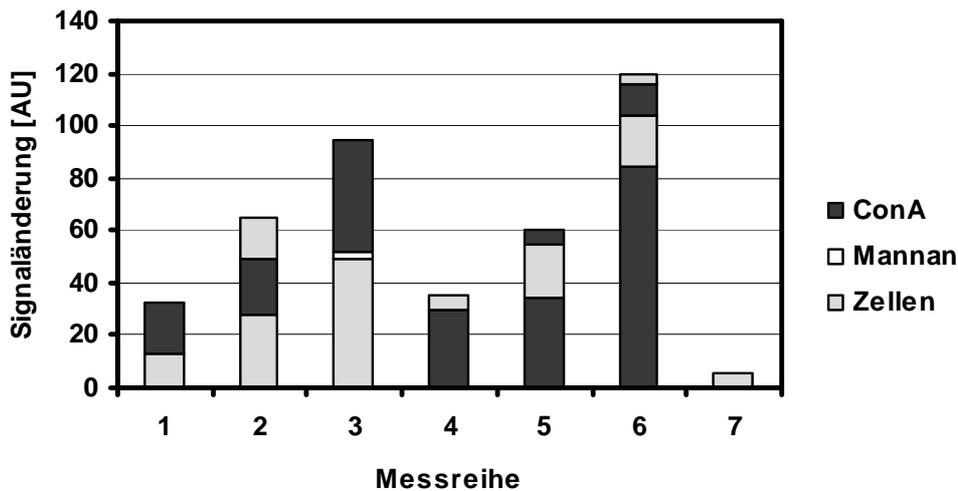


Abb. 4.159: Schichtdickenzuwächse auf einem mit BSA passivierten Mannanträger. Schichtaufbau der Assays: (1) Zellen-ConA, (2) Zellen-ConA-Zellen, (3) Zellen-Mannan-ConA, (4) ConA-Zellen, (5) ConA-Zellen-ConA, (6) ConA-Zellen-ConA-Zellen, (7) Kontrolle: Zellen auf einer Goldoberfläche.

Bei der Immobilisierung der LLC-Zellen auf einem mannanbeschichteten Träger ergaben sich Signale von 13,0 AU (Messreihe 1), 27,5 AU (Messreihe 2) und 49,5 AU (Messreihe 3). Die Interaktion der Zellen mit der Mannanoberfläche war damit in Messreihe eins um 74 % und in Messreihe zwei um 44 % niedriger, bezogen auf die Signaländerung der Zellen in Messreihe drei. Da die Lewis Lung Carcinom Zellen in der Lage sind Multilayer aufzubauen, könnte in den Messreihen eins bis drei dieses Verhalten zu den resultierenden Messsignalen geführt haben.

Die ConA-Zugabe in den ersten beiden Reihen ergab Messsignale von 19,0 und 22,0 AU. Eine Erklärung hierfür wäre eine geringe Anzahl spezifischer Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche. Auf der Zellmembranoberfläche der LLC-Zellen sind vornehmlich Glykolipide und Glykoproteine. Eine weitere Klasse von Glykokonjugaten bilden die Glykosaminoglykane (GAG). Hauptbestandteil sind Heparin und Hyaluronsäure. Je nach Metastasierungsgrad ist das Verhältnis unterschiedlich. Bei schwach metastasierenden LLC ist der Hauptbestandteil Hyaluronsäure [Toole, 1981; Glimelius und Pintar, 1981; Rollins und Culp, 1979]. Eine Struktureinheit der Hyaluronsäure besteht aus den Glucosederivaten D-Glucuronsäure und

N-Acetyl- β -D-Glucosamin, wobei sich diese nur durch eine Substitution am Kohlenstoffatom sechs (der D-Glucuronsäure) bzw. zwei (des N-Acetyl- β -D-Glucosamin) von der β -D-Glucose unterscheidet (Abb. 4.160).

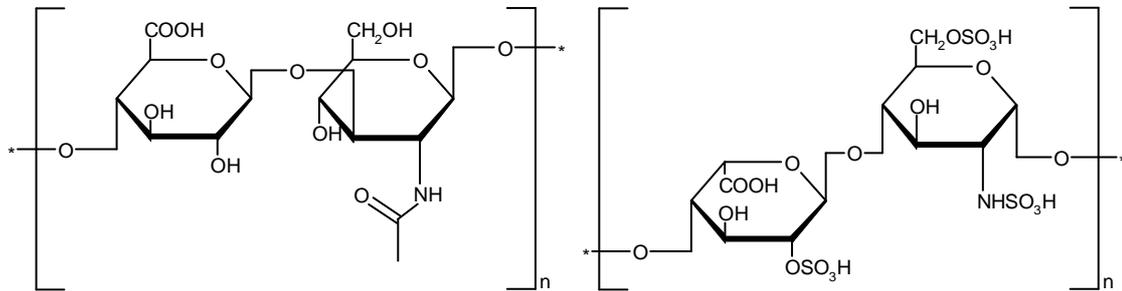


Abb. 4.160: Hyaluronsäure (links) und Heparin (rechts).

Nach Khoursandi (2000) und Seftalioglu und Dalcik (1994) besitzt ConA auch eine Affinität zu N-Acetyl-D-Glucosaminen, die jedoch schwächer ist als diejenigen zu α -D-Mannose- und α -D-Glucoseresten. Damit ist die ConA-Anlagerung auf der Zelloberfläche durch die Affinität zu N-Acetyl- β -D-Glucosamin erklärbar. Gleiches gilt für das Heparin (monomere Bausteine D-Glucosamin und D-Glucuronsäure), wobei jedoch die für die Bindung zu ConA wichtigen Hydroxylgruppen der C-Atome drei, vier und sechs [Goldstein, 1965] nur partiell frei sind. Der abschließende Schritt der zweiten Messreihe war eine weitere Zugabe von LLC-Zellen mit einem Signal von 15,0 AU. Somit ist die Signaländerung der zweiten Zellimmobilisierung um 45 % geringer als die erste. Die fehlenden spezifischen Zuckerstrukturen auf der Zellmembranoberfläche zur Bindung an ConA sind auch hier ein möglicher Grund der relativ geringen Anlagerung der LLC-Zellen. Die geringe Affinität geht auf die Glykosaminoglykane Hyaluronsäure und Heparin zurück.

Bei der Messreihe drei wurde im Gegensatz zu den ersten beiden ein Mannanschritt im Assay eingebaut. Die Signaländerung für die Mannanzugabe lag bei 0,5 AU. Dies ist, wie im Vorfeld schon erwähnt, ein äußerst niedriger Wert im Bezug auf das Molekulargewicht von durchschnittlich 100 kDa. Roche et al. (1983) beschrieben für die LLC-Zellen eine spezifische Bindung von fluoreszenzmarkierten Neoglykoproteinderivaten, die einen hohen Gehalt an α -D-Glucoseresten aufwiesen. Diese Bindung konnte unter anderem kompetitiv durch Mannan inhibiert werden. Als Schlussfolgerung müssen demnach zuckerspezifische Rezeptoren (z.B. Lektine oder lektinähnliche Strukturen) mit einer Spezifität gegenüber α -D-Glucoseresten auf der Zellmembran der LLC-Zellen vorhanden sein. Da eine strukturelle Ähnlichkeit der D-Mannosereste aus dem Mannan zu D-Glucose vorhanden ist, kommt es zu einer sehr schwachen Bindung auf der Zelloberfläche.

In den Messreihen vier bis sechs wurde als erstes ConA auf den passivierten mannanbeschichteten Träger gegeben. Die Signaländerungen lagen bei 29,5 AU (Messreihe 4), 34,0 AU (Messreihe 5) und 84,0 AU (Messreihe 6). Auffallend ist der

Unterschied in der Höhe des ConA-Messsignals zwischen den Messreihen vier und fünf zu der sechsten. Diese lagen bei 35 % bzw. 40 % des Messsignals von ConA der sechsten Messreihe. Ein möglicher Grund könnte in einer unzureichenden Mannanbeschichtung der Goldträger liegen. Nicht alle Bereiche des Trägers sind vollständig mit Mannan beschichtet und könnten somit auch keine spezifischen Bindungen mit ConA eingehen. Die Werte für die Zugabe der LLC-Zellen lagen in den Messreihen vier bis sechs bei 5,5 AU, 21,0 AU und 19,5 AU (erste Zellzugabe Messreihe 6).

Vergleicht man Messreihe vier und fünf, so beträgt die Messsignaländerung für die Zellzugabe in der vierten Reihe 26 % des Zellsignals der fünften. Da die Signale für die ConA-Immobilisierung der beiden Reihen in der gleichen Größenordnung liegen, sollten die Messsignale für die Zellen ebenfalls identisch sein. Eine mögliche Erklärung wäre die Ausbildung von Multilayern, die ein höheres Messsignal zur Folge hätten. Eine weitere Begründung könnte in der Zellcharge (Zellpassage) liegen. Da die Messreihen nicht mit der gleichen Charge von LLC-Zellen durchgeführt wurden, weil die Messungen an unterschiedlichen Tagen erfolgten, könnten während der Kultivierung der Zellen Veränderungen der Zelloberflächenstrukturen aufgetreten sein. Eine weitere Erklärung der niedrigen Messsignale durch die Zellen könnte die Interaktion der LLC-Zellen mit dem Lektin ConA sein. ConA könnte transformierenden Einfluss auf die Morphologie und das Wachstum der Zellen haben und evtl. sogar Apoptose auslösen. Die Oberflächenkohlenhydrate von Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation ihrer Entwicklung, in der Gewebshomöostase und in der zellulären Signalübertragung. ConA interagiert mit Mannoseresten der Zelloberfläche unter Quervernetzung [Kulkarni und McCulloch, 1995]. Dies ist möglich aufgrund der Struktur des ConA, welches ein Tetramer darstellt. In jeder ConA Untereinheit befindet sich ein Mangan- und Calcium-Ion, welche für die Bindung von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche verantwortlich sind [Reeke et al., 1974]. Durch diese Einflüsse könnten die Zellen soweit in ihrer Struktur verändert worden sein, dass nur noch wenige spezifische Strukturen zur Bindung an ConA zur Verfügung standen.

Die nochmalige Zugabe von ConA in der Messreihe fünf ergab ein Signal von 5,0 AU. Dieser Wert korreliert mit den wenig vorhandenen spezifischen Lektinbindungsstellen auf der Oberfläche der LLC-Zellen. Die Werte der zweiten ConA-Zugabe betragen jedoch nur 24 % der durchschnittlichen ConA-Signaländerung der Messreihen eins und zwei. Ein Grund dafür könnte im Schichtaufbau der Assays liegen. Bei den Reihen eins und zwei werden zuerst die Zellen immobilisiert und dann erfolgt die ConA-Zugabe. In der Messreihe fünf sind diese Schritte vertauscht. Die LLC-Zellen haben bis zur zweiten ConA-Zugabe Zeit, sich morphologisch so zu verändern, dass kaum noch Bindungsstellen für das ConA der zweiten Zugabe vorhanden sind. Eine weitere mögliche Begründung für das niedrige Messsignal der zweiten ConA-Zugabe könnte, wie schon erwähnt, die Ausbildung von Zellmultilayern sein. Theoretisch möglich wäre ebenfalls das „Versinken“ des ConA in den Zellzwischenräumen der Multilayer. Dies würde das relativ geringe Signal für die zweite ConA-Zugabe erklären. Die Theorie der

morphologischen Veränderung der Zellen widerspricht dem Signal der zweiten ConA-Zugabe der sechsten Messreihe für die sich eine Signaländerung von 12,5 AU ergab. Die Höhe des Messsignals könnte hier auf einen Zellmonolayer zurückzuführen sein, bei dem das ConA nicht in die Zellzwischenräume „versinken“ kann. Die zweite Zellzugabe der sechsten Messreihe ergab ein geringes Signal von 4,0 AU und ist mit den wenig vorhandenen für ConA spezifischen Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche zu erklären.

Zusammenfassung

Bei der Immobilisierung der LLC-Zellen auf einem nicht passivierten bzw. passivierten Mannanträger sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Liegt der durchschnittliche Signalwert der LLC-Zellen auf dem nicht passivierten Mannanträger bei 59,0 AU, so sind es bei dem BSA passivierten 30,0 AU. Die nicht geblockten freien unspezifischen Bindungsstellen dürften das höhere Messsignal begründen.

Vergleicht man die Kurvengeometrien, so zeigten die Bindungskurven der Zellen in den Versuchen ohne BSA, wie in den Messreihen mit den NCI-H125-Zellen, einen steilen Anstieg (gute Anlagerung) in der Assoziationsphase. Der Kurvenverlauf in den Messreihen auf einer passivierten Mannanoberfläche war dagegen flacher (Anlagerung nicht so gut, Sedimentationseffekte).

Aufgrund der Kurvengeometrie und den Signalzuwächsen scheint es so zu sein, dass auch bei LLC-Zellen die Immobilisierung auf einer nicht passivierten Oberfläche die besseren Ergebnisse geliefert hat. Dass sowohl spezifische und unspezifische Bindungsstellen für die Zellimmobilisierung zur Verfügung standen, ist zu bedenken. Da jedoch nur spezifische Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Mannanoberfläche erfasst werden sollen, muss in weiteren Messreihen überprüft werden, ob eine BSA Passivierung der Oberfläche sinnvoll ist.

Betrachtet man die Einzelwerte der Messsignale für die Immobilisierung der Zellen auf einem nicht passivierten gegenüber einem passivierten Mannanträger, so ergibt sich eine größere Streuung der Messsignale auf der passivierten Oberfläche. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die teilweise Ausbildung von Zellmultilayern sein. Aber auch Unterschiede in der Entwicklung der Zellen während der Kultivierung können nicht ausgeschlossen werden. Die Interaktion von Mannan mit LLC-Zellen lag bei 6,5 AU auf einem nicht passivierten Träger und bei 0,5 AU auf einem passivierten. Diese geringe Affinität ist auf die zuckerbindenden Strukturen auf der Zelloberfläche zurückzuführen, die spezifisch für α -D-Glucosereste sind.

Ein möglicher transformierender Effekt von ConA auf LLC-Zellen konnte im Gegensatz zu NCI-H125-Zellen nicht gezeigt werden. Die LLC-Zellen waren nach der Immobilisierung auf einer Mannanoberfläche und Behandlung mit ConA in ihrem Erscheinungsbild nicht verändert und bildeten zusammenhängende Zellrasen aus (vgl. Kapitel 3.2.3).

4.3 Entwicklung eines Mistellektin I-(MLI)-Assays auf SPR-Basis

Mistelextrakte werden seit Jahrhunderten therapeutisch genutzt. Seit Anfang des letzten Jahrhunderts werden Mistelpräparate zur Krebstherapie mit unterschiedlichem Erfolg angewandt [Bocci, 1993; Gabius et al., 1993; Gabius und Gabius, 1994; Ganguly und Das, 1994]. Hajto et al. (1989, 1990) konnten zeigen, dass die therapeutischen Effekte insbesondere durch sogenannte Mistellektine (Viscumine, *Viscum album* Agglutinine, (VAA)) vermittelt werden. Es wird neben einer zytotoxischen Wirkung heute insbesondere eine (unspezifische) Immunstimulation diskutiert, deren positive Effekte zur begleitenden Therapie und zur Nachsorge von Tumorpatienten ausgenutzt werden. Eine Steigerung der Lebensqualität bei solchen Patienten wird möglicherweise durch die Ausschüttung körpereigener Endorphine vermittelt [Heiny und Beuth, 1994].

Im Hinblick auf die Detektion von Mistellektin I in Arzneimitteln, Blut und Sera sollte ein Assay zur Detektion des MLI unter Zuhilfenahme der SPR entwickelt werden. Dabei ist es wichtig, dass die Kohlenhydratbindungsstellen des MLI nicht durch die Antikörper besetzt werden. Tonevitsky et al. (1999) führten die Bestimmung der Heterogenität der Lektine in Mistelpräparaten mit den monoklonalen Anti-ML-A-Ketten-Antikörpern MNA4 und MNA9 durch. Sie konnten zeigen, dass die Antigen-Determinanten der Mistellektine, die von den spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannt werden, keine Kohlenhydratstrukturen enthalten.

4.3.1 MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9

Für die erste Versuchsreihe wurde rekombinantes Mistellektin I sowie die spezifischen Antikörper MNA4 und MNA9 der Firma Probiogen verwendet. Der MLI Immunoassay wurde als sogenannter Sandwich-Assay durchgeführt. Dabei wird ein Antikörper auf dem C₁₈-beschichteten Goldträger immobilisiert und dient als Fängerantikörper. Nach Bindung des Antigens (rMLI) kann der zweite Antikörper ebenfalls an dieses binden bzw. dieses detektieren. Es standen zwei Möglichkeiten für den Sandwich-Assay zur Auswahl. Im ersten Fall ist der monoklonale Antikörper MNA4 Fänger- und MNA9 der Detektionsantikörper. Im zweiten Fall findet der Sandwich Aufbau in umgekehrter Reihenfolge statt.

MNA4 als Fängerantikörper und MNA9 als Detektionsantikörper

Für die erste Variante sind in Abb. 4.161 die Ergebnisse des MLI Immunoassays zusammengefasst.

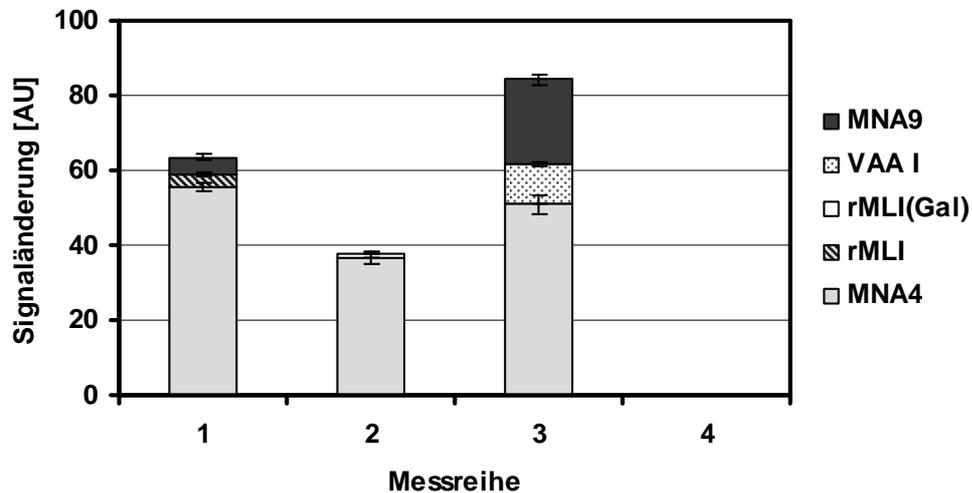


Abb. 4.161: Signaländerungen des MLI Immunoassays in Sandwichform. Fängerantikörper ist der monoklonale Antikörper MNA4, Detektionsantikörper ist der monoklonale Antikörper MNA9. Messreihe 1 wurde mit rMLI, Messreihe 2 mit galactosestabilisiertem rMLI und Messreihe 3 mit natürlichem *Viscum album* I Agglutinin durchgeführt. In Messreihe 4 erfolgte die Messung ohne rMLI (Kontrolle).

Die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers MNA4 ergab in den drei Messreihen Signaländerungen zwischen $36,7 \pm 1,5$ und $55,7 \pm 1,2$ AU. Die Signaländerung für den Antikörper MNA4 war in Reihe eins und drei nahezu identisch ($55,7 \pm 1,2$ AU; $51,0 \pm 2,6$ AU). Abweichend ist der Wert für den Fängerantikörper MNA4 in der Messreihe zwei. Die Signaländerung betrug nur 66 % des Messwertes aus Messreihe eins bzw. 72 % des Wertes aus Messreihe drei. Da die Konzentration des Antikörpers bei allen Versuchsreihen gleich war, hätte die Immobilisierung auf dem C_{18} -beschichteten Goldträger identische Messsignale ergeben müssen.

Dass der Wert der zweiten Messreihe nicht in der Größenordnung der anderen beiden Reihen liegt, kann an der unvollständigen hydrophoben Beschichtung des Goldträgers liegen. Für die hydrophobe Oberfläche wird Octadecyltrimethoxysilan eingesetzt. Durch Polymerisation des Trimethoxysilans während der Beschichtung könnte sich eine zu dicke oder fehlerhafte C_{18} -Alkylschicht auf der Oberfläche gebildet haben, mit der Folge der schlechteren sterischen Ausrichtung der Alkylreste. Brousseau et al. (1998) untersuchten intensiv die Polymerisation von Octadecyltrimethoxysilan an der Grenzfläche Wasser/Luft. Die Polymerisation kann nur unter Luftsauerstoff stattfinden. Während der C_{18} -Alkylbeschichtung besteht jedoch kein Kontakt zur Luft, da der Prozess in einer einprozentigen Lösung von Octadecyltrimethoxysilan in Toluol stattfindet. Somit wäre diese mögliche Erklärung der niedrigeren Signaländerung des Fängerantikörpers MNA4 in Messreihe zwei auszuschließen. Dass eine Polymerisation

des Octadecyltrimethoxysilans vor Einsatz als Beschichtungsreagenz stattgefunden hat, ist wahrscheinlicher. Dadurch wäre die Alkylbeschichtung der Goldträger unvollständig bzw. schadhaft gewesen und würde den geringeren Signalzuwachs des Fängerantikörpers MNA4 begründen.

