



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Analytische Beiträge zur Entwicklung von neuartigen Implantatoberflächen

Verfasserin

Martina Strobl BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 10. Oktober 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Chemie

Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Dr. Fritz Pittner

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern, Helga und Herbert Strobl, für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt während meines Studiums herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Professor Fritz Pittner für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für seine fachliche Unterstützung. Seine Tür stand immer für Fragen und Gespräche offen.

Einen herzlichen Dank an seine Frau Gisela Pittner, die mir bei Fragen mit Rat zur Seite stand.

Ich möchte mich, besonders bei Haifa Al-Dubai, und bei meinen anderen Laborkollegen: Helmut, Nadira, Margit, Mirza und Ulrich für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke euch allen für die wunderbare Atmosphäre im Labor.

Zusammenfassung

Die Masterarbeit befasst sich mit analytischen Beiträgen zur Entwicklung von neuartigen, biokompatiblen und wiederbeladbaren medizinischen Implantatoberflächen. Es soll ein wiederbeladbares „drug-delivery“ System entstehen, bei dem Nano- oder Mikropartikel als Träger eines oder mehrerer Medikamente fungieren. Die Partikel binden an Rezeptoren auf der Implantatoberfläche und setzen die Medikamente zielgerichtet nur im Bereich des Implantats frei. Nach dem vollständigen Abbau der Partikelhüllen an den Bindungsstellen, sind diese frei um weitere Partikel zu binden. Diese Technologie kann für verschieden Medikamente angewendet werden und erlaubt eine gezielte Behandlung von Patienten. In den Versuchen zur Masterarbeit wurden verschiedene analytische Methoden zum Nachweis von geringen Mengen von Aminogruppen überprüft, CLISA-Tests durchgeführt, optimiert und mit ELISA-Tests verglichen und die Spaltung von Antikörpern in zwei Fragmente mit immobilisiertem Dihydrolipoamid durchgeführt.

Abstract

The master's thesis deals with analytical contributions for the development of biocompatible and reloadable medical implant surfaces. Those medical implant materials should have binding sites for a nano- or microparticulate drug-delivery system. The nano- or microparticles serve as reloadable drug-delivery carriers, which release the drugs locally at the implant area in a controlled manner. After the complete biodegradation of the particles the receptor system is free again for reloading with new particles. This technology can be used for different drugs and allows easy adjustment to patient-specific medication needs. In the studies for this master's thesis various analytical methods have been tested for the detection of small amounts of amino groups on solid surfaces, CLISA tests were performed, optimized and compared with ELISA tests and the cleavage of antibody molecules into two fragments with immobilized dihydrolipoamide was carried out.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Forschungsthemen	7
3	Methoden	9
3.1	Aminogruppen- Nachweise	9
3.1.1	TNBS	9
3.1.2	OPA	10
3.1.3	Enzym Assay - Alkalische Phosphatase	11
3.1.4	Kaisertest – Ninhydrin	12
3.2	CLISA und ELISA – Vergleich anhand von Albuminen	15
3.2.1	Kolloide Goldcluster (gold colloid cluster – GCC)	15
3.2.2	CLISA (cluster-linked immunosorbent assay)	20
3.2.3	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	21
3.3	Zero-Length-Crosslinkers	23
3.3.1	EDC	23
3.3.2	EDC mit sulfo-NHS	25
3.3.3	DCC	27
3.3.4	DCC mit NHS	29
3.3.5	DIC	29
3.4	Ellman's – Test	31

4	Ergebnisse	33
4.1	Aminogruppen-Nachweise	33
4.1.1	TNBS	33
4.1.2	OPA.....	37
4.1.3	Enzymatische Assay mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase.....	39
4.1.4	Kaisertest- Ninhydrin.....	39
4.2	CLISA: Vergleich der Intensität von alten und neuen BSA- und HSA-Lösungen und alter und neuer Goldclusterlösung	41
4.3	CLISA von Albuminen auf Nunc Maxisorp-Platten	49
4.4	Vergleich von CLISA und ELISA.....	50
4.5	Liponsäure: Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials, Reduktion der Liponsäure und Spalten der Antikörper.....	54
4.5.1	Vergleich der Crosslinker EDC, EDC + sulfo-NHS, DCC und DCC + NHS beim Binden der Liponsäure an Aminogruppen	54
4.5.2	Vergleich von Trägermaterial für Liponsäure: organisch silanisierte glass beads (GBs) und organisch silanisierter Gulsenit und Testen des Bindungsvermögens der Liponsäure ans Trägermaterial	57
4.6	Testen von Affinitätschromatographiesäulenmaterial: Kurzkettiges oder langkettiges PLGA	61
5	Zusammenfassung und Zukunftsausblicke	65
6	Protokolle.....	67
6.1	Amino-Silanisierung von Glasplättchen, controlled-pore glass beads und Gulsenit.....	67
6.1.1	Organische Amino-Silanisierung	67

6.1.2	Wässrige Amino-Silanisierung.....	67
6.2	Aminogruppen-Nachweis mit TNBS.....	68
6.3	Aminogruppen-Nachweis mit OPA	68
6.4	Zeitabhängigkeit von OPA.....	69
6.5	Aminogruppen-Nachweis: Enzym Assay – Alkalische Phosphatase.....	69
6.6	Aminogruppen- Nachweis mit Kaisertest – Ninhydrin	70
6.7	Goldcluster (GCC – gold colloid cluster) - Synthese (17nm) nach Frens	71
6.8	CLISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Goldcluster-Lösung auf Dynatech Microlite™ 2 Platten (Mikrotiterplatten).....	71
6.9	CLISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Goldcluster-Lösung auf Nunc Maxisorp-Platten.....	75
6.10	ELISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Antikörpern, Peroxidase und TMB.....	75
6.11	Liponsäure: Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials, Reduktion der Liponsäure und Spalten der Antikörper.....	78
6.11.1	Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials	78
6.11.2	Reduktion der Liponsäure mit Natriumdithionit.....	79
6.11.3	Liponsäure: Spalten der Disulfidbrücken von Antikörpern.....	80
6.11.4	Gulsenit als Trägermaterial und seine Bindungsfähigkeit.....	80
6.12	Testen von Affinitätschromatographiesäulenmaterial zur Reinigung von Serum: Kurzkettiges oder langkettiges PLGA	82
6.12.1	Immobilisierung von kurzkettigem bzw. langkettigem PLGA an organisch silanisierten Gulsenit	82

6.12.2 Affinitätschromatographie von Präserum bzw. Serum mit Gulsenit gekoppelt mit kurzkettigem PLGA als Säulenmaterial	82
7 Tabellen und Grafiken.....	85
7.1 TNBS-Versuche	85
8 Reagenzien	89
9 Abbildungsverzeichnis	92
10 Tabellenverzeichnis	95
11 Literaturverzeichnis	96
12 Stichwort- und Namensverzeichnis	99
13 Curriculum Vitae	101

1 Einleitung

Im Zuge dieser Masterarbeit wurden analytische Beiträge zum Forschungsprojekt „Entwicklung von neuartigen Implantatoberflächen“ durchgeführt. Das Projekt hat das Ziel Partikel mit biokompatiblen Oberflächen, die Arzneimittel enthalten, zu entwickeln und Bindungsstellen für diese Nano- oder Mikropartikel auf der Oberfläche eines medizinischen Implantats zu erzeugen, wobei gleichzeitig auf die Erhaltung der Biokompatibilität der Oberfläche zu achten. Durch dieses Konzept ist eine zielgerichtete und kontinuierliche Zufuhr von Wirkstoff an medizinischen Implantaten gewährleistet. Ein wichtiger Punkt ist die Wiederbeladbarkeit der Implantatoberfläche. Es soll ein wiederholte Bindung der Partikel an den am Implantat vorhanden Bindungsstellen möglich sein, damit eine kontinuierliche Wirkstoffabgabe stattfindet. Deshalb muss die Partikelhülle an der Bindungsstelle vollständig abgebaut werden können.