Thomsen et al. (2005) konnten unterschiedliche Ausrichtungen der C₁₈-Alkylreste in Abhängigkeit von der Zeit durch periodisches Auftragen des Octadecyltrimethoxysilans auf Aluminiumoxid feststellen. Diese Möglichkeit könnte auch auf einem Goldträger zum Tragen gekommen sein und für den geringeren Signalzuwachs des Fängerantikörpers verantwortlich sein.

Bei der ersten Messreihe wurde das rekombinante MLI (rMLI) in PBS-Puffer zugegeben. Das erhaltene Messsignal von $3,3 \pm 0,6$ AU war sehr gering. Das Molekulargewicht des rMLI mit 56 kDa liegt größenordnungsmäßig in einem Bereich, wo es allein aufgrund der Größe ein höheres Signal generieren müsste. Die Begründung für das niedrige Messsignal liegt somit in der sehr geringen Affinität des rMLI zu dem Antikörper MNA4.

Um die Signaländerung des rMLI in der zweiten Messreihe zu verbessern, musste das Lektin stabilisiert werden. Dies ist mit Galactose und Lactose möglich [Mikeska et al., 2005]. MLI ist ein galactosespezifisches Lektin aus zwei Untereinheiten, der A- und der B-Kette. Die Lektinaktivität und -spezifität ist der B-Kette zuzuordnen, die A-Kette weist rRNA-N-Glykosidaseaktivität auf. Aufgrund dieser Eigenschaft gehört MLI zu den Ribosomen inaktivierenden Proteinen des Typ 2 [Franz et al., 1981; Krauspenhaar et al., 1999; Luther et al. 1980; Mengs et al., 2002; Niwa et al., 2003; Olsnes et al., 1982; Schink et al., 1992; Soler et al., 1996]. Die B-Kette von MLI besitzt zwei unterschiedlich stark affine Zuckerbindungsstellen spezifisch für D-Galactose und galactosidenthaltene Di- und Oligosaccharide, wobei die unmodifizierten Hydroxylgruppen am C2, C3 und C4 des D-Galactopyranosylrings essentiell für die Interaktion zwischen Zucker und Lektin sind [Franz et al., 1981; Luther et al., 1980; Ziska und Franz, 1981; Lee et al., 1992]. Anscheinend konnte das rMLI nicht mit 50 mM Galactose stabilisiert werden, da womöglich ein Teil der Zuckerbindungsstellen nicht zugänglich war. Der gewünschte Erfolg dieser Maßnahme blieb aus und für das rMLI resultierte ein noch geringeres Signal (1,0 AU) als in der Messreihe eins.

Rekombinantes MLI ist aus rMLA und rMLB reassoziert und hat ein Molekulargewicht von 56 kDa, wobei die A-Kette 26 kDa und die B-Kette 30 kDa aufweist. Beide sind im Gegensatz zu natürlichem MLI nicht glykosiliert [Eck et al., 1999_{a,b}; Schöffski et al., 2004]. Ein möglicher Grund für das niedrige Messsignal des rMLI in den Versuchsreihen eins und zwei kann eine nicht ordnungsgemäße Reassoziierung des rMLA und rMLB gewesen sein. Hierbei könnten die Antigen determinanten für die monoklonalen Antikörper MNA4 und MNA9 nicht mehr zugänglich sein. Dies könnte aufgrund falscher Faltung der Proteine zustande kommen. Eine weitere Möglichkeit für das geringe Signal des rMLI könnte in dem monoklonalen Antikörper MNA4 begründet

sein. Auch hier bestünde die Möglichkeit, dass Fehler in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Antikörpers vorliegen.

Der letzte Schritt in dieser Form des Sandwich-Assays war in Messreihe eins und zwei die Zugabe des Detektionsantikörpers MNA9. Die Signaländerung betrug $4,5 \pm 0,8$ AU für Messreihe eins. In der Messreihe zwei konnte keine Messsignaländerung für den Detektionsantikörper MNA9 festgestellt werden. Die möglichen Ursachen für diese geringen Werte in beiden Messreihen könnten einerseits beim rMLI liegen, andererseits beim Antikörper.

Vergleicht man hierzu die Messreihen des Sandwich-Assays in umgekehrter Reihenfolge (siehe Diagramm Abb. 4.162), bei denen der monoklonale Antikörper MNA9 als Fängerantikörper diente, so lag der durchschnittliche Zuwachs auf dem C₁₈-beschichteten Goldträger bei $55,0 \pm 1,7$ AU. Diese Signaländerung liegt in einer für Antikörper typischen Größenordnung, so dass davon auszugehen ist, dass der Antikörper MNA9 in seiner räumlichen Anordnung nicht beeinträchtigt ist. Gleiches gilt für den Antikörper MNA4, der als Fängerantikörper (Abb. 4.161, Messreihe 1) eine antikörpertypische Signaländerung hervorrief ($55,7 \pm 1,2$ AU), jedoch als Detektionsantikörper (Abb. 4.162, Messreihe 1) ebenfalls einen niedrigen Signalzuwachs generierte. Somit müsste der Grund für das niedrige Messsignal des Detektionsantikörpers MNA9 bzw. MNA4 beim rMLI liegen.

Wie schon ausführlich diskutiert, kommen als Begründung unterschiedliche Faktoren in Frage. Die Theorie, dass es Probleme bei der Rekonstitution (Renaturierung), und evtl. der Reassoziierung der rekombinanten A- und B-Kette (rMLA und rMLB) des Mistellektins I gab, ist sehr wahrscheinlich. Die Epitope sind somit nur eingeschränkt für die Antikörper zugänglich. Im Fall der Messreihe zwei, bei der das rMLI mit Galactose stabilisiert wurde, fand keine Bindung des Detektionsantikörpers MNA9 statt. Rückschließend können die antigenen Determinanten nicht zugänglich gewesen sein bzw. waren durch die zur Stabilisierung eingesetzte Galactose besetzt.

In Messreihe drei wurde als Vergleich zum rMLI natürliches *Viscum album* I Agglutinin (VAA I) eingesetzt. Das Signal lag bei $10,7 \pm 0,6$ AU und lag um 224 % höher als das Messsignal für rMLI aus Messreihe eins. Eine mögliche Erklärung für das relativ hohe Messsignal wäre die Gewinnung des natürlichen Mistellektins. Hierbei muss keine Rekonstitution des Proteins durchgeführt werden. Somit scheint das VAA I strukturell in Messreihe drei nicht beeinträchtigt gewesen zu sein, so dass eine relativ hohe Affinität zu den monoklonalen Antikörpern MNA4 und MNA9 bestand. Die Signaländerung nach Zugabe des Detektionsantikörpers MNA9 lag bei $22,5 \pm 1,2$ AU.

MNA9 als Fängerantikörper und MNA4 als Detektionsantikörper

Für die zweite Variante des MLI-Immunoassays, bei dem der monoklonale Antikörper MNA9 Fängerantikörper und der monoklonale Antikörper MNA4 Detektionsantikörper war, sind die Ergebnisse in Abb. 4.162 zusammengefasst.

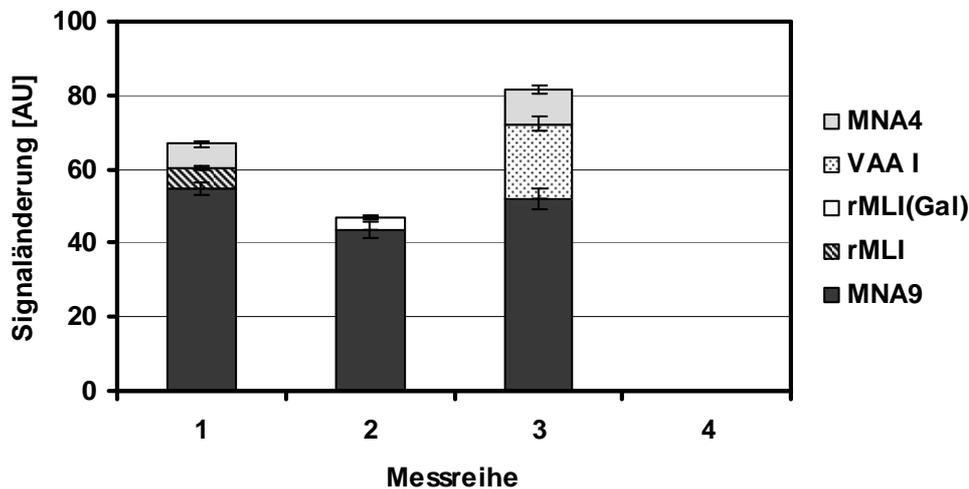


Abb. 4.162: Signaländerungen des MLI Immunoassays in Sandwichform. Fängerantikörper ist der monoklonale Antikörper MNA9, Detektionsantikörper ist der monoklonale Antikörper MNA4. Messreihe 1 wurde mit rMLI, Messreihe 2 mit galactosestabilisiertem rMLI und Messreihe 3 mit natürlichem *Viscum l Agglutinin* durchgeführt. In Messreihe 4 erfolgte die Messung ohne rMLI (Kontrolle).

Der durchschnittliche Zuwachs auf dem C₁₈-beschichteten Goldträger betrug in den Messreihen eins bis drei für den MNA9 Fängerantikörper $50,2 \pm 2,1$ AU, was einer antikörpertypischen Signaländerung entspricht.

In der ersten Messreihe lag das Signal für rMLI nach der Interaktion mit dem Fängerantikörper MNA9 bei $5,3 \pm 0,6$ AU. Auch hier war das Signal sehr gering. Es lag um 66 % höher als das rMLI Signal nach der Interaktion mit dem monoklonalen Antikörper MNA4 als Fängerantikörper (Abb. 4.161, Messreihe 1). Somit scheint der Antikörper MNA9 besser als Fängerantikörper zu agieren. Die Signaländerung nach der Zugabe des Detektionsantikörpers MNA4 betrug $6,5 \pm 0,6$ AU und ist 44 % höher als das Signal der Interaktion des Detektionsantikörpers MNA9 mit dem rMLI (Abb. 4.161, Messreihe 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Antikörper MNA4 als Detektionsantikörper besser geeignet ist.

In der zweiten Reihe wurde das rMLI galactosestabilisiert eingesetzt und ergab eine Signaländerung von $3,3 \pm 0,6$ AU. Dies war um 230 % höher als das Signal für das galactosestabilisierte rMLI nach der Interaktion mit dem Fängerantikörper MNA4 (Abb. 4.161, Messreihe 2). Ein Signal nach Zugabe des Detektionsantikörpers MNA4 konnte nicht verzeichnet werden.

Der Grund für die bessere Interaktion mit dem Antikörper MNA9 könnte in einer fast vollständigen Belegung der Zuckerbindungsstellen und somit einer besseren Stabilisierung des rMLI durch Galactose liegen. Durch die Stabilisierung des rMLI wäre das Epitop für den Fängerantikörper MNA9 besser erreichbar. Aufgrund der unterschiedlichen Epitopspezifität der Antikörper MNA9 und MNA4, könnte sich keine Signaländerung des Detektionsantikörpers MNA4 gezeigt haben, da das für ihn spezifische Epitop anscheinend nicht zugänglich war.

Messreihe drei wurde mit dem natürlichen *Viscum album I* Agglutinin (VAA I) durchgeführt und ergab ein Signal von $20,3 \pm 2,1$ AU bei der Interaktion mit dem Fängerantikörper MNA9. Diese Signaländerung war um 90 % höher als in Messreihe drei in Abb. 4.161. Eine mögliche Erklärung könnte die bessere Ausrichtung des monoklonalen Antikörpers MNA9 als Fängerantikörper auf der C₁₈-Oberfläche sein. Somit wären die Epitope des VAA I besser erreichbar. Die Zugabe des Detektionsantikörpers MNA4 ergab ein Signal von $9,5 \pm 1,1$ AU. Dieser Wert entsprach nur 42 % des Messsignals des Detektionsantikörpers MNA9 aus Messreihe 3 in Abb. 4.161. Grund hierfür könnten Fehler in der Sekundärstruktur des monoklonalen Antikörpers MNA4 sein, die sich in einer verminderten Zugänglichkeit des Paratops zeigen würden.

Für das natürliche *Viscum album I* Agglutinin ist der monoklonale Antikörper MNA9 der bessere Detektionsantikörper, was auf eine bessere Ausrichtung und Erreichbarkeit des Epitops auf der A-Kette des VAA I schließen lässt.

Um sicherzustellen, dass die monoklonalen Antikörper MNA4 und MNA9 nicht gegeneinander eine Affinität aufweisen, wurden als Kontrollversuche die Sandwich-Assays ohne das Antigen durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine Signaländerungen für die Detektionsantikörper.

Zusammenfassung

Die Messreihen haben leider nicht die gewünschten Ergebnisse geliefert und es konnten keine Bestimmungs- und Nachweisgrenze des MLI Immunoassays auf der SPR-Plattform ermittelt werden. Gründe hierfür könnten in der Sekundärstruktur sowohl des rMLI als auch in der der monoklonalen Antikörper MNA4 und MNA9 liegen.

4.3.2 MLI-Assay mit rMLI und monoklonalen Antikörpern 5F5 und 5H8

Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit den monoklonalen Antikörpern MNA4, MNA9 und dem rMLI (Firma Probiogen) waren nicht zufriedenstellend. In weiteren Messreihen wurde mit den monoklonalen Antikörpern 5H8, 5F5 und dem rMLI der Firma Sifin gearbeitet. Auch hier sollte der MLI Immunoassay in Form eines Sandwichaufbaus durchgeführt werden. Zu Beginn wurde das Verhalten der beiden monoklonalen Antikörper 5H8 und 5F5 als Fänger- bzw. Detektionsantikörper getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.163 dargestellt.

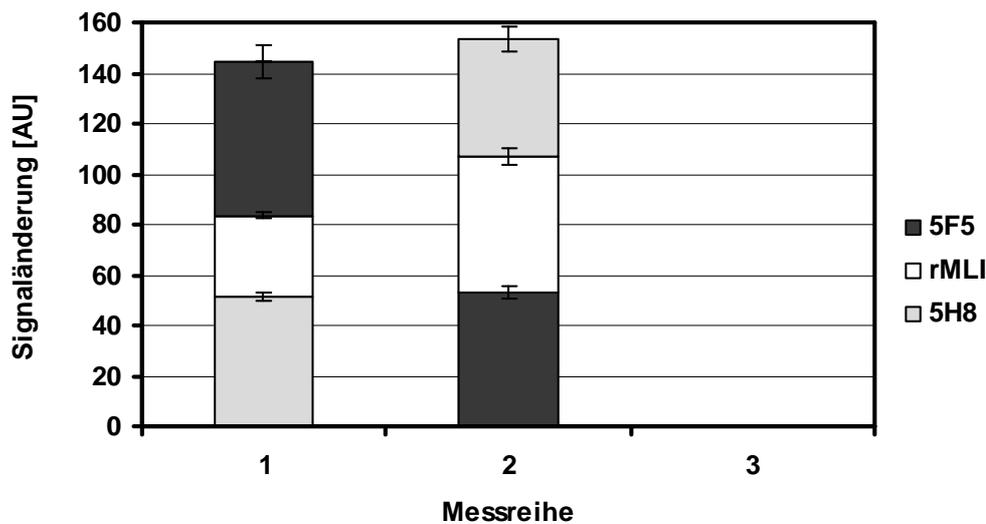


Abb. 4.163: Signaländerungen des MLI Immunoassays in Sandwichform auf einem C_{18} -beschichteten Goldträger. In Messreihe 1 war 5H8 der Fängerantikörper und 5F5 Detektionsantikörper, in Messreihe 2 ist 5F5 Fängerantikörper und 5H8 der Detektionsantikörper. In Messreihe 3 wurde die Messung ohne rMLI durchgeführt (Kontrolle).

Die Signaländerungen in der ersten Messreihe waren für den 5H8 Fängerantikörper $51,3 \pm 1,5$ AU, das rMLI $32,2 \pm 1,3$ AU und für den 5F5 Detektionsantikörper $61,0 \pm 6,2$ AU. In der zweiten Messreihe betragen die Signale des MLI-Sandwich-Assays in umgekehrter Reihenfolge: 5F5 Fängerantikörper $53,2 \pm 2,3$ AU, rMLI $53,7 \pm 2,9$ AU und 5H8 Detektionsantikörper $46,3 \pm 4,9$ AU.

Der Vergleich der Ergebnisse aus beiden Messreihen führte zu der Entscheidung, dass der monoklonale Antikörper 5F5 als Detektionsantikörper und der monoklonale Antikörper 5H8 als Fängerantikörper fungiert. Der Grund hierfür liegt in dem höheren Messsignal, welches der 5F5 Antikörper als Detektionsantikörper generierte. Dies war um 32 % höher als das Signal für den Detektionsantikörper 5H8 aus Messreihe zwei.

Das rMLI ergab eine wesentlich höhere Signaländerung als in den zuvor beschriebenen Versuchsreihen (vgl. Kapitel 4.3.1). Die Begründung liegt vermutlich in der Struktur des rMLI. Dieses besteht aus zwei Untereinheiten, der A-Kette und der B-Kette. Die Molekulargewichte betragen ca. 26 kDa (A-Kette) und ca. 30 kDa

(B-Kette). Beide sind im Gegensatz zum natürlichen MLI nicht glykosiliert. Das Molekulargewicht des reassozierten Proteins beträgt 56 kDa [Eck et al., 1999_{a,b}; Schöffski et al., 2004]. Bei der Gewinnung des rekombinanten Mistellektin (rMLI) müssen rMLA und rMLB wieder zusammengeführt werden, was unter Umständen zu Problemen in der Endstruktur des rMLI Proteins führen kann. Dies hätte zur Folge, dass sich die Sekundär- und Tertiärstruktur nicht richtig ausbilden und die Antigen-Determinanten für die monoklonalen Antikörper nicht zugänglich wären (vgl. Kapitel 4.3.1). Aufgrund der relativ hohen Signalwerte für das rMLI, können Fehler in der Sekundär- und Tertiärstruktur ausgeschlossen werden. Die monoklonalen Antikörper 5H8 und 5F5 können somit gut an die spezifischen Antigen-Determinanten der A-Kette des rMLI binden [Jäggi et al., 1993].

Als Kontrollversuche wurde der MLI-Assay ohne rMLI durchgeführt. Hierbei ergaben sich für die monoklonalen Antikörper 5F5 und 5H8 in der Funktion des Detektionsantikörpers keine Signaländerungen.

4.3.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze des MLI-Assays

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der monoklonale Antikörper 5F5 als Detektionsantikörper ein größeres Signal als der monoklonale Antikörper 5H8 generiert, wurde die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze mit 5H8 als Fänger- und 5F5 als Detektionsantikörper durchgeführt.

Die Nachweisgrenze liegt für das rekombinante Mistellektin I bei 0,25 µg/ml (entsprechend 2,0 AU). Die Nachweisgrenze entspricht dem dreifachen Wert des Grundrauschens.

Die Bestimmungsgrenze ist der 10-fache Wert des Grundrauschens und liegt theoretisch bei 4,0 AU. Für den MLI-Assay liegt die Bestimmungsgrenze bei 0,5 µg/ml (entsprechend 7,0 AU). Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,25 und 2,5 µg/ml (vgl. Abb. 3.110).

Diese Werte sind im Gegensatz zu einem ELISA Testsystem für rMLI relativ hoch. Für das rMLI-ELISA-System beträgt die Nachweisgrenze 3 ng/ml und die Bestimmungsgrenze 10 ng/ml. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 3 und 30 ng/ml [Tonevitsky et al., 1999].

Um die Sensitivität des rMLI Immunassays auf der SPR-Plattform zu erhöhen, muss das Messsignal vergrößert werden. Hierzu können folgende Verstärkungsmethoden gewählt werden: Zum einen kann die Masse durch Konjugate mit schweren Substanzen vergrößert werden, zum anderen kann die Orientierung (Ausrichtung) und Dichte bei der Immobilisierung der Antikörper auf der biosensitiven Schicht verbessert werden.

4.4 Bioabbaubarkeitsstudie von Polyethylencarbonat durch Makrophagen

4.4.1 PEC-Polymerabbau auf der SPI-Messplattform

Mit Hilfe der SPI sollte der Schichtdickenabbau von Polyethylencarbonat in Korrelation zur Zeit und zur verwendeten Zellzahl ermittelt werden.

Bei diesen Bioabbaubarkeitsstudien wurden murine Makrophagen der Zelllinie J774A.1 verwendet. Als Träger dienten PEC-beschichtete SPI-Glasträger.

Immobilisierung von Makrophagen in situ auf einem PEC-Polymerfilm

Die erste Strategie sollte eine *in situ* Immobilisierung der Makrophagen sein; das heißt, die Zellen sollten während einer Messreihe auf der Polymeroberfläche immobilisiert werden.

Die Flussrate wurde im Verlauf der Messreihen weitestgehend optimiert. Begonnen wurde mit einem Fluss von 144 $\mu\text{l}/\text{min}$. Hier zeigte sich sehr schnell, dass die Scherkräfte, die in der Messzelle herrschten, viel zu groß waren und somit die Makrophagen nicht auf dem PEC-beschichteten Glasträger immobilisiert werden konnten. Betrachtet man den Verlauf eines Sensorgramms vor der Zugabe der Makrophagen, so kann schon ein Anstieg bzw. ein Schichtdickenzuwachs verzeichnet werden (vgl. Kapitel 3.4.4). Dieser ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Polymercoating zurückzuführen. Der Polymerfilm wird bei den Scherkräften, wie sie in der Messzelle herrschen, von der Glasoberfläche desorbiert (Abb. 4.164).

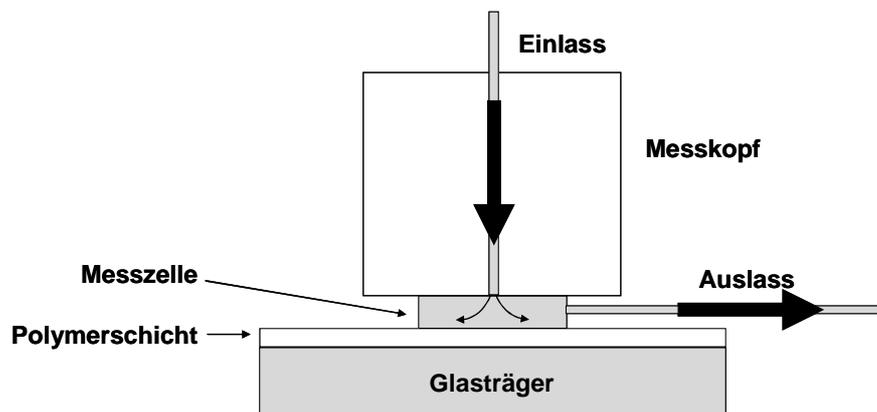


Abb. 4.164: Schematische Darstellung des Querschnitts der SPI-Messzelle. Durch die Strömungsverhältnisse in einem Winkel von 90° wirken auf die polymerbeschichtete Trägeroberfläche Scherkräfte, die zur Desorption des Polymerfilms führen können.

Die Flussrate wurde daraufhin auf einen Wert von 36 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Jedoch brachte dieses auch keine Verbesserung bzgl. der Ablösung des Polymerfilms. Ein weiteres Problem bestand im FKS, welches auf einem PEC-beschichteten Glasträger einen Schichtdickenzuwachs erzeugte (vgl. Kapitel 3.4.4, Abb. 3.117).

Die *in situ* Immobilisierung der Makrophagen hat nicht funktioniert. Ein Grund dafür könnten die Scherkräfte beim kontinuierlichen Durchfluss sein. Auch bei geringeren Flussraten zeigte sich keine Anlagerung der Makrophagen. Da es sich um adhärente Zellen handelt, benötigen die Makrophagen eine gewisse Zeit um Adhärenz zu erlangen. Dies ist mit einem Durchflusssystem nicht zu erreichen.

Prä-Immobilisierung von Makrophagen auf einem PEC-Polymerfilm

Ausgehend von der Durchflussimmobilisierung der Zellen wurde die Immobilisierungsstrategie dahingehend verändert, dass die Makrophagen vor der eigentlichen Messung auf dem polymerbeschichteten Glaträger kultiviert wurden. Dazu wurde der PEC-beschichtete SPI-Glaträger in einer Petrischale direkt mit Makrophagen kultiviert. Hierbei musste solange gewartet werden, bis die Zellen auf der PEC-Oberfläche Adhärenz zeigten. Daraufhin wurde der mit Makrophagen kultivierte Träger in das SPI-Gerät zur Messung eingesetzt. Dieser Schritt durfte nicht zu viel Zeit in Anspruch nehmen, da die Gefahr des Austrocknens der Makrophagen bestand. Dem Kulturmedium (DMEM) wurde kein FKS zugegeben, um einen Schichtdickenzuwachs auf dem PEC-Polymerfilm durch das FKS zu vermeiden.

Die maximale Schichtdickenabnahme lag in einem Bereich von -0,3 bis -68 nm (vgl. Abb. 3.121). Die hohen Unterschiede in der Schichtdickenabnahme haben einen wesentlichen Grund in der Messeinheit bzw. der Messzelle des SPI-Gerätes. Der mit Makrophagen kultivierte polymerbeschichtete Glaträger wurde mit Hilfe einer Kunststoffdichtung für den Einbau in den Messkopf des SPI-Gerätes vorbereitet. Für die Dichtung ist kein normierter Bereich zum Aufbringen auf den Träger vorgesehen. Die Messzellendichtung sollte relativ in der Mitte des beschichteten Glaträgers aufgebracht werden. Ist dies nicht der Fall, ist eine Messung nur schlecht bzw. gar nicht durchzuführen.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Schichtdickenabnahmen, ist die Tatsache, dass nicht genau festgestellt werden konnte, wie viele Makrophagen sich auf dem Messspot nach Aufbringen der Messdichtung befanden. Es konnte somit nur eine Aussage darüber gemacht werden, ob das Polymer abgebaut wird oder nicht. Die fehlende Information über die tatsächliche Zellkonzentration auf dem Messspot könnte auch die Erklärung für die sehr unterschiedlichen Zeitpunkte des maximalen Polymerabbaus sein.

Eine Quantifizierung des Polymerabbaus war so nicht möglich. Eine Schichtdickenzunahme konnte nach dem maximalen Schichtdickenabbau beobachtet werden. Dies kann auf das Ablösen des Polymers zurückzuführen sein. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da bei den Messreihen nur für den Mediumwechsel in der Messkammer die Pumpe stündlich für eine Minute mit einem Fluss von 18 µl/min eingeschaltet wurde.

Zusammenfassung

Die beiden unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien für die Makrophagen der Zelllinie J774A.1 haben in den Versuchsreihen mit der Spektralphaseninterferenz nur unzureichende Ergebnisse geliefert. Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass ein Durchflusssystem zur Immobilisierung von J774A.1 Makrophagen nicht geeignet ist. Die Gefahr der Desorption des Polymerfilms vom Glasträger ist dabei zu hoch. Auch durch eine sehr geringe Flussrate können die Makrophagen in ihrer Adhärenz beeinflusst werden und es kann zu Veränderungen auf der Oberfläche kommen, die sich in einer scheinbaren Schichtdickenzunahme zeigen.

4.4.2 PEC-Polymerabbau auf der SPR-Messplattform

Da die Bioabbaubarkeitsstudien des Polyethylencarbonats durch Makrophagen mittels SPI nicht zufriedenstellend waren, wurden Messreihen unter Zuhilfenahme der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) durchgeführt.

Auswirkungen verschiedener Zellkonzentrationen auf den PEC-Abbau

Zu Beginn der PEC-Abbaustudie wurde die Auswirkung verschiedener Zellkonzentrationen der Makrophagen auf den Abbau des Polymers untersucht.

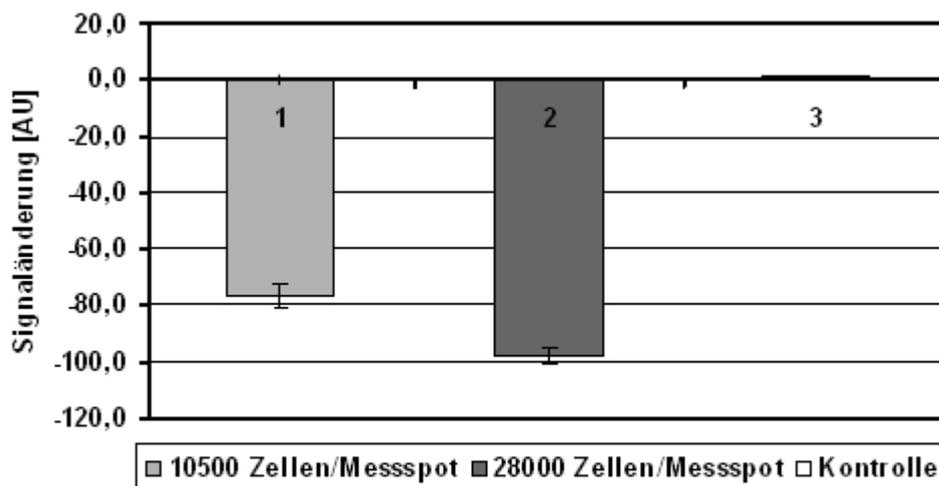


Abb. 4.165: Signaländerungen aufgrund des PEC-Schichtdickenabbaus durch J774A.1 Makrophagen. Für die Messreihe (1) wurde eine Zellkonzentration von 10500 Zellen/Messspot verwendet, für Messreihe (2) lag diese bei 28000. Als Kontrolle wurde der Versuch in Messreihe (3) ohne Zellen durchgeführt.

Die Messreihen haben gezeigt, dass der Abbau des Polymers von der Zellzahl abhängig ist. Es handelt sich aber um eine nicht lineare Abnahme der Schichtdicke. Bei mehr als doppelter Zellzahl vergrößert sich der Polymerabbau um mehr als 25 % (-76,8 ± 4,1 AU vs. 98,1 ± 2,8 AU) (Abb. 4.165).

Als Kontrollversuch wurde die Messung nur mit Nährmedium (ohne Zellen) durchgeführt. Das Messsignal zeigte eine Drift von 2,0 AU.

Da die Messungen auf der SPR-Plattform erfolgreich waren und eine Abhängigkeit der Schichtdickenabnahme des Polyethylencarbonats von der Zellkonzentration gezeigt werden konnte, wurden die Makrophagen in den weiteren Messreihen mit Stimulantien getriggert. Als Triggerfaktoren dienten Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*, Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella typhimurium* und LPS aus *Escherichia coli*. Die detaillierten Ergebnisse sind im Kapitel 3.4.5.3 unter den entsprechenden Abschnitten zusammengefasst.

Einfluss getriggelter Makrophagen auf den PEC-Abbau

Bei den drei unterschiedlichen Messreihen wurden die Makrophagen unter dem Einfluss der jeweiligen Triggerfaktoren immobilisiert. Ziel war es, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Trigger eine Auswirkung auf die Aktivität der Makrophagen haben und somit direkt eine Änderung des Polymerabbaus hervorrufen.

Triggerfaktor ConA

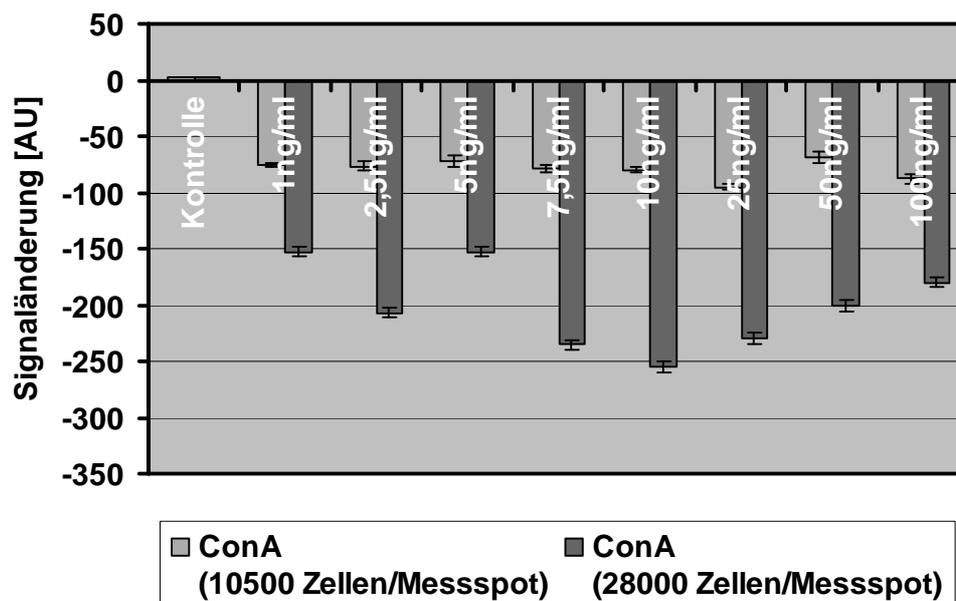


Abb. 4.166: Maximaler PEC-Abbau durch Makrophagen getriggert mit ConA nach 8 h.

In Abb. 4.166 sind die Messsignaländerungen für zwei verschiedene Zellkonzentrationen der Makrophagen in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von ConA nach acht Stunden angegeben.

Die höhere Zellkonzentration bewirkte im Zusammenhang mit dem Triggerfaktor ConA höhere Schichtdickenabnahmen. Dies war aus den Messreihen der Immobilisierung von Makrophagen auf dem polymerbeschichteten Goldträger zu erwarten. Jedoch zeigte sich keine Korrelation zwischen der Konzentration des Triggerfaktors und der

Abnahme der Polymerschicht in der Weise, dass eine höhere Konzentration des Triggers auch mit einer größeren Abnahme der Polymerschicht einhergeht.

Betrachtet man die Messreihe mit der niedrigeren Zellkonzentration von 10500 Zellen/Messspot, so zeigte sich nach acht Stunden bei allen ConA-Konzentrationen eine durchschnittliche Schichtdickenabnahme von $-79,3 \pm 3,5$ AU. Die geringste Abnahme war bei 50 ng/ml ConA ($-68,7 \pm 4,5$ AU). Bei dieser Konzentration lag auch die kleinste negative Steigung der PEC-Abbaukurve ($-0,81$ %). Die höchste Schichtdickenabnahme wurde bei 25 ng/ml ConA gemessen und betrug $-95,0 \pm 2,6$ AU, wobei die größte negative Steigung ebenfalls bei dieser Konzentration ermittelt wurde ($-1,24$ %).

Die Makrophagen scheinen bei dieser Zellkonzentration nicht sehr gut auf den Triggerfaktor anzusprechen. Suen et al. (2000) konnten zeigen, dass ConA, welches normalerweise ein Mitogen für T-Lymphozyten darstellt, in der Lage war, bei murinen Makrophagen (Zelllinie PU5-1.8) Apoptose auszulösen. Sie stützen Ihre Aussage auf drei Beobachtungen: ConA erhöhte die Anzahl der Zellen mit hypodiploider DNA (1), löste DNA Fragmentierung aus, wobei die Zytotoxizität durch α -D-Methylmannoside, welche den Lektinteil des ConA blocken, unterdrückt wurde (2). Zusätzlich war ConA in der Lage Cytochrom c im Zytosol der Makrophagen freizusetzen (3). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ConA mit den Makrophagen interagiert haben muss und somit Apoptose auslöste. Dies könnte eine Begründung für die niedrigen Schichtdickenabnahmen der Zellkonzentration 10500 Zellen/Messspot unter Einfluss von ConA sein.

Bei der höheren Zellkonzentration von 28000 Zellen/Messspot lag die Schichtdickenabnahme zwischen $-153,0 \pm 4,4$ AU ($c_{\text{ConA}} = 5$ ng/ml) und $-255,3 \pm 4,7$ AU ($c_{\text{ConA}} = 10$ ng/ml). Die kleinste negative Steigung der Abbaukurve ($-1,98$ %) zeigte sich, wie die minimale Schichtdickenabnahme ($-153,0 \pm 4,4$ AU), bei einer ConA-Konzentration von 5 ng/ml. Die größte negative Steigung ($-3,74$ %) lag bei der maximalen Schichtdickenabnahme ($-255,3 \pm 4,7$ AU) bei 10 ng/ml ConA.

Legt man hier auch die Theorie der Apoptose-Induktion zugrunde, könnte aufgrund der höheren Zellzahl nur ein Teil der immobilisierten Makrophagen apoptotisch geworden sein. Das würde bedeuten, die verbliebenen Zellen hätten weiterhin das Polymer abbauen können. Die Schichtdickenabnahmen in Abb. 4.166 nehmen bis 10 ng/ml ConA zu. Nach der ConA-Konzentration 10 ng/ml nimmt die Schichtdickenabnahme wieder ab. Würde die Theorie der Apoptose zutreffen, müsste mit steigender Konzentration des Triggerfaktors die Apoptose zunehmen und somit der Schichtdickenabbau abnehmen. Dies ist nicht der Fall. Somit scheint eher eine Begründung in Frage zu kommen, die auf einer bestimmten Konzentration von ConA beruht. Bei dieser ist die Aktivität, also die Freisetzung des Superoxidradikalanions, der Makrophagen (bei der Zellkonzentration 28000 Zellen/Messspot) am höchsten. Dass eine Erhöhung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffintermediate aufgrund der Wechselwirkung von Lektinen mit Makrophagen möglich ist, zeigten Tripathi und

Maiti (2003), indem sie Makrophagen der Maus mit dem Lektin aus *Abrus precatorius* stimulierten. Die Makrophagen (10^6 Zellen/ml) wurden mit 1 ng/ml Lektin aktiviert und mit Ferrocytochrom c und Natriumazid vorinkubiert. Nach 60 Minuten wurde die Superoxidanionenfreisetzung durch die Reduktion des Ferrocytochroms c photometrisch in An- und Abwesenheit von Superoxiddismutase (SOD) gemessen. Aktivierte Makrophagen setzen neben Stickstoffmonoxid (NO) auch Superoxidanionen frei, die in unterschiedliche Stoffwechselwege eingebunden sind. Die Zugabe von SOD, ein Enzym, welches spezifisch die Produktion von Superoxidanionen inhibiert, hatte keine Auswirkungen auf die Absorption. Abrin, das Lektin aus *Abrus precatorius* hat eine Spezifität gegenüber Galactose. Makrophagen zeigten nach der Behandlung mit Abrin eine erhöhte Freisetzung von Superoxidanionen. Für ConA, das eine Spezifität gegenüber Mannose und Glucose aufweist, könnte ähnliches gelten; jedoch scheint das Maximum der Aktivierung bei einer ConA-Konzentration von 10 ng/ml zu liegen. Zurückzuführen wäre dies auf die strukturelle Verwandtschaft von Galactose und Glucose.

Der Kontrollversuch wurde mit der höchsten Triggerkonzentration ohne Zellen durchgeführt. Ein Abbau war nicht zu beobachten. Das Messsignal zeigte eine Drift von 3,0 AU.

Triggerfaktor LPS aus *Escherichia coli*

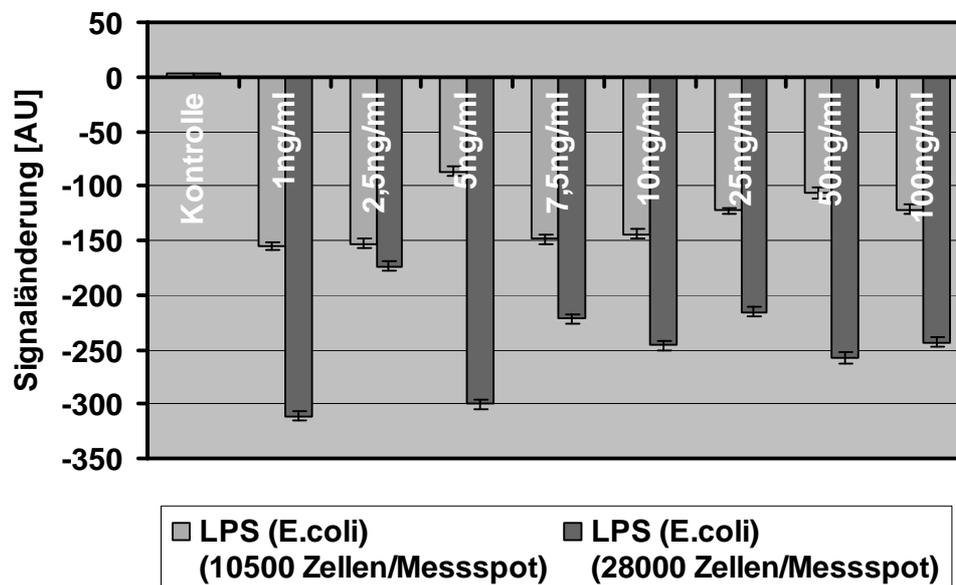


Abb. 4.167: Maximaler PEC-Abbau durch Makrophagen getriggert mit LPS aus *E. coli* nach 8 h.