Um den Aufbau einer solchen Oberfläche analytisch zu verfolgen, hat es sich als nötig erwiesen, andere Trägermaterialien als Ersatz für die Implantatmaterialien zu verwenden, weil die verwendeten Analysemethoden zum Teil völlig glatte Oberflächen benötigen. Zu diesem Zweck wurden auf den Ersatzmaterialien dieselben funktionellen Gruppen auf der Oberfläche erzeugt (Hydroxylgruppen), wie sie auch bei den in der Praxis eingesetzten Implantatmaterialien für den Aufbau der Beschichtung verwendet wurden. Für die Zwecke der analytischen Überprüfung der einzelnen Reaktionsschritte wurden als Trägermaterial je nach Fragestellung Glasplättchen, controlled-pore glass beads oder Gelsenit, ein Gesteinsabbauprodukt mit sehr vielen Hydroxylgruppen, verwendet. Die Hydroxylgruppen der anorganischen Trägermaterialoberflächen wurden zum Aufbau einer Aminosilan-Beschichtung genutzt. Diese hat den Vorteil, dass sie das Bindeglied zwischen einem organischen Molekül und einer anorganischen Oberfläche bildet. Die Organosilan-Verbindung, aus der die Beschichtung besteht, hat eine reaktive, funktionelle organische Gruppe mit der sie über Crosslinker kovalent andere organische Moleküle binden kann. Bei den durchgeführten Versuchen und Analysen wurde mit organisch aminosilanisierten Trägermaterial gearbeitet. Zur Beschichtung wurde das häufig verwendete 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) genutzt. Dadurch werden auf einer anorganischen Oberfläche funktionelle Gruppen wie Aminogruppen erzeugt.

Die Silanisierung mit APTS wurde in einer 95%igen Ethanol-Wasser-Lösung durchgeführt. Der 5%ige Wasseranteil ist zur Hydrolyse des Organosilans zu Silanol notwendig, weil die Ethoxy-Gruppen nicht reaktiv genug für eine kovalente Bindung an die Hydroxylgruppen des Trägermaterials sind. Die reaktiven Silanole verbinden sich mit anderen Silanolen in der Lösung und mit den Hydroxylgruppen am Trägermaterial. Es kommt zu einer Polymerisation und es bildet sich ein Netzwerk über der Oberfläche (Abbildung 1-1)(Durchführung siehe Kapitel 6.1). [1]

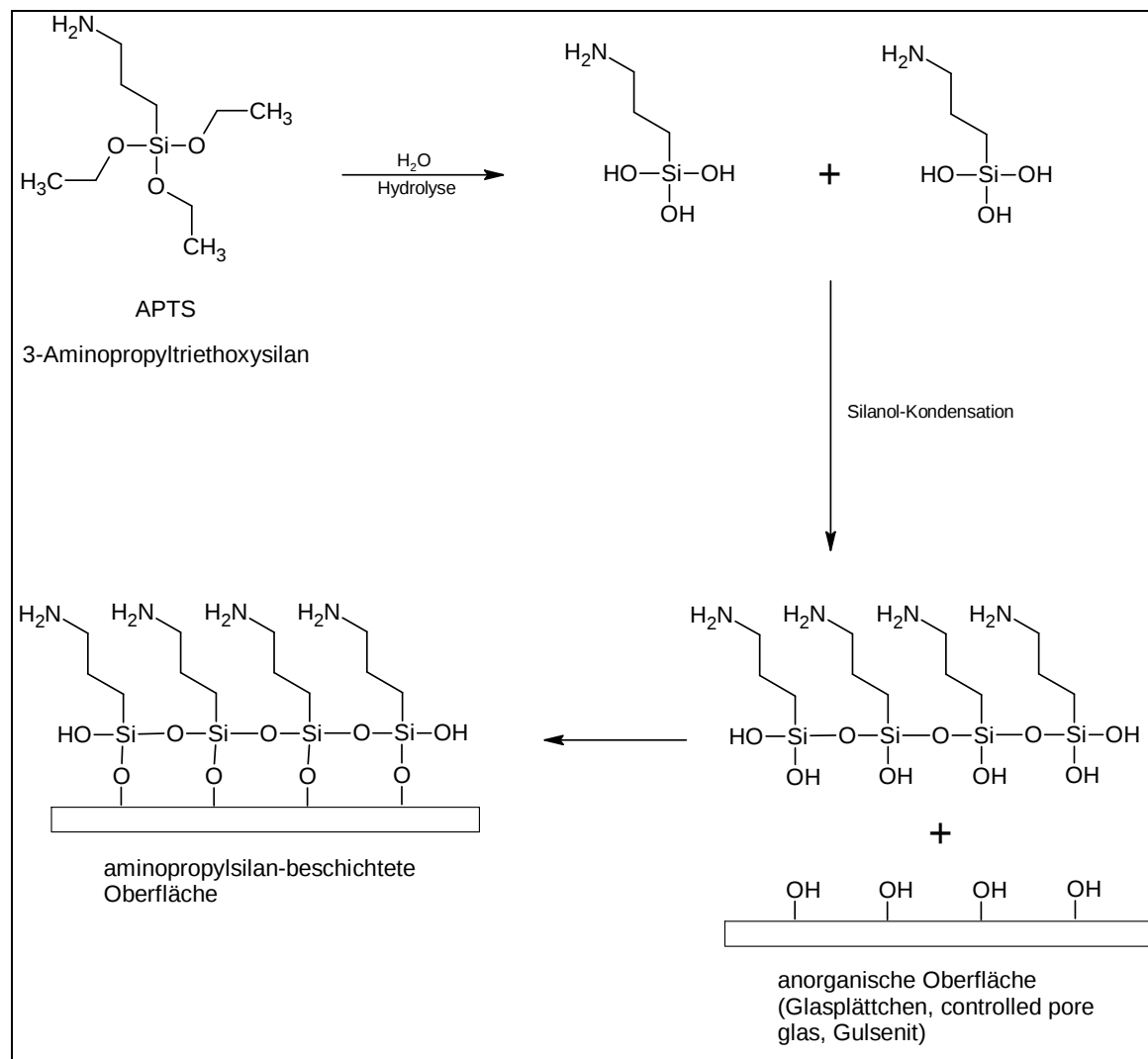


Abbildung 1-1: Aminosilanisieren der anorganischen Trägermaterialoberfläche mit der Organosilan-Verbindung APTS

Eine Aufgabe der Masterarbeit war zu versuchen, die Anzahl der freien primären Aminogruppen auf den Trägermaterialien zu bestimmen. Es gibt einige Nachweismethoden für Aminogruppen, aber die meisten sind zur qualitativen und nicht

zur quantitativen Analyse von geringen Mengen geeignet. Es wurden verschiedene Verfahren auf ihrer Anwendbarkeit zur Problemstellung getestet.

Je mehr Aminogruppen pro Flächeneinheit auf dem Träger vorhanden sind, desto dichter kann das Trägermaterial mit der biokompatiblen Beschichtung (Polyethylenglykol (PEG) mit passenden funktionellen Gruppen) überzogen werden und umso mehr Bindungsstellen für die Nanopartikel können auch verankert werden. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Partikel gezielt am Implantat gebunden werden.

Ein wichtiges Thema ist auch die Wiederbeladbarkeit der Implantate mit Wirkstoffpartikeln. Dafür braucht man ein Bindsystem, das einerseits stark genug ist, um die wirkstoff-freisetzenden Nano- oder Mikropartikel für eine bestimmte Zeit fest zu binden und andererseits schwach genug ist, um nicht die Abbauprodukte der Nano- oder Mikropartikel festzuhalten. Nachdem der Partikel den Wirkstoff freigesetzt hat, soll die Bindungsstelle wieder frei für weitere Partikel sein, um eine Wiederbeladbarkeit zu gewährleisten.

Ein Rezeptorsystem für diese Partikel kann ein Fragment eines Antikörpers sein, der gegen die Polymerhülle des wirkstoff-beladenen Partikels gerichtet ist. Besitzt ein Implantat vieler dieser Rezeptorsysteme spricht man von aktiven Beschichtungen.

Die Antikörper gegen die Wirkstoffpartikel wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit PLGA hergestellt. PLGA ist das Polymer, das die Partikelhülle bildet und wird vom Antikörper als Antigen erkannt, dass er binden muss.