Die Messreihen mit LPS aus *Escherichia coli* wurden ebenfalls mit zwei unterschiedlichen Zellkonzentrationen durchgeführt.

Bei der niedrigeren Konzentration von 10500 Zellen/Messspot lag der Schichtdickenabbau des Polymers zwischen $-87,0 \pm 4,4$ AU ($c_{LPS} = 5$ ng/ml) und

-154,7 ± 3,5 AU ($c_{LPS} = 1$ ng/ml). Die minimale negative Steigung betrug -0,66 % und lag wie der minimale Schichtdickenabbau bei einer LPS-Konzentration von 5 ng/ml, die maximale negative Steigung lag bei -3,81 % und wurde bei 1 ng/ml LPS ermittelt, wo auch der maximale Schichtdickenabbau lag.

Der durchschnittliche Abbau des Polyethylencarbonats aller LPS-Konzentrationen lag bei -129,9 ± 4,1 AU. Aus Abb. 4.167 wird ein gewisser Trend deutlich, wobei mit steigender LPS-Konzentration die Schichtdickenabnahme sinkt. Das gleiche Verhalten zeigt auch die Messreihe mit der Zellkonzentration von 28000 Zellen/Messspot. Hier lagen die Schichtdickenabnahmen zwischen -174,0 ± 4,4 AU ($c_{LPS} = 2,5$ ng/ml) und -311,3 ± 4,2 AU ($c_{LPS} = 1$ ng/ml). Die minimale und die maximale negative Steigung betragen -1,47 % bei einer LPS-Konzentration von 2,5 ng/ml und -4,56 % bei 1 ng/ml LPS. Eine Korrelation zum kleinsten bzw. größten Schichtdickenabbau war gegeben.

Jedoch ist es nicht erklärbar, dass sich ein so großer Unterschied im Polymerabbau zwischen der ersten und zweiten LPS-Konzentration ergab. Die Schichtdickenabnahme war bei 1 ng/ml LPS um fast 79 % höher als bei 2,5 ng/ml. Eine Begründung hierfür könnte in einer möglichen Deaktivierung der Makrophagen liegen. Die gleichen Verhältnisse liegen in der Messreihe mit der Zellzahl 10500 Zellen/Messspot bei den LPS-Konzentrationen 2,5 und 5 ng/ml vor. Hier war der Schichtdickenabbau bei 2,5 ng/ml LPS fast 76 % höher als bei 5 ng/ml.

Nach Aktivierung der Makrophagen mit LPS setzen diese Zytokine und Sauerstoffradikale (u.a. auch Superoxidradikalanionen) frei. Die Interaktion zwischen Makrophagen und LPS ist dabei durch folgende Prozesse gekennzeichnet: Das LPS bindet im Serum an ein spezifisches LPS-bindendes Protein (LBP) [Tobias et al., 1989]. Dieses bewirkt eine deutliche Erhöhung der Sensitivität der Makrophagen gegenüber LPS. Dabei erkennt das LBP den biologisch reaktiven Lipid A Bereich des LPS [Schumann et al., 1990]. Der dadurch entstandene LPS-LBP-Komplex bindet nun an das Protein CD14. Dieses befindet sich sowohl in löslicher Form im Plasma als auch in gebundener Form an der Zelloberfläche von Monozyten. CD14 bindet das LPS und erleichtert so dessen Signaltransduktion [Wright et al., 1990; Wright, 1995]. CD14 ist mit einem Glykosylphosphatidylinositolmolekül in der Membran befestigt, besitzt jedoch keine transmembranöse Domäne, die das LPS-Signal in die Zelle weiterleiten könnte. Es wurde vermutet, dass ein anderes Molekül diese Funktion übernimmt. Tatsächlich konnten sogenannte „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) als transmembranöse Signalmoleküle für die Weiterleitung des LPS-Signals identifiziert werden [Medzhitov et al., 1997_{a,b}; Rock et al., 1998]. TLRs sind transmembranöse Moleküle, die aus einer leucinreichen extrazellulären und einer intrazellulären Signaldomäne bestehen, die dem Typ I IL-1 Rezeptor ähnlich ist. Besonders der TLR4 ist für die Weiterleitung des LPS-Signals verantwortlich [Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Hoshino et al., 1999]. Allerdings ist der TLR4 alleine nicht in der Lage, das LPS zu erkennen und dessen Signal weiterzuleiten. Hierzu benötigt er die Hilfe des

MD-2-Moleküls, das mit dem TLR4-Molekül assoziiert ist [Shimazu et al., 1999]. Der TLR4-MD-2-Komplex stellt somit das Erkennungsmolekül für LPS auf Monozyten dar. Die Bindung von LPS an CD14 erhöht die Sensitivität des TLR4-MD-2-Komplexes gegenüber LPS auf das Doppelte [Akashi et al., 2000]. Diese transmembranöse Signaltransduktion, in deren Rahmen es zur Phosphorylierung von Proteinen durch die MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinase) kommt, führt schließlich zur Aktivierung des Transskriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) [Ulevitch und Tobias, 1995]. Durch die anschließende Bindung des NF- κ B an das TNF- α - und iNOS-Gen kommt es zur Expression und Produktion von TNF- α , NO und Sauerstoffradikalen (bspw. Superoxidradikalanionen, $O_2^- \cdot$).

Bei diesem komplexen Weg der Aktivierung der Makrophagen muss anscheinend das Verhältnis der Zellzahl zur Triggerkonzentration berücksichtigt werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Trend sein, dass die Schichtdickenabnahme mit steigender Konzentration an LPS abnimmt (Abb. 4.167).

Dass mit steigender Triggerkonzentration die Schichtdickenabnahme sinkt, könnte seine Begründung auch in apoptotischen Vorgängen haben. Karahashi und Amano (2000_{a,b}) konnten zeigen, dass LPS in peritonealen Makrophagen von C3H/HeN Mäusen in Anwesenheit von Cycloheximid Zytotoxizität auslöst. Eine LPS-Konzentration größer 1 ng/ml induzierte eine zeitabhängige Freisetzung von zytoplasmatischen Enzymen und Lactatdehydrogenase. Eine solche Freisetzung konnte bei C3H/HeJ Mausmakrophagen, die gegenüber LPS resistent waren nicht einmal bei einer LPS-Konzentration von 1000 ng/ml ausgelöst werden. Ähnliche Ergebnisse der LPS-induzierten Zytotoxizität wurden auch in Makrophagen der Zelllinie J774.1 gefunden, jedoch nicht in der mutanten Zelllinie von J774.1, der Zelllinie LPS1916. Auch in humanen Makrophagen kann Apoptose unter Einwirkung von LPS eintreten. Bei humanen Makrophagen der Zelllinie U937 löste LPS in der Anwesenheit von Cycloheximid die Freisetzung von Cytochrom c aus. Des Weiteren erhöht LPS die Caspase-3 Aktivität und führt zur Apoptose durch Aktivierung des CD14/TLR4-Komplexes [Suzuki et al., 2004].

Als Kontrollversuch diente das Nährmedium ohne Zellen mit der höchsten Konzentration des *E. coli* LPS. Die Drift des Messsignals lag bei 2,5 AU.

Triggerfaktor LPS aus *Salmonella typhimurium*

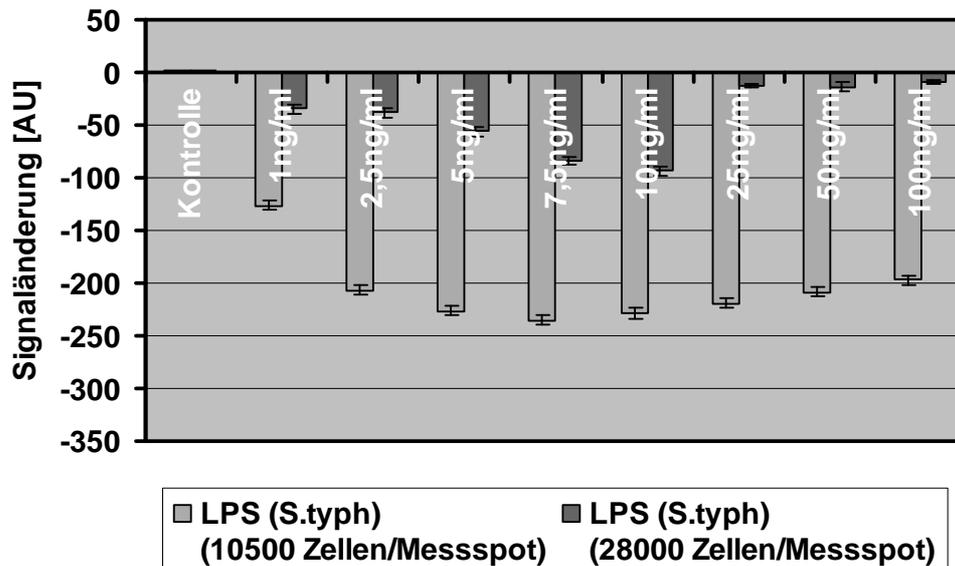


Abb. 4.168: Maximaler PEC-Abbau durch Makrophagen getriggert mit LPS aus *Salmonella typhimurium* nach 8 h.

Der dritte Triggerfaktor war LPS aus *Salmonella typhimurium*. Die Zellkonzentrationen für die Messreihen lagen bei 10500 und 28000 Zellen/Messspot. Die maximalen Schichtdickenabnahmen sind in Abb. 4.168 in Abhängigkeit von der Konzentration des Triggerfaktors zusammengefasst.

Was direkt auffällt, ist der extreme Unterschied der Schichtdickenabnahmen der beiden Messreihen. Bei der Messreihe mit 10500 Zellen/Messspot lagen die Schichtdickenabnahmen bei durchschnittlich $-205,9 \pm 4,5$ AU, wobei der minimale Wert bei $-126,3 \pm 4,2$ AU (1 ng/ml LPS) und der maximale Wert bei $-235,0 \pm 4,4$ AU (7,5 ng/ml LPS) lag. Die minimale negative Steigung lag bei 1 ng/ml LPS und betrug $-3,04\%$, die maximale wurde bei einer LPS-Konzentration von 7,5 ng/ml mit $-7,62\%$ bestimmt. Auch in diesen Messreihen zeigte sich eine Übereinstimmung des minimalen/maximalen Schichtdickenabbaus und der minimalen/maximalen negativen Steigung. Auffallend ist jedoch die Größe der Steigungen. Die minimale negative Steigung ist für das LPS aus *Salmonella typhimurium* für die Zellkonzentration 10500 Zellen/Messspot fast fünfmal so hoch ($-0,66\%$ vs. $-3,04\%$), die maximale negative Steigung doppelt so hoch ($-3,81\%$ vs. $-7,62\%$) wie in der Messreihe des LPS aus *Escherichia coli*.

Die Messreihe mit der Zellkonzentration von 28000 Zellen/Messspot zeigte durchschnittliche Schichtdickenabnahmen von $-42,6 \pm 3,8$ AU. Der minimale bzw. maximale Abbau betrug $-9,3 \pm 1,5$ AU (100 ng/ml LPS) und $-93,3 \pm 4,7$ AU (10 ng/ml LPS). Bei dieser Zellkonzentration waren die minimale und maximale negative Steigung relativ gering. Minimal lag diese bei $-0,17\%$ (100 ng/ml LPS),

maximal bei -1,32 % (10 ng/ml LPS). Die Korrelation zum minimalen bzw. maximalen Schichtdickenabbau war gegeben.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden anderen Triggerfaktoren mit dem Triggerfaktor LPS aus *Salmonella typhimurium*, so fällt direkt der Unterschied der Schichtdickenabnahmen in Korrelation zur Zellzahl auf. In den Messreihen mit dem LPS aus *Salmonella typhimurium* liegt der höhere Schichtdickenabbau bei der niedrigeren Zellzahl. Dies stimmt keineswegs mit den vorherigen Ergebnissen, speziell mit denen, aus den Versuchen mit LPS aus *Escherichia coli* überein.

LPS ist in seiner Grundstruktur, dem Polysaccharidteil und dem Lipid A Teil, immer gleich aufgebaut und unterscheidet sich artenspezifisch nur in den Fettsäureresten im Lipid A Teil. Die aktivierende Wirkung von LPS aus verschiedenen Spezies sollte auf Makrophagen ähnliche Auswirkungen haben. Da in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass mit steigender Zellzahl auch die Schichtdickenabnahme zunimmt, sollte ein Triggerfaktor diese Eigenschaft verstärken.

Vergleicht man die Messreihen eins (10500 Zellen/Messspot) und zwei (28000 Zellen/Messspot) untereinander, so ist hier ein Trend dahingehend zu erkennen, dass in der Mitte der Konzentrationsreihe des Triggerfaktors (7,5 bzw. 10 ng/ml LPS) der höchste Schichtdickenabbau zu finden ist. Dies spricht wiederum, wie bei den anderen Triggerfaktoren schon diskutiert, für ein bestimmtes Verhältnis von Zellzahl zur Triggerkonzentration bei dem der Schichtdickenabbau maximal ist. Eine mögliche Ursache für den sehr geringen Abbau in Bezug auf die höhere Zellzahl könnte in einer fehlerhaften Entwicklung der Makrophagen während der Kultivierung liegen. Wie beim Triggerfaktor LPS aus *Escherichia coli*, könnten auch in diesem Fall apoptotische Prozesse für den geringen Polymerabbau verantwortlich gemacht werden.

Monack et al. (1997) konnten in Versuchen mit Yersinien aus *Yersinia pestis* zeigen, dass diese bei Makrophagen Apoptose auslösen, nicht aber bei epithelialen Zellen. An der Apoptoseinduktion ist ein Effektorprotein (YopP) essentiell beteiligt. Dieses blockiert selektiv die I κ B-Kinase und inhibiert somit die Aktivierung von NF- κ B [Ruckdeschel et al., 2001]. Den Yersinien gelingt es, die proinflammatorischen und die antiapoptotischen Funktionen von NF- κ B zu unterbinden. Die antiapoptotische Funktion scheint für das Überleben von Makrophagen bei der bakteriellen Infektion essentiell zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, die in ihrer NF- κ B-Aktivierung beeinträchtigt sind, nach Interaktion mit Bakterien oder Stimulation mit LPS apoptotisch werden [Navarre und Zychlinsky, 2000; Kitamura, 1999].

Der Kontrollversuch wurde mit der höchsten Konzentration des Triggers ohne Zellen, mit Nährmedium durchgeführt. Das Messsignal zeigte eine Drift von 2,0 AU.

Absoluter Schichtdickenabbau

Nach 3 Stunden ist der Hauptteil des PEC durch die getriggerten Makrophagen abgebaut worden. Der tatsächliche Abbau begann nach 30 bis 60 Minuten, als die

Sedimentation der Zellen auf dem PEC-beschichteten Goldprisma beendet war. In den nächsten 2 Stunden wurden 75 % der PEC-Schicht abgebaut. Das bedeutet, dass unmittelbar nach Zugabe der Triggerfaktoren die Makrophagen aktiviert wurden. Ebenfalls wurde die maximale negative Steigung in allen Messreihen innerhalb der ersten 120 Minuten erreicht.

Tab. 4.40: Durchschnittliche Abbaurrate des maximalen Schichtdickenabbaus pro 30 Minuten und maximale negative Steigung zwischen der 1. und 3. Stunde der Messreihen in Abhängigkeit der Triggerfaktoren für 10500 Zellen/Messspot.

Trigger	10500 Zellen/Messspot		
	Schichtdickenabbau PEC [nm]/30 min	maximale Steigung [%]	Konzentration Trigger [ng/ml] bei maximaler Steigung*
ohne Trigger	-2,4	-1,04	--
ConA	-3,0	-1,24	25
LPS aus <i>Escherichia coli</i>	-3,7	-3,81	1
LPS aus <i>Salmonella typhimurium</i>	-7,1	-7,62	7,5

*identisch mit Konzentration Trigger bei maximalem Schichtdickenabbau

Tab. 4.41: Durchschnittliche Abbaurrate des maximalen Schichtdickenabbaus pro 30 Minuten und maximale negative Steigung zwischen der 1. und 3. Stunde der Messreihen in Abhängigkeit der Triggerfaktoren für 28000 Zellen/Messspot.

Trigger	28000 Zellen/Messspot		
	Schichtdickenabbau PEC [nm]/30 min	Steigung [%]	Konzentration Trigger [ng/ml] bei maximaler Steigung*
ohne Trigger	-4,1	2,46	--
ConA	-8,5	-3,74	10
LPS aus <i>Escherichia coli</i>	-9,7	-4,56	1
LPS aus <i>Salmonella typhimurium</i>	-1,3	-1,32	10

*identisch mit Konzentration Trigger bei maximalem Schichtdickenabbau

Die umgerechneten AU Werte in die PEC-Abbauraten [nm/30 min] sind in Tab. 4.40 und Tab. 4.41 dargestellt. Als Grundlage dafür diente der AU Wert, der nach vollständigem Abbau der PEC-Schicht erreicht wurde. Dieser betrug $311,3 \pm 4,2$ AU und wurde mit der Schichtdicke von $70,1 \pm 4,4$ nm in Beziehung gesetzt.

Mit Ausnahme der Messreihe der höheren Zellkonzentration (28000 Zellen/Messspot) mit dem Trigger LPS aus *Salmonella typhimurium*, führten die Versuche mit der größeren Zellkonzentration zu einer größeren Abbauraten und einer größeren negativen Steigung (Tab. 4.40, Tab. 4.41). Diese Ergebnisse stimmten mit den erhaltenen Daten der Messreihen ohne Trigger überein.

Die Abbauraten pro 30 min mit der niedrigeren Zellkonzentration (10500 Zellen/Messspot) ist annähernd gleich bei den mit ConA und LPS (aus *Escherichia coli*) getriggerten Makrophagen. Die mit LPS aus *Salmonella typhimurium* behandelten Zellen zeigten jedoch eine fast dreifach höhere Abbauraten als in den Versuchen der Zellen ohne Trigger (Tab. 4.40).

Bei der Zellkonzentration (28000 Zellen/Messspot) liegt die Abbauraten des PEC für die Trigger ConA und LPS aus *Escherichia coli* im gleichen Größenbereich. Im Vergleich zu den Messungen ohne Trigger liegen die Abbauraten mehr als doppelt so hoch. Die höhere Zellkonzentration getriggert mit LPS aus *Salmonella typhimurium* generierte einen unerwartet geringen Abbau der PEC-Schicht (Tab. 4.41). Anscheinend ist in dieser Messreihe etwas mit den Makrophagen nicht in Ordnung gewesen. Eine Fehlentwicklung der Zellen während der Kultivierung oder apoptotische Prozesse nach Behandlung der Makrophagen mit LPS könnten mögliche Gründe für dieses Verhalten gewesen sein. Weitere Gründe bezüglich des PEC-Abbaus durch Makrophagen wurden im Detail in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert.

Zusammenfassung

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ist als analytische Plattform zum Monitoring des Abbaus von PEC geeignet, wobei der nicht enzymatische Abbau des Polymers durch Makrophagen in Echtzeit, in Abhängigkeit von der Zellkonzentration und von Triggerfaktoren (Con A und LPS aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*) gezeigt werden konnte. Eine Korrelation zwischen dem relativen PEC-Abbau in AU zum realen Abbau der Polymerschicht in nm konnte hergestellt werden. Hierbei zeigten höhere Zellkonzentrationen eine größere Abbauraten des PEC. Diese konnte mit Triggerfaktoren weiter gesteigert werden.

4.5 Bakterienmembran-Modellsystem auf Basis von Liposomen

Um bessere Aussagen über die Interaktionen zwischen bestimmten Oberflächenantigenstrukturen und deren Zielstrukturen machen zu können, sollte ein Modellsystem in Form von „künstlichen Bakterien“ etabliert werden. Bei diesem Modell handelt es sich um die Nachahmung der Bakterienmembran Gram negativer Bakterien unter Zuhilfenahme von Liposomen. Es wurde LPS in die Bilayermembran von Liposomen inkorporiert und die Interaktion mit dem spezifischen Antikörper gegen das jeweilige LPS erfasst.