Die Antikörper sollten als Bindungsstellen für die Nanopartikel am Trägermaterial über Crosslinker gebunden werden. Es gibt die Möglichkeit die Antikörper entweder über ihre Aminogruppen an den schweren Ketten im Fc-Bereich an den Träger zu koppeln oder über die durch Spaltung der Antikörper entstandenen Thiolgruppen an den Träger zu binden.

Ein weiteres Thema, das in der Arbeit behandelt wird, ist daher die Immobilisierung von Liponsäure. Liponsäure kann zum Spalten der Disulfidbrücken an den Antikörpern verwendet werden. Wenn man die Liponsäure an Gulsenit als Träger immobilisiert, vereinfacht das die darauffolgende Trennung der Antikörperlösung von der Liponsäure. Es wurde getestet welcher Crosslinker am geeignetsten für die Immobilisierung ist und wie die effektivste Spaltung der Antikörper zu erzielen ist.

Ein Antikörper ist ein Immunglobulin und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken mit einander verknüpft sind. IgGs sind die am besten geeigneten Antikörper für eine Bindungsstelle am Implantat. Sie sind wie ein Y geformt. Die leichten und schweren Ketten der Antikörper bestehen aus variablen und konstanten Regionen. Die variablen Regionen sind an den kurzen Armen des Y zu finden und bilden die Antigen-Bindungsstelle. Die eigentliche Bindungsstelle besteht oft nur aus wenigen Aminosäuren, den hypervariablen Regionen (Abbildung 1-2).

Durch Spaltung können die Antikörper in Teile zerlegt werden: in die zwei zusammenhängenden kurzen Teile die $F(ab)_2$ (Fab = antibody binding fraction), in einzelne kurze Teile (Fab) und in die Fc-Fraktion (crystalline fraction). Die Fab- und $F(ab)_2$ – Fragmente werden häufig anstelle von Antikörpern zur Immunmarkierung eingesetzt. Die Vorteile sind, dass die Teile kleiner sind und unspezifische Bindungen vermindert werden. [2]

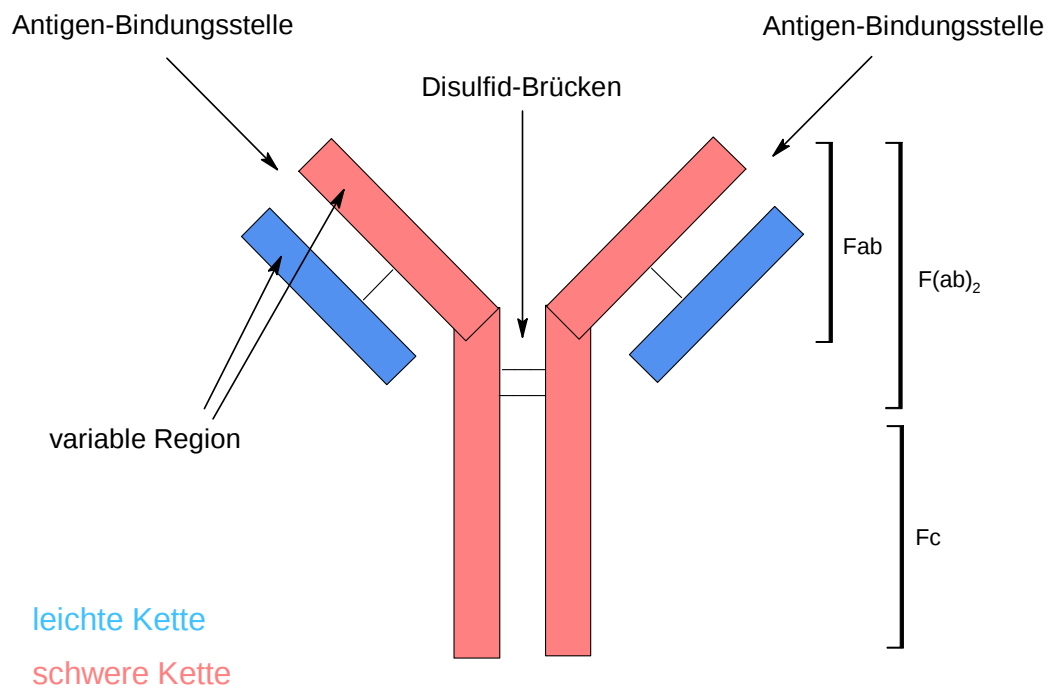


Abbildung 1-2: Struktur eines Antikörpers (IgGs)