4.5.1 Membranmodell für *Legionella pneumophila*

Zu Beginn der Entwicklung des Bakterien-Modellsystems musste eine Liposomenformulierung gefunden werden, die für den „Bakterienassay“ geeignet ist. Hierzu wurden neutrale, negativ und positiv geladene Liposomen hergestellt und mit LPS aus *Legionella pneumophila* modifiziert. Die „künstlichen Legionellen“ wurden auf einer C₁₈-alkylierten Oberfläche mittels SPR vermessen, indem ein spezifischer Anti-*Legionella* -Antikörper zugegeben wurden. Die resultierenden Detektionssignale waren für die neutrale Liposomenformulierung am höchsten (Tab. 4.42).

Tab. 4.42: Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers in Abhängigkeit der Liposomenladung. Die zur Modifizierung der Liposomen eingesetzte Konzentration an LPS aus *Legionella pneumophila* betrug $4,0 \times 10^5$ Partikel/ml.

Liposomenladung	Detektionssignal [AU]
negativ	3,8 ± 0,9
positiv	7,7 ± 1,5
neutral	14,8 ± 2,0

Das Detektionssignal für LPS modifizierte neutrale Liposomen lag 92 % höher als bei den positiven und 289 % höher als bei den negativen Liposomen. Eine mögliche Ursache für diese hohen Unterschiede im Detektionssignal des Antikörpers liegt in der Struktur des LPS (Abb. 1.17).

Da bei den Bakterien das LPS mit dem Lipid A Teil in der Bakterienmembran verankert ist, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit das zur Modifizierung der neutralen Liposomen verwendete LPS ebenfalls mit dem Lipid A Bereich in die Liposomenmembran inkorporiert. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Liposomenmembran und des Lipid A ist dies gut möglich. Hingegen war die Inkorporation in eine geladene Membran nicht zufriedenstellend, was aus den Detektionssignalen des Anti-*Legionella*-Antikörpers ersichtlich wird (Tab. 4.42).

Tab. 4.43: Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers in Abhängigkeit der zur Modifizierung der neutralen Liposomen eingesetzten LPS-Konzentration.

LPS Konzentration [Partikel/ml]	Detektionssignal [AU]
3,00E+05	1,3 ± 0,6
6,00E+05	22,7 ± 1,5
1,00E+06	6,7 ± 1,5
2,50E+06	5,3 ± 0,6

Die zur Inkorporation eingesetzte Konzentration an *Legionella pneumophila* LPS wurde empirisch ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden mit einer LPS-Konzentration von $6,0 \times 10^5$ Partikel/ml erreicht (Tab. 4.43). Die Begründung, dass nicht die höchste Konzentration an LPS das höchste Detektionssignal zur Folge hatte, könnte in der Anordnung der LPS-Moleküle in der Bilayermembran liegen. Da eine gewisse Struktur in der Membran eines Vesikels vorherrscht, werden die LPS-Moleküle beim Vorgang der Inkorporation durch Selbstanordnung gleichmäßig in einer bestimmten Struktur in der Membran verteilt. Da es sich beim LPS um ein Lysat handelt, ist davon auszugehen, dass jeder Partikel nicht die gleiche Konzentration an LPS besitzt. Dies würde eine ungleichmäßige Verteilung des LPS in der Liposomenmembran erklären und dem natürlichen Aufbau der Gram negativen Bakterienmembran ähneln.

Untersuchungen an Lipidbilayern der Außenmembranen von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*, sowohl beim Wildtyp als auch bei einem Mutantentyp, führten zu der Annahme von asymmetrischen Bilayern [Nikaido und Vaara, 1985]. Es wurde allgemein vermutet, dass LPS und Phospholipide gemischte Bilayer ausbilden. Smit et al. (1975) beobachteten, dass die Anzahl der Kohlenwasserstoffketten in LPS der Außenmembran einer einzelnen Zelle gleich ist mit der Anzahl der Kohlenwasserstoffketten in Phospholipiden der Außenmembran. In der ersten Annäherung kann angenommen werden, dass eine Kohlenwasserstoffkette von LPS sowie von Phospholipid eine nahezu gleiche Fläche belegt. Wenn dies so ist, liegt die Vermutung nahe, dass die äußere Schicht des Bilayers fast völlig frei von Phospholipiden ist. Dieses wurde von Kamio und Nikaido (1976) durch Markierungsversuche mit Cyanbromid aktiviertem Dextran überprüft. Vorhandene Phosphatidylethanolamin-Moleküle in der äußeren Schicht des Bilayers der Außenmembran müssten mit dem aktivierten Dextran markiert werden. Dies war aber nicht der Fall.

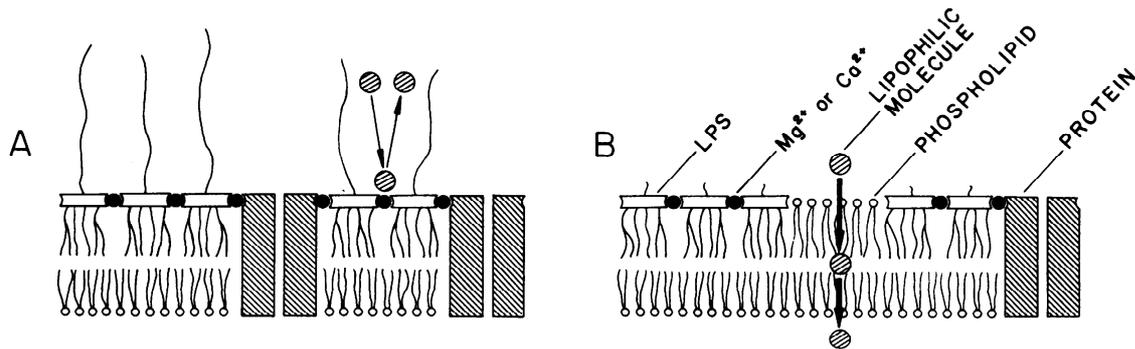


Abb. 4.169: Hypothetische Struktur der Außenmembran des Wildtyps und der Deep rough Mutante von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*: (A) Die Wildtyp-Linie, bei der die äußere Schicht des Bilayers nahezu vollständig aus LPS und Proteinen besteht; (B) Deep rough Mutante, lipophile Moleküle penetrieren durch die Phospholipid Bilayer Domäne [Nikaido und Vaara, 1985].

In lebenden Zellen von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* kommt es je nach Zelllinie bzw. Mutante zu unterschiedlichen Aufbauten der Außenmembranen. Zum einen kann die äußere Schicht des Bilayers der Außenmembran nahezu komplett aus LPS bestehen, teilweise unterbrochen durch Proteine [vgl. Abb. 4.169 (A)], zum anderen können sich in der äußeren Schicht LPS-Strukturen mit Phospholipid Bilayer Domänen abwechseln. Das bedeutet, dass nicht zwingend alle Areale der Außenmembranen mit LPS belegt sein müssen. LPS ist asymmetrisch in der Außenmembran von *Salmonella typhimurium* verteilt [Funahara und Nikaido, 1980; Mühlradt und Golecki, 1975].

Eine solche Membranstruktur könnte sich bei der Herstellung der mit LPS aus *Legionella pneumophila* modifizierten Liposomen ausgebildet haben und für den nicht linearen Zusammenhang zwischen Detektionssignal und LPS-Konzentration verantwortlich sein (Tab. 4.43).

Verwendung von Polymyxinen

Die Polymyxine Polymyxin B (PMB) und Polymyxin B-Nonapeptid (PMBN) haben eine sehr hohe Affinität gegenüber Lipid A und sollten aufgrund dieser Eigenschaft als Konjugat mit LPS das Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers erhöhen.

Tab. 4.44: Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers in Abhängigkeit des eingesetzten Komplexes zur Liposomenmodifizierung. Die zur Modifizierung verwendete Konzentration an *Legionella*-LPS betrug $6,0 \times 10^5$ Partikel/ml. (Lip/LPS = Liposomen modifiziert mit LPS (aus *Legionella*), Lip/(LPS/PMB) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus *Legionella*) und Polymyxin B, Lip/(LPS/PMBN) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus *Legionella*) und Polymyxin B-Nonapeptid).

Liposomenmodifizierung	Detektionssignal [AU]
Lip/LPS/PMBN	$25,0 \pm 2,0$
Lip/LPS/PMB	$2,7 \pm 0,6$
Lip/LPS	$22,7 \pm 1,5$

Zur Vergrößerung des Detektionssignals sollten Polymyxin B (PMB) und Polymyxin B-Nonapeptid verwendet werden. Beide Substanzen binden an den Lipid A Teil des LPS. Durch diesen LPS/PMB- bzw. PMBN-Komplex sollte die Ausrichtung des LPS in der Bilayermembran der Liposomen verbessert werden. Durch eine vereinfachte Interaktion des LPS mit dem Detektionsantikörper sollten höhere Messsignale generiert werden.

Die Verwendung von PMB resultierte in einem sehr niedrigen Wert von $2,7 \pm 0,6$ AU. PMBN hingegen konnte das Detektionssignal des Anti-*Legionella*-Antikörpers im Vergleich zu den nur mit LPS modifizierten Liposomen leicht erhöhen (vgl. Tab. 4.44). Das Detektionssignal der LPS/PMB modifizierten Liposomen betrug nur 11 % des Signals der LPS/PMBN modifizierten Liposomen. Dies verwundert, da es sich beim Polymyxin B-Nonapeptid um ein Derivat des Polymyxin B handelt, welches durch proteolytisches Abspalten des endständigen Aminoacylrests entsteht. Die Bindung an LPS ist genauso hoch wie beim PMB [Vaara und Vaara, 1983].

Die genaue Art und Weise der Assoziation von LPS und Polymyxin B-Nonapeptid ist noch nicht grundlegend aufgeklärt. Tsubery et al. (2000) synthetisierten Polymyxin B-Nonapeptid, die LPS-bindende cyclische Domäne von PMB, und das enantiomere Analogon. Sie untersuchten verschiedene Parameter in Bezug auf die Interaktion mit LPS und konnten zeigen, dass die Bindung von PMBN zu LPS aus *Escherichia coli* stereospezifisch ist.

Eine stereospezifische Interaktion könnte auch zwischen dem LPS aus *Salmonella typhimurium* und PMBN stattgefunden haben, was zu einer besseren Ausrichtung des LPS/PMBN-Komplexes in der Liposomenmembran führte. Dies resultierte in einem größeren Detektionssignal. Anscheinend fand diese stereospezifische Reaktion mit dem PMB nicht statt.

4.5.2 Membranmodell für *Salmonella typhimurium*

Verwendung von Polymyxin B-Nonapeptid

Als Liposomenformulierung wurden ebenfalls neutrale Liposomen der gleichen Zusammensetzung wie in Kapitel 4.5.1 verwendet. Da sich der Grundaufbau des LPS verschiedener Bakterien gleicht, ist davon auszugehen, dass auch die Inkorporation des Lipid A Teils des LPS aus *Salmonella typhimurium* in die Membran neutraler Liposomen die besten Ergebnisse erzielt. Vom Gebrauch des Polymyxin B (PMB) wurde abgesehen, da dieses in der Versuchsreihe mit dem LPS aus *Legionella pneumophila* keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. Eine Verbesserung sollte das Polymyxin B-Nonapeptid liefern, welches ein Derivat des Polymyxin B darstellt.

Tab. 4.45: Detektionssignal des Anti-Salmonella-Antikörpers in Abhängigkeit des eingesetzten Komplexes zur Liposomenmodifizierung. (Lip/LPS = Liposomen modifiziert mit LPS (aus Salmonella), Lip/(LPS/PMBN) = Liposomen modifiziert mit einem Komplex aus LPS (aus Salmonella) und Polymyxin B-Nonapeptid).

Liposomenmodifizierung	Detektionssignal [AU]
Lip/LPS/PMBN	77,3 ± 7,5
Lip/LPS	10,0 ± 1,0

Die Verwendung von PMBN führte zu einer deutlichen Signalverstärkung des Anti-Salmonella-Antikörpers. Das durch den Lip/LPS/PMBN-Komplex generierte Detektionssignal betrug mehr als das Siebenfache des Detektionssignals für den Lip/LPS-Komplex (Tab. 4.45). Hier scheint das PMBN ein stabiles Konjugat mit dem Lipid A Teil des LPS einzugehen, wie es von Vaara und Vaara (1983) beschrieben wurde. Nach Inkorporation des LPS/PMBN-Komplexes in die Liposomenmembran scheint das LPS für die Interaktion mit dem Detektionsantikörper sterisch besser zur Verfügung zu stehen und generiert so ein größeres Messsignal.

Inkorporation verschiedener LPS-Konzentrationen in Liposomenmembranen

Im Gegensatz zu der Versuchsreihe mit dem LPS aus *Legionella pneumophila* konnte in den Messungen mit LPS aus *Salmonella typhimurium* eine Korrelation zwischen der LPS-Konzentration und dem Detektionssignal des Anti-Salmonella-Antikörpers festgestellt werden (Tab. 4.46).

Tab. 4.46: Detektionssignal des Anti-Salmonella-Antikörpers in Abhängigkeit der zur Modifizierung der Liposomen verwendeten LPS-Konzentration.

Konzentration LPS	Detektionssignal [AU]
500µg/ml	153,0 ± 10,1
400µg/ml	111,7 ± 7,0
300µg/ml	93,7 ± 7,8
200µg/ml	77,3 ± 7,5
100µg/ml	71,7 ± 6,5
50µg/ml	23,0 ± 3,0
25µg/ml	14,3 ± 3,5
10µg/ml	4,7 ± 1,5
5µg/ml	0

Dass mit höherer Konzentration an LPS ein höheres Messsignal generiert wurde, könnte an der gleichmäßigen Verteilung des LPS in der Liposomenmembran aufgrund der relativ hohen Reinheit des LPS liegen (< 3 % Gesamtverunreinigung).

Das LPS aus *Salmonella typhimurium* wird mittels Phenolextraktion gewonnen und liegt als lyophilisiertes Pulver vor. Ohne störende Substanzen kann das LPS beim Vorgang der Inkorporation mittels Ultraschall durch Selbstorganisation in die Lipiddoppelmembran der Liposomen gleichmäßig eingefügt werden.

Im Gegensatz dazu könnte die Anwesenheit von weiteren Substanzen im Lysat von *Legionella pneumophila* für eine ungleichmäßige Verteilung des LPS in der Liposomenmembran verantwortlich sein. Im Lysat der zerstörten Zellwand der Legionellen muss mit weiteren Substanzen außer LPS gerechnet werden. Unter anderem kann es sich dabei um Phospholipide, Lipoproteine oder Peptidoglykane handeln. Diese konkurrieren mit dem LPS bei der Inkorporation in die Liposomenmembran, so dass sich keine gleichmäßige Verteilung des LPS in dem Bilayer der Liposomen ergibt und folglich höhere LPS (aus *Legionella*) Konzentrationen nicht zwangsläufig zu höheren Messsignalen führen (vgl. Kapitel 4.5.1).

Quantifizierung des LPS

Zur Bestimmung der LPS-Konzentration in den Liposomenmembranen wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt. Zum einen der LAL-Test und zum anderen eine HPLC-MS-Methode.

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test wurde erstmals durch Levin und Bang (1964_{a,b}) beschrieben und basiert auf der Gelbildungsreaktion des Lysates in der Anwesenheit von Endotoxinen. Das Problem dieser Methode ist jedoch die Beeinträchtigung durch andere Substanzen, die die Gelierung des Lysates auslösen, wie z.B. Peptidoglykane [Pearson et al., 1987; Wicken und Knox, 1980] oder diese verhindern wie z.B. Elektrolyte [Weiss, 1987].

Ein alternativer Ansatz um LPS zu quantifizieren, besteht in der Detektion spezifischer Komponenten des LPS-Moleküls [Maitra et al., 1986]. Lipid A, welches die Lipidkomponente des LPS darstellt und für den endotoxischen Effekt verantwortlich ist [Rietschel et al., 1988], enthält einen bestimmten molaren Anteil an 3-Hydroxyfettsäuren [Wilkinson, 1988]. Diese können als Marker zur Quantifizierung des LPS dienen und führten zur Entwicklung einer HPLC-MS-Methode zur Analyse von 3-Hydroxymyristinsäure in LPS aus *Salmonella typhimurium*.

Tab. 4.47: Ergebnisse der Quantifizierung des LAL-Tests und der HPLC-MS-Methode.

Quantifizierungsmethode	LPS Konzentration zur Modifizierung der Liposomen [µg/ml]	LPS Konzentration in Liposomen [µg/ml]	Inkorporiertes LPS [%]
LAL-Test	200	19,3 ± 1,6	9,7
HPLC-MS	200	30,9 ± 1,9	15,5

Die Ausgangskonzentrationen an LPS ($c=200 \mu\text{g/ml}$) waren für die Quantifizierungsmethoden identisch, führten jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Bestimmung der LPS-Konzentration in den Liposomenmembranen.

Für den LAL-Test ergab sich somit in der Bilayermembran der Liposomen eine LPS-Konzentration von $19,3 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$, bei der HPLC-MS-Methode führte die gleiche Menge an LPS modifizierten Liposomen zu einer Konzentration von $30,9 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$.

Dies entspricht einer Inkorporation von 9,7 % (LAL) bzw. 15,5 % (HPLC-MS) bezogen auf die zur Modifizierung der Liposomen eingesetzten Konzentrationen an LPS. Damit lag die LPS-Konzentration der HPLC-MS-Methode 60,1 % höher als die der LAL-Methode.

Eine mögliche Ursache könnte im unterschiedlichen Material der Probengefäße liegen. Für den LAL-Test wurden Polypropylen (PP) Röhrchen verwendet, für die HPLC-MS-Versuche Glas Vials. Aufgrund der Struktur des LPS kommt es bevorzugt auf positiv geladenen und unpolaren Oberflächen zu starken Adsorptionserscheinungen [Takemoto et al., 2003; Hirayama und Sakata, 2002]. Sonesson et al. (1990) haben diesen Effekt beim Vergleich der LPS-Bestimmung durch den LAL-Test (PP-Probengefäße) gegenüber der LPS-Bestimmung mittels GC-MS (Glas-Probengefäße) zeigen können. Hier lag der Wert eines *Escherichia coli* O55:B5 LPS-Standards von 2000 ng bei 1270 ng (LAL) und 2020 ng (GC-MS). In diesem Fall liegt der GC-MS gemessene Wert für das LPS 59 % höher. Auch für die HPLC-MS-Methode konnte ein solcher Trend gegenüber dem LAL-Test festgestellt werden (vgl. Tab. 4.47).

Mit der HPLC-MS-Methode ist es möglich, die gesamte Menge an LPS in einer Probe zu erfassen, auch wenn das LPS in biologisch inaktiver Form vorliegt. Unspezifische Aktivierung/Inaktivierung des Assays durch andere Substanzen ist nicht möglich. Einzig die längere Analysendauer gegenüber der LAL-Methode könnte als Nachteil angesehen werden.

4.6 „Magnetic Beads“ kombiniert mit LAPS

Eine wichtige Anwendung der LAPS-Plattform ist die Erfassung der metabolischen Aktivität von Zellen. Ziel ist hier die Bereitstellung eines Analysesystems für pharmazeutische / biotechnologische Fragestellungen. Das Messen der metabolischen Aktivität von Makrophagen konnte mit dem LAPS demonstriert werden.

Die Verwendung von bis zu 16 Messspots auf einem Sensorchip in einer gemeinsamen Messzelle ergibt bei der Messung der metabolischen Aktivität eine Einsatzmöglichkeit auf dem Sektor der pharmazeutischen Applikationen. Diese konnte beispielhaft anhand des Experimentes mit „Magnetic Beads“ kombiniert mit LAPS gezeigt werden. Im Rahmen dieser Messreihe wurde die lokale Triggerung von Makrophagen durch LPS in einer gemeinsamen Zellkultur mit Hilfe von „Magnetic Beads“ untersucht. Tab. 4.48 fasst die Ergebnisse für die diagonal verlaufenden Sensorspots zusammen.

Tab. 4.48: Resultierende Ansäuerungsraten der Messspots 1, 6, 11 und 16 jeweils bei der Platzierung des Magneten unterhalb von Messspot 1 und unterhalb von Messspot 16.

Messspot	1	6	11	16	Einheit
Ansäuerungsrate (Magnet an Spot 1)	31,4	28,9	26,1	24,2	μVs^{-1}
Ansäuerungsrate (Magnet an Spot 16)	31,6	31,4	29,6	28,0	μVs^{-1}
Prozentuale Änderung	0,6	8,7	13,4	15,7	%

Die Messungen zeigen einen signifikanten Anstieg der Aktivität der Makrophagen an Messspot 16 nach dem Wechsel der Magnetposition. Dies kann auf das Heranziehen von LPS-gekoppelten „Magnetic Beads“ in Richtung von Messspot 16 zurückgeführt werden. Eine Abnahme an Messspot 1 war dagegen nicht zu erkennen. Zwei mögliche Gründe hierfür sind:

1. Die Makrophagen an Messspot 1 sind bereits durch LPS aktiviert worden. Diese Aktivierung verursacht das Ablufen einer langen Signalkette, sowohl innerhalb der Zelle als auch außerhalb durch die Freisetzung von TNF- α und IL-1 β (Zytokine). Diese wiederum führt zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen durch parakrine Sekretion (im Rahmen einer positiven Selbstverstärkung) [Basler, 2006; Rivest et al., 2000]. Eine schnelle „Deaktivierung“ von einmal aktivierten Makrophagen ist daher nicht zu erwarten.
2. Die Untersuchungen zeigen, dass die „Magnetic Beads“ mit einer Größe von 0,86 μm von Makrophagen aufgenommen werden können (Phagozytose) [Möller et al., 2005]. Abb. 3.154 bestätigt die Möglichkeit einer solchen Phagozytose der „Magnetic Beads“. Auf der reinen Ta₂O₅-Oberfläche sind keine „Magnetic Beads“ mehr sichtbar, dahingegen scheinen sich in bzw. auf den Makrophagen selbst „Magnetic Beads“ zu befinden. Diese tragen auch nach einem Wechsel der Magnetposition weiterhin zu deren Aktivierung bei.

Durch das Wechseln der Messkultur nach jedem Ansäuerungszyklus und durch das Verbleiben von „Magnetic Beads“ an/in den Makrophagen selbst an Messspot 1 hat der Anteil an frei beweglichen „Magnetic Beads“ in der Messlösung immer weiter abgenommen. Dies kann die verringerte Aktivitätsänderung an Messspot 16 auch nach der Positionsänderung des Magneten erklären.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Bis heute sind die praktischen Anwendungen der Biosensoren auf wenige konkrete Beispiele beschränkt, wie z.B. der Glucosebestimmung. Dabei kann das Feld der Biosensoren auf die Einführung komplexer biologischer Erkennungssysteme, wie Zellen, erweitert werden, um wichtige neue Erkenntnisse zu erhalten. Es gibt drei wesentliche Vorteile, die für den Gebrauch von Zellen sprechen: Als erstes wären die „Gruppeneffekte“ wie Toxizität, Mutagenität oder pharmakologische Aktivität zu nennen, die durch die Sensortechnik zugänglich gemacht werden. Zweitens können interne Verstärkungskaskaden genutzt werden, um die Empfindlichkeit des Gerätes zu erhöhen. Drittens sind Zellen die kleinste biologische Einheit, die sich selbstversorgt. Im Hinblick auf die Kosten, die für einen Ganzzellbiosensor entstehen, sind diese relativ niedrig, da im Falle der Nutzung von nicht neuronalen Zellen eine preiswerte Kultivierung der Zellen möglich ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Ansätze zur Entwicklung eines Ganzzellbiosensors zu etablieren. Dazu wurden unterschiedliche Modellapplikationen auf der SPR-Technologie-Plattform umgesetzt.

Als Basis für das Verhalten von Krebszellen auf Zuckeroberflächen dienten selbstorganisierende Zucker-Lektin Bindungen. Um mögliche Zucker, als Immobilierungsgrundlage festlegen zu können, wurden verschiedene Zuckeroberflächen erzeugt und durch ein Lektin-Screening charakterisiert.

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens der Lektine zu den Zuckeroberflächen hat gezeigt, dass eine Charakterisierung, insbesondere der Bindungsdomänen, mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz grundsätzlich möglich ist. Somit ist ein Screening auf Lektine sehr gut zu realisieren. Die in der Literatur beschriebenen Spezifitäten zwischen den Lektinen und den entsprechenden Zuckern konnten wiedergegeben werden. Für das Concanavalin A mit seiner Spezifität für Mannan wurde der K_D -Wert berechnet. Dieser stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen Wert weitgehend überein.

Aufgrund der sehr guten Ergebnisse für das Zucker-Lektin Paar ConA–Mannan, wurde diese Immobilierungsstrategie als Basis für die Versuchsreihe mit den Krebszellen verwendet.

Das Bindungsverhalten derartiger Oberflächen wurde dann an NCI-H125-Zellen sowie an Lewis Lung Carcinom Zellen untersucht. Dabei wurden zwei Immobilierungsstrategien erfolgreich umgesetzt. Zum einen wurden die Zellen über Glykoproteinstrukturen der Zellmembran direkt auf einer Mannanoberfläche immobilisiert, zum anderen erfolgte die Immobilisierung über Glykostrukturen der Zellmembran in Form eines Zucker-Lektin Sandwiches. Beide Zelllinien zeigten ein ausgeprägtes Bindungsverhalten auf mannanbeschichteten Oberflächen. Die Reaktion

der Zellen auf den Kontakt mit dem Lektin Concanavalin A war jedoch völlig unterschiedlich. Es konnte gezeigt werden, dass die NCI-H125-Zellen nach der Immobilisierung deutlich verändert waren und kleine Abschnürungen aufwiesen, die sehr an apoptotische Vorgänge erinnern, wohingegen die Lewis Lung Carcinom Zellen teilweise zusammenhängende Zellrasen ausbildeten und keinerlei Veränderungen in ihrem Aussehen aufwiesen.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über apoptotische Vorgänge mittels SPR wurde im Hinblick auf eine Mistellektinbestimmung in Fertigarzneimitteln ein Mistellektin-Assay entwickelt. Die Detektion des rekombinanten Mistellektin I (rMLI) erfolgte durch zwei verschiedene monoklonale Anti-MLI-Antikörper. Es zeigten sich gute Ergebnisse für die Antikörper 5H8 und 5F5, wobei der monoklonale Antikörper 5H8 als Fänger- und der monoklonale Antikörper 5F5 als Detektionsantikörper diente. Hingegen zeigte die Verwendung der monoklonalen Anti-MLI-Antikörper MNA4 und MNA9, sowohl als Fänger- als auch als Detektionsantikörper unzureichende Änderungen des Messsignals.

Die Visualisierung des nicht enzymatischen Schichtdickenabbaus des Polymers Polyethylencarbonat (PEC) durch Superoxidradikalanionen wurde mit Hilfe von murinen Makrophagen der Zelllinie J774A.1 etabliert. Hierzu wurde anfangs auf der SPI-Messplattform mit zwei unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien für die Makrophagen gearbeitet. Sowohl die Prä-Immobilisierung als auch die Immobilisierung *in situ* zeigten nicht zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich des Polymerabbaus. Ein Durchflusssystem zur Immobilisierung von Makrophagen scheint nicht geeignet zu sein. Die Gefahr der Desorption des Polymerfilms vom Glaträger ist dabei zu hoch. Auch durch eine sehr geringe Flussrate konnten die Makrophagen in ihrer Adhärenz beeinflusst werden und es kam zu Veränderungen auf der Oberfläche des polymerbeschichteten Glaträgers, die sich in einer scheinbaren Schichtdickenzunahme des Polymers zeigten.

Die Übertragung der Bioabbaubarkeitsstudie des Polyethylencarbonats auf die SPR-Messplattform zeigte dahingegen gute Ergebnisse. Hier war es möglich, den realen Abbau des Polymers in Echtzeit in Abhängigkeit von der Zeit und der verwendeten Zellkonzentration zu zeigen. Nach einer kurzen Sedimentationszeit der Makrophagen begann der nicht enzymatische Abbau des Polyethylencarbonats. Die Verwendung niedriger Zellkonzentrationen führte zu einer langsameren Geschwindigkeit im Abbau des Polymers, wohingegen eine höhere Zellkonzentration zu einer größeren Abbaurrate führte. Die Abbaugeschwindigkeit konnte mit den Triggerfaktoren *Concanavalin A*, LPS aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* beeinflusst werden. Dabei zeigte das LPS aus *Escherichia coli* den stärksten Effekt auf die Makrophagen, was sich in der größten Abbaurrate zeigte.

Gram negative Bakterien als Trigger für Makrophagen wurden über ein Bakterienmembranmodell auf der SPR-Plattform nachgeahmt. Hierfür wurden Liposomen mit Lipopolysaccharid (LPS) funktionalisiert und mittels spezifischem

Antikörper detektiert. Die Vorteile eines solchen Bakterienmembranmodells, die höhere Sicherheit für den Analytiker (kein Einsatz lebender Mikroorganismen), keine störenden Einflüsse durch andere Oberflächenantigenstrukturen und der Fokussierung auf nur eine bestimmte Membranstruktur (in diesem Fall LPS), konnten so genutzt werden. Zur Funktionalisierung der Liposomen wurde LPS aus *Legionella pneumophila* und *Salmonella typhimurium* verwendet. Die Versuche mit den „künstlichen Legionellen“ waren nicht zufriedenstellend, da das Detektionssignal durch den Anti-*Legionella*-Antikörper zu niedrig war. Die Verwendung von Polymyxin B und Polymyxin B-Nonapeptid führte zu Polymyxin-LPS-Komplexen, die eine bessere Ausrichtung des LPS in der Liposomenmembran zur Folge haben sollten. Eine Verbesserung des Messsignals konnte dadurch nicht festgestellt werden.

Daraufhin wurde das Bakterienmembranmodell auf das LPS aus *Salmonella typhimurium* übertragen. Hierbei ergaben sich sehr gute Ergebnisse mit den „künstlichen Salmonellen“. Es konnte eine Bakterienmembran mit LPS aus *Salmonella typhimurium* nachgeahmt werden, und die Interaktion mit dessen spezifischen Antikörper untersucht werden. Der Gebrauch von einem (LPS-Polymyxin B-Nonapeptid)-Komplex zur Modifizierung der Liposomen zeigte eine Verbesserung des Messsignals.

Eine weitere Form des Triggers der murinen Makrophagen der Zelllinie J774A.1 wurde mit LPS-gekoppelten Magnetic Beads auf der LAPS Messplattform umgesetzt. Die Stimulierung der Makrophagen wurde durch die Präsenz des LPS-Magnetic Bead-Komplexes auf den verschiedenen Messspots erreicht. Unter Zuhilfenahme eines Permanentmagneten konnte so ein Konzentrationsgradient in der Messlösung erzeugt werden. Die metabolische Aktivität der Makrophagen konnte so in Form der Änderung des pH-Wertes gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Ganzzellbiosensors konnten unterschiedliche Ansätze verfolgt und umgesetzt werden. Als Ergebnis sind eigenständige Assays und Modellapplikationen entstanden.

Ein Lektin-Screening konnte erfolgreich entwickelt und etabliert werden. Dieses war die Grundlage für die Untersuchung von Krebszellen auf einem entsprechenden Zucker-Lektin-System. Um die ersten gewonnenen Erkenntnisse über das Verhalten von Krebszellen weiter zu vertiefen, müssten weitere Untersuchungen mit Zellen, die bestimmte Oberflächenantigenstrukturen aufweisen, sei es Kohlenhydrate oder Lektinstrukturen, durchgeführt werden. Hierbei wird das Lektin-Screening die Auswahl eines geeigneten Zucker-Lektin-Systems erleichtern.

Der Mistellektin-Assay zur Bestimmung des Mistellektin I (MLI) konnte unter Zuhilfenahme von zwei monoklonalen Antikörpern etabliert werden. Hier steht die Übertragung des Assays zur Quantifizierung des MLI in mistelhaltigen Fertigarzneimitteln an. Darüber hinaus können die Ergebnisse aus den MLI-Versuchsreihen für die Entwicklung von Immunotoxinen auf MLI Basis verwendet werden. Immunotoxine bestehen aus einem Rezeptorliganden oder Antikörper und

einer zytotoxisch hochwirksamen Substanz, die entweder genetisch oder chemisch rekombinant miteinander gekoppelt wurden. Nach Antigenbindung werden die Zellgifte selektiv in Zielzellen eingeschleust. Tumorspezifische Oberflächenmoleküle können so für eine zielgerichtete Krebsbehandlung genutzt werden, indem sie die Aufnahme von intrazellulär wirkenden Toxinen vermitteln. Gesunde Zellen, die das Oberflächenantigen nicht tragen, bleiben dabei unversehrt.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit auf der Messplattform der SPR die Visualisierung des Schichtdickenabbaus eines Polymers (Polyethylencarbonat, PEC) durch Makrophagen in Abhängigkeit von Triggerfaktoren gezeigt werden. Um die gewonnenen Kenntnisse bezüglich der Geschwindigkeit des Polymerabbaus weiter auszubauen, können die Bioabbaubarkeitsstudien des PEC mit bestimmten Arzneistoffen als Trigger durchgeführt werden.

Als weiterer Stimulus für Makrophagen könnten auch die „künstlichen Bakterien“, die im Zuge der Etablierung des Bakterienmembranmodells entwickelt wurden, eingesetzt werden. Diese Art des Triggers würde dem natürlichen Stimulus durch lebende Gram negative Bakterien nahe kommen. Das Verhalten der Makrophagen auf die „künstlichen Bakterien“ ist in weiteren Messreihen zu evaluieren.

Die Übertragung der entwickelten Applikationen auf die Messplattform des LAPS ist eine Herausforderung für die nahe Zukunft. Mit der ersten Versuchsreihe der metabolischen Aktivitätsmessung mit murinen Makrophagen, getriggert mit LPS modifizierten Magnetic Beads, ist der Grundstein für weitere Anwendungen im Bereich der Pharmazie und Medizin gelegt. Der Vorteil der ortsabhängigen Messung des pH-Wertes kann, gerade bei der Übertragung zellbasierter Systeme auf den Sensor, genutzt werden. Ein spannendes Feld bieten hier die eukaryotischen Zellen in Form von Krebszelllinien. Die Übertragung der Zellen auf eine geeignete biosensitive Sensorschicht des LAPS bietet die Möglichkeit, die metabolische Aktivität der Zellen, insbesondere unter Einwirkung von Zytostatika, zu erforschen. Ein Modell-Screening auf Subpopulationen innerhalb einer Krebszellkultur, bestehend aus zwei unterschiedlichen Zelllinien, wäre ein weiterer Aspekt, der verfolgt werden kann. Die spätere Anwendung des Screenings auf Subpopulationen in Tumorgewebeschnitten wäre das Fernziel dieser Versuchsreihe.

6 Literaturverzeichnis

Acemoglu, M., Nimmerfall, F., Bantle, S. und Stoll, G.H.: "Poly(ethylene carbonate)s, part I: Synthesis and structural effects on biodegradation". *Journal of Controlled Release* 49 (1997), 263-276

Adami, M., Sartore, M., Baldini, E., Rossi, A. und Nicolini, C.: "New measuring principle for LAPS devices". *Sensors and Actuators B: Chemical* 9 (1992), Nr.1, 25-31

Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G., Maluchenko, N.V., Moysenovich, M.M., Bulah, Y.S. und Kirpichnikov, M.P.: "Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport". *FEBS Letters* 464 (1999_a), 63-66

Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G., Moysenovich, M.M., Maluchenko, N.V., Weyhenmeyer, R. und Kirpichnikov, M.P.: "Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm". *FEBS Letters* 452 (1999_b), 211-214

Ainsworth, G.C., Brown, A.M. und Brownlee, G.: "'Aerosporin', an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer". *Nature* 160 (1947), 263

Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M. und Miyake, K.: "Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268 (2000), Nr.1, 172-177

Alexander, C. und Rietschel, E.T.: "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity". *Journal of Endotoxin Research* 7 (2001), Nr.3, 167-202

Allen, T.M. und Everest, J.M.: "Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 226 (1983), 539-544

Amersham Biosciences: *Affinity chromatography handbook: Principles and methods* 1. (2001)

Antalis, C., Fogel, S. und Ballou, C.E.: "Genetic control of yeast mannan structure". *The Journal of Biological Chemistry* 248 (1973), Nr.13, 4655-4659

Baars-Hibbe, H.: *Renaturierung von rekombinantem Mittelektin I aus Inclusion Bodies*. Braunschweig, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften, Dissertation, 2007

Backman, P. und Wadsö, I.: "Cell growth experiments using a microcalorimetric vessel equipped with oxygen and pH electrodes". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 23 (1991), 283-293

Bagley, D.M., Broner, L.H., Silva, O. de, Cottini, M., O'Brien, K.A.F., Uttley, M. und Walker, A.P.: "An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*". *Toxicology in Vitro* 6 (1992), 275-284

Bakowsky, U., Rettig, W., Bendas, G., Vogel, J., Bakowsky, H., Harnagea, C. und Rothe, U.: "Characterization of the interactions between various hexadecylmannoside-phospholipid model membranes with the lectin concanavalin A". *Chemical Physics* 2 (2000), 4609-4614

Bangham, A.D., Standish, M.M. und Watkins, J.C.: "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids". *Journal of Molecular Biology* 13 (1965), 238-252

Banks-Schlegel, S.P., Gazdar, A.F. und Harris, C.C.: "Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines". *Cancer Research* 45 (1985), 1187-1197

Barbieri, L., Battelli, M.G. und Stirpe, F.: "Ribosome-inactivating protein from plants". *Biochimica et Biophysica Acta* 1154 (1993), 237-282

- Basler, T.: *Mechanismen der Mykobakterien-abhängigen Modulation von Makrophagen und deren Auswirkungen auf Enterozyten*. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Fachbereich Mikrobiologie, Dissertation, 2006
- Beitze-Breyhan, K.: *Der Einfluss von Fucoidin auf das Entstehen von sekundärem Lungen-und Leberversagen in einem two-hit Modell von Ischämie und Reperfusion und caecaler Ligation und Punktion in der Maus*. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Dissertation, 2000
- Benedict, R.G. und Langlykke, A.F.: "Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*". *The Journal of Bacteriology* 54 (1947), 24-25
- Berthelot, P., Grattard, F., Ros, A., Lucht, F. und Pozzetto, B.: "Nosocomial legionellosis outbreak over a three-year period: investigation and control". *Clinical Microbiology and Infection* 4 (1998), 385-391
- Bertram, J.S. und Janik, P.: "Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture". *Cancer Letters* 11 (1980), 63-73
- Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.J., Burrichter, H., Oette, K. und Pulverer, G.: "Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients". *The Clinical Investigator* 70 (1992), 658-661
- Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Geisel, J. und Pulverer, G.: „Vergleichende Untersuchungen zur immunreaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistellektin: Reinsubstanz gegen standardisierten Extrakt“. *Arzneimittelforschung* 43 (1993), 166-169
- Beutler, B. und Rietschel, E.T.: "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin". *Nature Reviews Immunology* 3 (2003), Nr.2, 169-176
- Bittiger, H.S. und Schnebli, H.P.: *Concanavalin A as a tool*. London: John Wiley & Sons, 1976
- Bleicher, M.: *Halbleiter-Optoelektronik*. Heidelberg: Hüthig Verlag, 1986

Bocci, V.: "Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy". *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 7 (1993), 1-6

Bousse, L., McReynolds, R.J., Kirk, G., Dawes, T., Lam, P., Bemiss, W.R. und Parce, J.W.: "Micromachined multichannel systems for the measurement of cellular metabolism". *Sensors and Actuators. B, Chemical* 20 (1994), 145-150

Bousse, L.: "Whole cell biosensors". *Sensors and Actuators. B, Chemical* 34 (1996), 270-275

Brade, H., Moll, H. und Rietschel, E.T.: "Structural investigations on the inner core region of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* rough mutants". *Biomedical Mass Spectrometry* 12 (1985), Nr.10, 602-609

Brecht, A.: *Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen*. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation, 1993

Brewer, C.F. und Bhattacharyya, L.: "Specificity of concanavalin A binding to asparaginyl-linked glycopeptides". *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr.16, 7306-7310

Broner, L.H., Miller, K.R., Owicki, J.C., Parce, J.W. und Muir, V.C.: "Testing ocular irritancy in vitro with the silicon microphysiometer". *Toxicology in Vitro* 5 (1991), 277-284

Brousseau, J.-L., Vidon, S. und Leblanc, R.M.: "Investigation of the chemical nature of two-dimensional polymerized octadecyltrimethoxysilane Langmuir films by inelastic electron tunneling spectroscopy". *Journal of Chemical Physics* 108 (1998), Nr.17, 7391-7396

Brower, M., Carney, D.N., Oie, H.K., Gazdar, A.F. und Minna, J.D.: "Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum free defined medium". *Cancer Research* 46 (1986), 798-806

Bryant, M.L., Stoner, G.D. und Metzger, R.P.: "Protein-bound carbohydrate content of normal and tumorous human lung tissue". *Biochimica et Biophysica Acta* 343 (1974), 226-231

Burghardt, F.: *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1992

Büssing, A. und Schietzel, M.: "Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins". *Anticancer Research* 19 (1999), 23-28