Weitere Themen der Masterarbeit sind die Reinigung des Serums, das man nach der Immunisierung der Kaninchen erhält und die Optimierung des CLISA-Verfahrens zur Titerbestimmung. Ein Schritt bei der Reinigung des Serums war die

Affinitätschromatographie. Am Trägermaterial der Chromatographie sollte das geeignete PLGA immobilisiert und die Eignung des Säulenmaterials für mehrmalige Nutzung zur Chromatographie getestet werden. Das CLISA-Verfahren arbeitet mit Goldclusterlösungen und dabei wurde überprüft, ob die Signalstärke durch die frisch hergestellte oder einen Tag gealterte Goldclusterlösung beeinflusst wird. Es wurde auch das bekanntere ELISA-Verfahren mit dem CLISA verglichen.

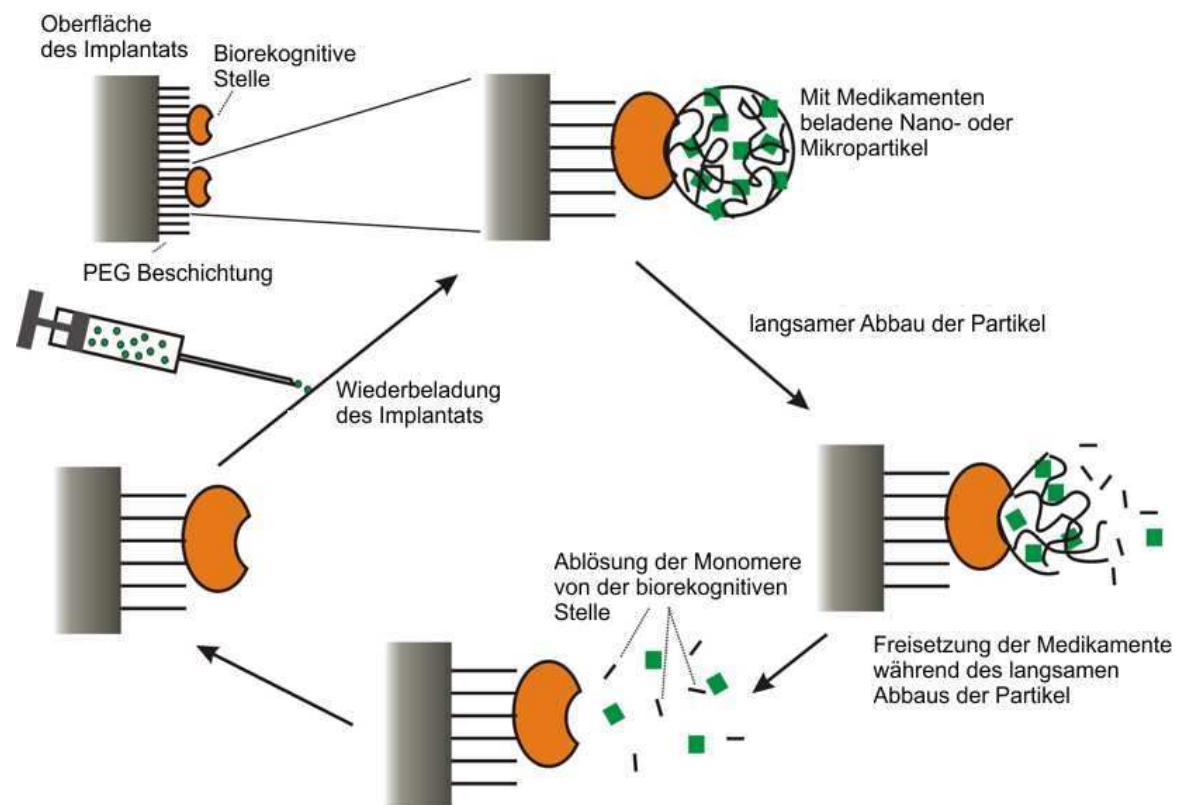


Abbildung 1-3: Schema des Drug reloading-Systems mit Nano- oder Mikropartikeln [3]