Carbone, D.P., Koros, A.M., Linnoila, R.I., Jewett, P. und Gazdar, A.F.: "Neural cell adhesion molecule expression and messenger RNA splicing patterns in lung cancer cell lines are correlated with neuroendocrine phenotype and growth morphology". *Cancer Research* 51 (1991), 6142-6149

Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H. und Minna, J.D.: "Establishment and identification of small cell cancer cell lines having classic and variant features". *Cancer Research* 45 (1985), 2913-2923

Catroux, P., Rougier, A., Dossou, K.G. und Cottin, M.: "The silicon microphysiometer for testing ocular toxicity in vitro". *Toxicology in Vitro* 7 (1993), 465-469

Chihara, S., Tobita, T., Yahata, M., Ito, A. und Koyana, Y.: "Enzymatic degradation of colistin isolation and identification of α -N-acetyl α,γ -diaminobutyric acid and colistin nonapeptide". *Agricultural and Biological Chemistry* 37 (1973), 2455-2463

Clarke, A.E. und Denborough, M.A.: "The interaction of concanavalin A with blood-group substance glycoproteins from human secretions". *Biochemical Journal* 121 (1971), Nr.5, 811-816

Cody, S.H., Abbott, S. L., Marfin, A.A., Schulz, B., Wagner, P., Robbins, K., Mohle-Boetani, J.C. und Vugia, D.J.: "Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California". *Journal of the American Medical Association* 281 (1999), Nr.19, 1805–1810

Crilly, J., Power, E.P., Cowman, H.J., Cryan, B. und Buckley, J.F.: "Epidemiology of Salmonella infection in the south of Ireland". *Irish Journal of Agricultural & Food Research* 40 (2001), 215-226

Cunningham, B.A., Wang, J.L., Waxdal, M.J. und Edelman, G.M.: "The covalent and threedimensional structure of concanavalin A (II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3)". *The Journal of Biological Chemistry* 250 (1975), Nr.4, 1503-1512

D'Aoust, J.Y.: "Salmonella species". In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.H.: *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1997

Danner, R.L., Joiner, K.A., Rubin, M., Patterson, W.H., Johnson, N., Ayers, K.M. und Parrillo, J.E.: "Purification, toxicity, and antiendotoxin activity of polymyxin B nonapeptide". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (1989), 1428-1434

Debray, H.: "The plasma membrane glycoconjugates of normal and transformed cells". *Bulletin du cancer* 66 (1979), 353-372

Diamandis, E.P. und Christopoulos, T.K.: *Immunoassay*. San Diego: Academic Press, 1996

Drickamer, K.: "Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins". *The Journal of Biological Chemistry* 263 (1988), Nr.20, 9557-9560

Duwe, A.K., Rugar, C.A., Horsman, G.B. und Vas, S.I.: "In vitro cytotoxicity and antibiotic activity of polymyxin B nonapeptide". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30 (1986), 340-341

Dwek, R.A.: "Glycobiology: Toward understanding the function of sugars". *Chemical Reviews* 96 (1996), Nr.2, 683-720

Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. und Lentzen, H.: "Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain". *European Journal of Biochemistry* 264 (1999_a), 775-784

Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Witthohn, K., Zinke, H. und Lentzen, H.: "Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chain". *European Journal of Biochemistry* 265 (1999_b), 788-797

Edwards, P.R. und Leatherbarrow, R.J.: "Determination of association rate constants by an optical biosensor using initial rate analysis". *Analytical Biochemistry* 246 (1997), 1-6

Eggins, B.R.: *Biosensors: an introduction*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1996

Elmore, S.: "Apoptosis: a review of programmed cell death". *Toxicologic Pathology* 35 (2007), Nr.4, 495-516

Endo, Y., Tsurugi, K. und Franz, F.: "The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein". *FEBS Letters* 231 (1988), 378-380

Ermolenko, Y.E., Yoshinobu, T., Mourzina, Y.G., Vlasov, Y.G., Schöning, M.J. und Iwasaki, H.: „Laser-scanned silicon transducer (LSST) as a multisensor system“. *Sensors and Actuators B: Chemical* 103 (2004), Nr.1-2, 457-462

Forsberg, K., Bergh, J. und Westermark, B.: "Expression of functional PDGF β receptors in a human large cell lung carcinoma cell line". *International Journal of Cancer* 53 (1993), 556-560

Franz, H., Ziska, P. und Kindt, A.: "Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.)". *The Biochemical Journal* 195 (1981), 481-484

Franz, H.: „Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel“. *Pharmazie* 40 (1985), 97-104

Funahara, Y. und Nikaido, H.: "Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*". *Journal of Bacteriology* 141 (1980), Nr.3, 1463-1465

Gabius, H.-J. und Gabius, S.: „Tumorlektinologie - Status und Perspektiven klinischer Anwendung“. *Naturwissenschaften* 77 (1990), 505-514

Gabius, H.-J., Gabius, S., Joshi, S.S., Koch, B., Schröder, M., Manzke, W.M. und Westerhausen, M.: "From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: Will there be a reason for oncological application of Mistletoe?" *Planta Medica* 60 (1993), 2-7

Gabius, H.-J. und Gabius, S.: „Die Misteltherapie auf dem naturwissenschaftlichen Prüfstand“. *Pharmazeutische Zeitung* 139 (1994), 9-16

Gabius, S., Kayser, K. und Gabius, H.-J.: „Analytische, immunologische und tierexperimentelle Voraussetzungen für die klinische Prüfung der auf Lektin Gehalt standardisierten Misteltherapie“. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 23 (1991), 113-119

Gaisford, W.C., Richardson, N.J., Haggett, B.G.D. und Rawson, D.M.: "Microbial biosensors for environmental monitoring". *Biochemical Society Transactions* 19 (1991), 15-18

Ganguly, C. und Das, S.: "Plant lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response". *Chemotherapy* 40 (1994), 272-278

Gauglitz, G., Brecht, A., Kraus, G. und Nahm, W.: "Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin layers". *Sensors and Actuators B* 11 (1993), 21-27

Gazdar, A.F.: "Advances in the biology of non small cell lung cancer". *Chest* 89 (1989), 4 Supplement, 277S-283S

Glick, M.C., Schlesinger, H. und Hummeler, K.: "Glycopeptides from the surface of human neuroblastoma cells". *Cancer Research* 36 (1976), 4520-4524

Glimelius, B. und Pintar, J.E.: "Analysis of developmentally homogeneous neural crest cell populations *in vitro*. IV. Cell proliferation and synthesis of glycosaminoglycans". *Cell Differentiation* 10 (1981), 173-182

Gmeiner, J., Luderitz, O. und Westphal, O.: "Biochemical studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants.6. Investigations on the structure of the lipid A component". *European Journal of Biochemistry / FEBS* 7 (1969), Nr.3, 370-379

Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. und Smith, E.E.: "Protein-carbohydrate interaction. II: Inhibition studies of the interaction of concanavalin A with polysaccharides". *Biochemistry* 4 (1965), Nr.5, 876-883

Grattarola, M. und Massobrio, G.: "Bioelectronics handbook: MOSFETs, biosensors and neurons". New York: McGraw-Hill, 1998

Green, R.J., Frazier, R.A., Shakesheff, K.M., Davies, M.C., Roberts C.J. und Tendler, S.J.B.: "Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials". *Biomaterials* 21 (2000), 1823-1835

Gregoriadis, G.: "The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts)". *The New England Journal of Medicine* 295 (1976), 765-770

Grimm, S.: „Die Apoptose: Programmierter Zelltod“. *Chemie in unserer Zeit* 37 (2003), Nr.3, 172-178

Guilbault, G.G.: "Enzyme electrode probes". *Methods in Enzymology* 137 (1988), 14-29

Hafeman, D.G., Parce, J.W. und McConnell, H.M.: "Light-addressable potentiometric sensor for biochemical systems". *Science* 240 (1988), 1182-1185

Hajto, T., Hostanska, K. und Gabius, H.-J.: "Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients". *Cancer Research* 49 (1989), Nr.17, 4803-4808

Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. und Gabius, H.-J.: "Increased secretion of tumor necrosis factor α , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extracts". *Cancer Research* 50 (1990), Nr.11, 3322-3326

Hammarström, S. und Kabat E.A.: "Studies on specificity and binding properties of the blood group A reactive hemagglutinin from *Helix pomatia*". *Biochemistry* 10 (1971), Nr.9, 1684-1692

Harman, D.: "Role of free radicals in aging and disease". *Annals of the New York Academy of Sciences* 673 (1992), 126-141

Hartmann, M.: *Neue Ansätze in der biomolekularen Interaktionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung pharmazeutischer und lebensmittelchemischer Fragestellungen*". Bonn, Universität, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Dissertation, 2004

Haworth, W.N., Hirst, L. und Isherwood, F.A.: "Polysaccharides. Part XXIV. Yeast Mannan". *Journal of the Chemical Society* (1937), 784-791

Heiny, B.M.: „Additive Therapie mit standardisiertem Mistelextrakt reduziert die Leukopenie und verbessert die Lebensqualität von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom unter palliativer Chemotherapie“. *Krebsmedizin* 12 (1991), 334-344

Heiny, B.M. und Beuth, J.: "Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotential in breast cancer patients". *Anticancer Research* 14 (1994), 1339-1342

Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J.E., Bienkowski, P.R., White, D.C. und Sayler, G.S.: "Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium". *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994), 1487-1494

Hirayama, C. und Sakata, M.: "Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 781 (2002), 419-432

Homola, J., Yee, S.S. und Gauglitz, G.: "Surface plasmon resonance sensors: review". *Sensors and Actuators B* 54 (1999), 3-15

Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. und Cullis, P.R.: "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure - characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 812 (1985), Nr.1, 55-65

Horisberger, M.: "An application of ellipsometry. Assessment of polysaccharide and glycoprotein interaction with lectin at a liquid/solid interface". *Biochimica et Biophysica Acta* 632 (1980), Nr.2, 298-309

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. und Akira, S.: "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product". *Journal of Immunology* 162 (1999), 3749-3752

Huang C.: "Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics". *Biochemistry* 8 (1969), 344-352

Imoto, M., Kusumoto, S., Shiba, T., Rietschel, E.T., Galones, C. und Lüderitz, O.: "Chemical structure of *Escherichia coli* lipid A". *Tetrahedron Letters* 26 (1985), 907-908

Jack, A., Weinzierl, J. und Kalb, A.: "An X-ray crystallographic study of demetallized concanavalin A". *Journal of Molecular Biology* 58 (1971), 389-395

Jäggi, C., Musielski, H., Urech, K. und Schaller, G.: "Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations". *Arzneimittel-Forschung* 45 (1993), Nr.8, 905-909

Janeway, C.A. und Travers, P.: *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995

Järnefelt, J., Finne, J., Krusius, T. und Rauvala, H.: "Protein-bound oligosaccharides of cell membranes". *Trends in Biochemical Sciences* 3 (1978), 110-114

Kamio, Y. und Nikaido, H.: "Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium". *Biochemistry* 15 (1976), Nr.12, 2561-2570

Kanellopoulos, P.N., Tucker, P.A., Pavlou, K., Agianian, B. und Hamodrakas, S.J.: "A triclinic crystal form of the lectin concanavalin A". *Journal of Structural Biology* 117 (1996_a), 16-23

Kanellopoulos, P.N., Pavlou, K., Perrakis, A., Agianian, B., Vorgias, C.E., Mavrommatis, C., Soufi, M., Tucker, P.A. und Hamodrakas, S.J.: "The crystal structure of the complexes of concanavalin A with 4'-nitrophenyl-alpha-D-mannopyranoside and 4'-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside". *Journal of Structural Biology* 116 (1996_b), Nr.3, 345-355

Karahashi, H. und Amano, F.: "Changes of caspase activities involved in apoptosis of a macrophage-like cell line J774.1/JA-4 treated with lipopolysaccharide (LPS) and cycloheximide". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23 (2000_a), Nr.2, 140-144

Karahashi, H. und Amano, F.: "Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide: different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ". *Journal of Endotoxin Research* 6 (2000_b), Nr.1, 33-39

Karube, I., Sode, K., Suzuki, M. und Nakahara, T.: "Microbial sensor for preliminary screening of mutagens utilizing a phage induction test". *Analytical Chemistry* 61 (1989), 2388-2391

Kawasaki, T. und Ashwell, G.: "Carbohydrate structure of glycopeptides isolated from an hepatic membrane-binding protein specific for asialoglycoproteins". *The Journal of Biological Chemistry* 251 (1976), 5292-5299

Keusgen, M.: *Biosensorische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden*. Aachen: Shaker Verlag, 1999

Keusgen, M.: "Biosensors: new approaches in drug discovery". *Naturwissenschaften* 89 (2002), 433-444

Keusgen, M., Schöning, M.J. und Jünger, M.: „Entwicklung eines reagenzlosen Cyanid-Biosensors auf der Basis von EIS-Strukturen“. *Deutsche Patentanmeldung* DE 1031296.6, (2003)

- Khan, F., Khan, R., Sherwani, A., Mohmood, S. und Azfer, A.: "Lectins as markers for blood grouping". *Medical Science Monitor* 8 (2002), Nr.12, 293-300
- Khoursandi, S.: *Nachweis und Reinigung der Myristoyl-CoA: Protein N-Myristoyltransferase (NMT) aus Trypanosoma brucei brucei und Herstellung monoklonaler Antikörper gegen trypanosomale NMT und GPI-spezifische Phospholipase C (GPI-PLC)*. Bonn, Universität, Dissertation, 2000
- Kilpatrick, D.C.: "Animal lectins: a historical introduction and overview". *Biochimica et Biophysica Acta* 1572 (2002), 187-197
- Kitagawa, Y., Ameyama, M., Nakashima, K., Tamiya, E. und Karube, I.: "Amperometric alcohol sensor based on an immobilised bacteria cell membrane". *The Analyst* 112 (1987), Nr.12, 1747-1749
- Kitamura, M.: "NF-kB-mediated self defense of macrophages faced with bacteria". *European Journal of Immunology* 29 (1999), Nr. 5, 1647-1655
- Kloock, J.P.: *Herstellung und Charakterisierung von Sensormembranen aus Chalkogenidglasschichten für den Einsatz als Schwermetallsensoren in Flüssigkeiten*. Ilmenau, Technische Universität Ilmenau, Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, Dissertation, 2008
- Kobata, A.: "Structures and functions of the sugar chains of cell surface glycoproteins". *Cell Structure and Function* 4 (1979),169-181
- Kornfeld, S. und Kornfeld, R.: "Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units". In: Lennarz, W.J. (Hrsg.): *Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. New York: Plenum Press, 1980, 1-34
- Kosenko, L.V.: "Comparative characteristics of carbohydrate binding by lectins from broad bean, pea, common vetch and lentil seeds". *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (2002), Nr.5, 718-724

Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W. und Betzel, C.: "Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257 (1999), 418-424

Kretschmann, E. und Raether, H.: "Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light". *Zeitschrift für Naturforschung Teil A* 23 (1968), 2135-2136

Kulkarni, G.V. und McCulloch, C.A.C.: "Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: The role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity". *Journal of Cellular Physiology* 165 (1995), 119-133

Lee, R.T., Gabius, H.-J. und Lee, Y.C.: "Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin". *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr.33, 23722-23727

Lelie, D. van der, Corbisier, P., Baeyens, W., Wuertz, S., Diels, L. und Mergeay, M.: "The use of biosensors for environmental monitoring". *Research in Microbiology* 145 (1994), 67-74

Lentzen, H., Eck, J., Baur, A. und Zinke, H.: „Rekombinantes Mistellektin“. *Europäische Patentschrift* EP 0751221B1, (1998)

Levin, J. und Bang, F.B.: "A description of cellular coagulation in the limulus". *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 115 (1964_a), 337-345

Levin, J. und Bang, F.B.: "The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood". *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 115 (1964_b), 265-274

Li, N., Endo, H., Hayashi, T., Fujii, T., Takal, R. und Watanabe, E.: "Development of a trimethylamine gas biosensor system". *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), 593-599

Liedberg, B., Nylander, C. und Lundström, I.: "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing". *Sensors and Actuators* 4 (1983), Nr.2, 299-304

Lis, H. und Sharon, N.: "Lectins in higher plants". In: Marcus, A. (Hrsg): *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Volume 6 (Proteins and Nucleic Acids). New York: Academic Press, 1981, 371-447

Lis, H. und Sharon, N.: "Lectin-carbohydrate interactions". *Current Opinion in Structural Biology* 1 (1991), 741-749

Lloyd, C.W.: "Sialic acid and the social behaviour of cells". *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 50 (1975), 325-350

Loris, R., Casset, F., Bouckaert, J., Pletinckx, J., Dao-Thi, M.H., Poortmans, F., Imberty, A., Perez, S. und Wyns, L.: "The monosaccharide binding site of lentil lectin: an X-ray and molecular modelling study". *Glycoconjugate Journal* 11 (1994), Nr.6, 507-517

Lotan, R. und Raz, A.: "Lectins in cancer cells". *Annals of the New York Academy of Sciences* 551 (1988), 385-398

Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. und Uhlenbruck, G.: "The lectin from *Viscum album* L. – isolation, characterisation, properties and structure". *The International Journal of Biochemistry* 11 (1980), 429-435

Maitra, S.K., Nachum, R. und Pearson, F.C.: "Establishment of beta-hydroxy fatty acids as chemical marker molecules for bacterial endotoxin by gas chromatography-mass spectrometry". *Applied and Environmental Microbiology* 52 (1986), 510-514

Medzhitov, R. und Janeway, C.A.Jr.: "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition". *Cell* 91 (1997_a), Nr.3, 295-298

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C.A.Jr.: "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity". *Nature* 388 (1997_b), Nr.6640, 394-397

Medzhitov, R. und Janeway, C.Jr.: "Advances in immunology: innate immunity". *The New England Journal of Medicine* 343 (2000), 338-344

Mengs, U., Göthel, D. und Leng-Peschlow, E.: "Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research". *Anticancer Research* 22 (2002), 1399-1408

Meusel, M. und Vering, T.: "Workshop report: concerted action "Biosensor Stability" in the EC-program on industrial and materials technologies (BRITE-EURAM)". *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998), IX–XI

Mikeska, R., Wacker, R., Arni, R., Singh, T.P., Mikhailov, A., Gabdoulkhakov, A., Voelter, W. und Betze, C.: "Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties". *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* F61 (2005), 17-25

Milka, P., Krest, I. und Keusgen, M.: "Immobilization of alliinase on porous aluminium oxide". *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2000), Nr.3, 344-348

Moldovan, N.I.: "Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end". *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11 (2002), 179-194

Möller, W., Brown, D., Kreyling, W. und Stone, V.: "Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium". *Particle and Fibre Toxicology* 2 (2005), 7

Monack, D.M., Meccas, J., Ghori, N. und Falkow, S.: "Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), Nr.19, 10385-10390

Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. und Delannoy, P.: "Lectins as oligosaccharide receptors". In: Popper, H., Reutter, W., Gudat, F. und Köttgen, E. (Hrsg.): *Structural carbohydrates in the liver*. Boston: MTP Press Limited, 1983, 239-258

Moore, R.A., Bates, N.C. und Hancock, R.E.: "Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29 (1986), 496-500

Mühlradt, P.F. und Golecki, J.R.: "Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*". *European Journal of Biochemistry / FEBS* 51 (1975), Nr.2, 343-352

Müller, W.E., Arendes, J., Kurelec, B., Zahn, R.K. und Müller, I.: "Species-specific aggregation factor in sponges. Sialyltransferase associated with aggregation factor". *The Journal of Biological Chemistry* 252 (1977), 3836-3842

Nagata, Y und Burger, M.M.: "Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding". *The Journal of Biological Chemistry* 249 (1974), Nr.10, 3116-3122

Navarre, W.W. und Zychlinsky, A.: "Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies". *Cellular Microbiology* 2 (2000), Nr.4, 265-273

Nikaido, H. und Vaara, M.: "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability". *Microbiological Reviews* 49 (1985), Nr.1, 1-32

Nikitin, P.I., Gorshkov, B.G., Valeiko, M.V. und Rogov, S.I.: "Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface". *Quantum Electronics* 30 (2000), Nr.12, 1099-1104

Nikitin, P., Goshkov, B., Valeiko, M. und Nikitin, S.: "Multichannel optical biosensors for label free high-throughput screening". *SPIE Proceedings* 4578 (2001), 126-135

Niwa, H., Tonevitsky, A.G., Agapov, I.I., Sward, S., Pfüller, U. und Palmer, R.A.: "Crystal structure at 3Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose". *European Journal of Biochemistry* 270 (2003), 2739-2749

Novogrodsky, A. und Katchalski, E.: "Lymphocyte transformation induced by concanavalin A and its reversion by methyl-alpha-D-mannopyranoside". *Biochimica and Biophysica Acta* 228 (1971), Nr.2, 579-583

O'Shannessy, D.J., Burke, M.B., Soneson, K.K., Hensley, P. und Brooks, I.: "Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods". *Analytical Biochemistry* 212 (1993), 457- 468

Ofek, I., Cohen, S., Rahmani, R., Kabha, K., Herzig, Y. und Rubinstein, E.: "Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (1994), 374-377

Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. und Pihl, A.: "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe)". *The Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr.22, 13263-13270

Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J. und Papahadjopoulos, D.: "Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes" *Biochimica et Biophysica Acta* 557 (1979), Nr.1, 9-23

Olson, M.O.J. und Liener, I.E.: "Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean". *Biochemistry* 6 (1967), Nr.1, 105-111

Otto, A.: "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection". *Zeitschrift für Physik* 216 (1968), Nr.4, 398-410

Owicki, J.C. und Parce, J.W.: "Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification". *Biosensors & Bioelectronics* 7 (1992), 255-272

Owicki, J.C., Bousse, L., Hafeman, D.G., Kirk, G.L., Olson, J.D., Wada, H.G. und Parce, J.W.: "The light-addressable potentiometric sensor: principles and biological applications". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23 (1994), 87-113

Ozawa, T.: "Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases". *Biochimica et Biophysica Acta* 1271 (1995), Nr.1, 177-189

Paddle, B.M.: "Biosensors for chemical and biological agents of defense interest". *Biosensors & Bioelectronics* 11 (1996), 1079-1113

Parak, W. J.: *Zell-Halbleiter-Hybride*. München, Technische Universität, Fakultät für Physik, Dissertation, 1999

Parkin, J. und Cohen, B.: "An overview of the immune system". *Lancet* 357 (2001), 1777-1789

Pathak, S.S. und Savelkoul, H.F.: "Biosensors in immunology: the story so far". *Immunology Today* 18 (1997), Nr.10, 464-467

Patterson, S. und Isaacson, R.E.: "Genetics and pathogenesis of Salmonella". In: Torrence, M.E., Isaacson, R.E.: *Microbial food safety in animal agriculture, current topics*. Iowa State: University Press, 2003

Pearson, F.C., Caruana, R., Burkart, J., Katz, D.V., Chenoweth, D., Dubczak, J., Bohon, J. und Weary, M.: "The use of the limulus amebocyte lysate assay to monitor hemodialyzer-associated soluble cellulosic material (LAL-reactive material)". In: Watson, S.W., Levin, J. und Nowitzky, T.J. (Hrsg.): *Detection of bacterial endotoxins with the limulus amebocyte lysate test*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987, 211-222

Peumans, W.J., Hao, Q. und Van Damme, E.J.M.: "Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?" *The FASEB Journal* 15 (2001), 1493-1506

Piehler, J.: *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation, 1997

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. und Beutler, B.: "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene". *Science* 282 (1998), 2085-2088

Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. und Malo, D.: "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)". *Journal of Experimental Medicine* 189 (1999), 615-625

Rawson, D.M., Willmer, A.J. und Turner, A.P.: "Whole cell biosensors for environmental monitoring". *Biosensors* 4 (1989), 299-311

Reeke, G.N. Jr., Becker, J.W., Cunningham, B.A., Wang, J.L., Yahara, I. und Edelman, G.M.: "Structure and function of concanavalin A". In: Chowdhury, T.K. und Weiss, A.K.: *International Symposium on Concanavalin A., Norman, Oklahoma*. New York und London: Plenum Press, 1974

Richardson, N.J., Gardner, S. und Rawson, D.M.: "A chemically mediated amperometric biosensor for monitoring eubacterial respiration". *The Journal of Applied Bacteriology* 70 (1991), 422-426

Rietschel, E.T., Brade, L., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, U., Kusumoto, S. und Brade, H.: "Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains". In: Schrinner, E., Richmond, M.H., Seibert, G. und Schwarz, U. (Hrsg.): *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host*. Weinheim: VCH Publishers, 1988, 1-41

Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F. und et al.: "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function". *The FASEB Journal* 8 (1994), Nr.2, 217-225

Rivest, S., Lacroix, S., Vallieres, L., Nadeau, S., Zhang, J. und Laflamme, N.: "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223 (2000), Nr.1, 22-38

Roche, A.C., Barzilay, M., Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N., und Monsigny, M.: "Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by Lewis Lung Carcinoma cells". *Journal of Cellular Biochemistry* 22 (1983), 131-140

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. und Bazan, J.F.: "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), 588-593

Rogers, K.R.: "Biosensors for environmental applications". *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995), 533-541

Rollins, B.J. und Culp, L.A.: "Glycosaminoglycan in the substrate adhesion sites of normal and transformed murine cells". *Biochemistry* 18 (1979), 141-148

Römpp Lexikon der Chemie, Online Version 3.2, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2008

Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trülzsch, K., Rouot, B. und Heesemann, J.: "Yersinia outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor- κ B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages". *Journal of Immunology* 166 (2001), Nr.3, 1823-1831

Rüdiger, H. und Gabius, H.J.: "Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications". *Glycoconjugate Journal* 18 (2001), 589-613

Ruef C. und Francioli P.: „Prävention der nosokomialen Legionelleninfektion“. *Swiss-NOSO: Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene* 4 (1997), Nr.2, 9-12

Ruscetti, F.W. und Chervenick, P.A.: "Regulation of the release of colony-stimulating activity from mitogen-stimulated lymphocytes". *Journal of Immunology* 114 (1975), Nr.5, 1513-1517

Rylander, R.: "Endotoxin in the environment – exposure and effects". *Journal of Endotoxin Research* 8 (2002), Nr.4, 241-252

Sanchez, J.F., Lescar, J., Chazalet, V., Audfray, A., Gagnon, J., Alvarez, R., Breton, C., Imberty, A. und Mitchell, E.P.: "Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold". *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), Nr.29, 20171-20180

Sandvig, K. und van Deurs, B.: "Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin". *Physiological Reviews* 76 (1996), 949–966

Schink, M., Moser, D. und Mechelke, F.: "Two-dimensional isolectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (mistletoe)". *Naturwissenschaften* 79 (1992), 80-81

Schlegel, H.G. und Zaborosch, C.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 7. Auflage, 1992

Schöffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P., Campone, M., Bolte, O., Marreaud, S., Lacombe, D., Baron, B., Herold, M., Zwierzina, H., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H. und Twelves, C.: "Phase I trial of intravenous aviscumin (rViscumin) in patients with solid tumours: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group". *Annals of Oncology* 15 (2004), 1816-1824

Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S. und Ulevitch, R.J.: "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein". *Science* 249 (1990), 1429-1431

Schwarz, F.P., Puri, K.D., Bhat, R.G. und Surolia, A.: "Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin". *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993), Nr.11, 7668-7677

Seftalioglu, A. und Dalcik, H.: "Preparation and application of lectin-gold complexes". *Journal of Islamic Academy of Sciences* 7 (1994), Nr.2, 120-129

Selifonova, O., Burlage, R. und Barkay, T.: "Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment". *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), 3083-3090

Senear, D.F. und Teller, D.C.: "Thermodynamics of concanavalin A dimer-tetramer self association: Sedimentation equilibrium studies". *Biochemistry* 20 (1981), Nr.11, 3076-3083

Sessa, G. und Weissmann, G.: "Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes". *Journal of Lipid Research* 9 (1968), 310-318

Seydel, U., Koch, M.H. und Brandenburg, K.: "Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*". *Journal of Structural Biology* 110 (1993), Nr.3, 232-243

Sharon, N. und Lis, H.: "Lectins as cell recognition molecules". *Science* 246 (1989), Nr. 4927, 227-234

Shear, J.B., Fishman, H.A., Allbritton, N.L., Garigan, D., Zare, R.N. und Scheller, R.H.: "Single cells as biosensors for chemical separations". *Science* 267 (1995), 74-77

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. und Kimoto, M.: "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4". *Journal of Experimental Medicine* 189 (1999), 1777-1782

Smit, J., Kamio, Y. und Nikaido H.: "Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants". *Journal of Bacteriology* 124 (1975), Nr.2, 942-958

Smith, E.A., Thomas, W.D., Kiessling, L.L. und Corn, R.R.: "Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions". *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), Nr.20, 6140-6148

Soler, M.H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T. und Voelter, W.: "Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I". *FEBS Letters* 399 (1996), 153-157

Sonesson, A., Larsson, L., Schütz, A., Hagmar, L. und Hallberg, T.: "Comparison of the limulus amoebocyte lysate test and gas chromatography-mass spectrometry for measuring lipopolysaccharides (endotoxins) in airborne dust from poultry-processing industries". *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), Nr.5, 1271-1278

Stauder, H. und Kreuser, E.-D.: "Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: Current state of clinical research". *Onkologie* 25 (2002), 374-380

Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S. und Pihl, A.: "Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture". *The Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr.22, 13271-13277

Stoeva, S., Maier, T., Soler, M.H. und Voelter, W.: "Carbohydrate chains and their binding sites in mistletoe lectin I". *Polish Journal of Chemistry* 73 (1999), Nr.1, 125-133

Stoll, G.H., Nimmerfall, F., Acemoglu, M., Bodmer, D., Bantle, S., Müller, I., Mahl, A., Kolopp, M. und Tullberg, K.: "Poly(ethylene carbonate)s, part II: degradation mechanisms and parenteral delivery of bioactive agents". *Journal of Controlled Release* 76 (2001), 209-225

Stoolman, L.M. und Rosen, S.D.: "Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation". *The Journal of Cell Biology* 96 (1983), 722-729

Storm, G., Roerdink, F.H., Steerenberg, P.A., de Jong, W.H. und Crommelin, D.J.: "Influence of lipid composition on the antitumor activity exerted by doxorubicin-containing liposomes in a rat solid tumor model". *Cancer Research* 47 (1987), 3366-3372

Suen, Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Chan, C.W. und Kong, S.K.: "Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c". *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 5 (2000), Nr.4, 369-377

Sumner, J.B.: "The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*". *The Journal of Biological Chemistry* 37 (1919), 137-142

Suzuki, T., Kobayashi, M., Isatsu, K., Nishihara, T., Aiuchi, T., Nakaya, K. und Hasegawa, K.: "Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide". *Infection and Immunity* 72 (2004), Nr.4, 1856-1865

Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F. und Minna, J.D.: "p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer". *Science* 246 (1989), 491-494

- Takemoto, Y., Nakatani, T., Sugimura, K., Yoshimura, R. und Tsuchida, K.: "Endotoxin adsorption of various dialysis membranes: In vitro study". *Artificial Organs* 27 (2003), 1134-1137
- Tan, H.M., Cheong, S.P. und Tan, T.C.: "An amperometric benzene sensor using whole cell *Pseudomonas putida* ML2". *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), 1-8
- Thomsen, L., Watts, B., Cotton, D.V., Quinton, J.S. und Dastoor, P.C.: "Adsorption and orientation kinetics of self-assembled films of octadecyltrimethoxysilane on aluminium oxide surfaces". *Surface and Interface Analysis* 37 (2005), 472-477
- Tobias, P.S., Soldau, K. und Ulevitch, R.J.: "Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein". *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), Nr.18, 10867-10871
- Tonevitsky A.G., Agapov I., Temiakov D., Moisenovich M., Maluchenko N., Solopova O., Würzner G. und Pfueller U.: "Study of heterogeneity of lectins in mistletoe preparations by monoclonal antibodies to their A-subunits". *Arzneimittel-Forschung* 49 (1999), Nr.11, 970-975
- Toole, B.P.: "Glycosaminoglycans in morphogenesis" In: Hay, E.D.: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum, 1981
- Tran, A.X., Lester, M.E., Stead, C.M., Raetz, C.R., Maskell, D.J., McGrath, S.C., Cotter, R.J. und Trent, M.S.: "Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A". *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr.31, 28186-28194
- Tripathi, S. und Maiti, T.K.: "Stimulation of murine macrophages by native and heatdenatured lectin from *Abrus precatorius*". *International Immunopharmacology* 3 (2003), 375-381
- Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. und Fridkin, M.: "Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria". *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (2000), Nr.16, 3085-3092

Turkova, J.: "Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and functions". *Journal of Chromatography B* 722 (1999), 11-31

Turner, A.P.F., Karube, I. und Wilson, G.S.: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford: Oxford University Press, 1987, 770-775

Ulevitch, R.J. und Tobias, P.S.: "Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin". *Annual Review of Immunology* 13 (1995), 437-457

Vaara, M. und Vaara, T.: "Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24 (1983),Nr.1, 107-113

van Damme, E.J.M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rouge', P. und Peumans, W.J.: "Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes". *Critical Reviews in Plant Sciences* 20 (2001), 395-465

van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. und Langevoort, H.L.: "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells". *Bulletin of the World Health Organization* 46 (1972), 845-852

Vang, O., Larsen, K.P. und Bøg-Hansen, T.C.: "A new quantitative and highly specific assay for lectin-binding activity". *Lectins* 5 (1986), 637-646

Wagner, T.: *Lichtadressierbare potentiometrische Sensoren für den Einsatz in der Pharmazie*. Marburg, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie, Dissertation, 2008

Wagner, T. und Schöning, M.J.: Light-addressable potentiometric sensors (LAPS): recent trends and applications. In: Barcelo, D.: *Comprehensive Analytical Chemistry*.Vol. 49. Amsterdam: Elsevier, 2007, 87-128

- Wagner, T., Vornholt, W., Biselli, M., Keusgen, M. und Schöning, M.J.: „Towards a pharmaceutical screening system combining the light-addressable potentiometric sensor with magnetic beads”. *Biosensors 2008*, (2008_a), O82
- Wagner, T., Vornholt, W., Biselli, M., Keusgen, M., Yoshinobu, T., Schöning, M.J.: “Light-addressable potentiometric sensor (LAPS) based systems for cell-culture fermentation and pharmaceutical agent screening utilising magnetic beads”. *Chemical Sensors 2008*, (2008_b), CBST 189
- Warburg O. und Christian W.: „Isolierung und Charakterisierung des Gärungsferments Enolase“. *Biochemische Zeitschrift* 310 (1942), 384–421
- Warren, L., Zeidman, I. und Buck, C.A.: “The surface glycoproteins of a mouse melanoma growing in culture and as a solid tumor in vivo”. *Cancer Research* 35 (1975), 2186-2190
- Weetall, H.H.: “Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 41 (1993), 157-188
- Weiss, A.R.: “A new ultrafiltration unit for the removal of substances interfering with the lal-endotoxin-test”. In: Watson, S.W., Levin, J. und Nowitzky, T.J. (Hrsg.): *Detection of bacterial endotoxins with the limulus ameobocyte lysate test*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987, 235-249
- Westphal, O. und Lüderitz, O.: „Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien“. *Angewandte Chemie* 66 (1954), 407-417
- Wicken, A.J. und Knox, K.W.: “Bacterial cell surface amphiphiles”. *Biochimica et Biophysica Acta* 604 (1980), 1-26
- Wilkins, E. und Atanasov, P.: “Glucose monitoring: state of the art and future possibilities”. *Medical Engineering & Physics* 18 (1996), 273–288
- Wilkinson, S.G.: “Gram-negative bacteria”. In: Ratledge, C. und Wilkinson, S.G. (Hrsg.): *Microbial Lipids, vol. 1*. London: Academic Press, Inc., 1988, 299-488

Woof, J.M. und Kerr, M.A.: "The function of immunoglobulin A in immunity". *The Journal of Pathology* 208 (2006), Nr.2, 270-282

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. und Mathison, J.C.: "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein". *Science* 249 (1990), 1431-1433

Wright, S.D.: "CD14 and innate recognition of bacteria". *Journal of Immunology* 155 (1995), 6-8

Wu, J.T.: *Quantitative immunoassay: A practical guide for assay establishment, troubleshooting and clinical application*. Washington: American Association for Clinical Chemistry, Inc., 2000

Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Ui, Y., Furuichi, K., Ermolenko, Y., Mourzina, Y., Wagner, T., Näther, N. und Schöning, M.: "The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging". *Methods* 37 (2005), Nr.1, 94-102

Zhang, Q.: "Theoretical analysis and design of submicron-LAPS". *Sensors and Actuators B* 105 (2005), 304-311

Ziska, P. und Franz, H.: "Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates". *Experientia* 37 (1981), Nr. 3, 219

Ziska, P. und Franz, H.: "Determination of lectin content in commercial mistletoe preparations for cancer therapy using the ELISA technique". *Lectins* 4 (1985), 473-480

Zynio, S.A., Samoylov, A.V., Surovtseva, E.R., Mirsky, V.M. und Shirshov, Y.M.: "Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance". *Sensors* 2 (2002), 62-70

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Publikationen

Vornholt, W., Hartmann, M. und Keusgen, M.: "SPR studies of carbohydrate–lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources". *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007), 2983-2988

Wagner, T., **Vornholt, W.**, Werner, C.F.B., Yoshinobua, T., Miyamotoe, K., Schöning, M.J. und Keusgen, M.: "A biosensor based on a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) and magnetic beads for pharmaceutical screening". In Vorbereitung

Vornholt, W., Seidel, N., Kissel, T. und Keusgen, M.: "Poly(ethylene carbonate) biodegradation monitored by surface plasmon resonance (SPR)". In Vorbereitung

Vorträge

Vornholt, W., Hartmann, M., Mazumdar S.D. und Keusgen, M.: "Artificial pathogenic bacteria on a surface plasmon resonance (SPR) platform". The Ninth World Congress on Biosensors, Toronto (Kanada), Mai 2006

Vornholt, W. und Keusgen, M.: "Artificial pathogenic bacteria for the study between surface structures and suitable targets". DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung (Joint Meeting), Marburg, Oktober 2006

Wagner, T., **Vornholt, W.**, Biselli, M., Keusgen, M. und Schöning, M.J.: "Towards a pharmaceutical screening system combining the light-addressable potentiometric sensor with magnetic beads". The Tenth World Congress on Biosensors, Shanghai (China), Mai 2008

Wagner, T., **Vornholt, W.**, Werner, K.F., Miyamoto, K., Keusgen, M., Yoshinobu, T. und Schöning, M.J.: "Cell culture based biosensor utilising the light-addressable potentiometric sensor (LAPS)". 4th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, Sendai (Japan), März 2009

Posterpräsentationen

Vornholt, W. und Keusgen, M.: „SPR-Oberflächen zur Immobilisierung von lebenden Zellen“. 4. Deutsches BioSensor Symposium (DBS 2005), Regensburg, März 2005

Vornholt, W. und Keusgen, M: “Surface plasmon resonance (SPR) chip device for screening on lectins and binding of entire cells”. 53rd Annual Congress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Florenz (Italien), August 2005

Vornholt, W. und Keusgen, M.: „Künstliche Bakterien als Modellsystem zur Untersuchung spezifischer Interaktionen zwischen Oberflächenstrukturen und passenden Zielstrukturen“. 5. Deutsches BioSensor Symposium (DBS 2007), Bochum, März 2007

Vornholt, W. und Keusgen, M: “Artificial pathogenic bacteria for the study between surface structures and suitable targets”. DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Doktorandentagung, Nürnberg-Heroldsberg, September 2006

Vornholt, W., Seidel, N., Kissel, T. und Keusgen, M: “Poly(ethylene carbonate) degradation studies using macrophages monitored by surface plasmon resonance”, DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung, Erlangen, Oktober 2007

Wagner, T., **Vornholt, W.**, Biselli, M., Keusgen, M., Yoshinobu, T. und Schöning, M.J.: “Light-addressable potentiometric sensor (LAPS) based systems for cell-culture fermentation and pharmaceutical agent screening utilising magnetic beads”. 12th International Meeting on Chemical Sensors, Columbus, Ohio (USA), Juli 2008

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wolfgang Vornholt
Geboren: 19. Januar 1975 in Olsberg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule in Unna–Hemmerde
1985 – 1994 Mariengymnasium in Werl, Abschluss: Abitur

Grundwehrdienst

1994 – 1995 Transportbataillon in der „Lipperland Kaserne“, Lippstadt

Ausbildung

1995 – 1998 Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Firma Schering,
Abschluss: Chemielaborant

Studium

1998 – 2003 Pharmaziestudium an der Westfälischen
Wilhelms-Universität in Münster,
Abschluss: 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

2003 – 2004 Praktisches Jahr in der Apotheke am Ring in Münster und
bei der Firma Grünenthal in Aachen
07/2004 Erlangung der Approbation als Apotheker

Promotionsstudium

08/2004 – 02/2008 Promotionsstudium unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.
Michael Keusgen am Institut für Pharmazeutische Chemie
der Universität Marburg
03/2008 – 10/2009 Angestellter der Firma EAB, Berlin
Abteilung Qualitätskontrolle
Seit 11/2009 Erziehungsurlaub