Die Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden sollten einen Beitrag zur Entwicklung des Reloading-Systems (Abbildung 1-3) bringen. Im Idealfall sollen die neuartigen Implantate wie folgt funktionieren: Nach dem Einsetzen eines Implantats bei einem Patienten können die Nano- der Mikropartikel ins Blutssystem injiziert werden. Die Partikel zirkulieren dann über den Blutkreislauf im Körper bis sie ihre spezifischen Rezeptoren an der Implantatoberfläche gefunden haben. Dort wird die Partikelhülle entweder durch Hydrolyse oder durch Enzyme, die im Blut enthalten sind, abgebaut. Es kommt zur Wirkstofffreisetzung, die daher gezielt am Implantat stattfindet. Nach der

vollständigen Zersetzung des Partikels ist der Rezeptor wieder für die Beladung mit neuen Partikeln frei, neue Partikel können injiziert werden die Medikamentenfreisetzung daher beliebig verlängert werden, bzw. können auch bei den folgenden Beladungen mit anderen Medikamenten versetzte Nanopartikel verwendet werden und die Medikation den Bedürfnissen des Patienten entsprechend angepasst werden. Durch die aktiven Beschichtungen der Implantate kann der Wirkstoff lokal und somit niedriger dosiert eingesetzt werden. Durch das System verhindert man, dass sich der Wirkstoff im ganzen Körper gleichmäßig verteilt und den Patienten durch die dann notwendige höhere Dosis stärker negativ beeinträchtigt. [4]

2 Forschungsthemen

Wie schon in der Einleitung beschrieben, wurden in dieser Masterarbeit Teilaspekte aus dem Projekt „Entwicklung von neuartigen Oberflächen“ behandelt:

- **Aminogruppen-Nachweise:** Es sollte die Anzahl an Aminogruppen pro Flächeneinheit auf dem Trägermaterial, das später durch das Implantatmaterial ersetzt werden sollte, ermittelt werden. Dazu wurde die Anwendbarkeit von verschiedenen Aminogruppen-Nachweisen auf die Problemstellung geprüft.
- **Optimierung des CLISA und Vergleich zwischen CLISA und ELISA:** Der CLISA wurde zur Titerbestimmung im Kaninchenserum und bei anderen Versuchen im Zuge des Projektes verwendet. Es wurde an dem Beispiel von Albuminen geprüft wie die stärksten Signale erzielt werden können. Durch Vergleiche wurden die Vorteile des CLISAs gegenüber den häufiger verwendeten ELISAs beschrieben.
- **Immobilisierung von Liponsäure und Spaltung von Antikörpern:** Es gibt vielfältige Möglichkeiten, um Liponsäure zu immobilisieren. Einige Crosslinker wurden hierfür getestet und die Liponsäure-Crosslinker-Kombination, die am besten die Antikörper spaltet, ausgewählt. Neben der Bindung an den Aminogruppen des Fc-Teils bieten die gespaltenen Antikörper eine weitere Möglichkeit über ihre Thiolgruppen an das Trägermaterial zu binden und somit eine Bindungsstelle für die Nanopartikel herzustellen.
- **Immobilisieren von PLGA an Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie und Testen der wiederholten Einsetzbarkeit des Säulenmaterials:** Das Serum der mit PLGA immunisierten Kaninchen sollte gereinigt werden. Einen Schritt der Reinigung stellt die Affinitätschromatographie dar. Zwischen zwei PLGA-Arten sollte das geeignetste für die Immobilisierung am Säulenmaterial gefunden werden und dessen Abnützung während der Chromatographie überprüft werden.

Die Masterarbeit besteht aus drei Hauptteilen, das sind die Methoden, die Ergebnisse und die Protokolle. Kapitel 3 beschreibt die verwendeten Methoden. Alle Nachweise, ihre Funktionsweise und die Strukturformeln der verwendeten Chemikalien werden

gezeigt. Im Kapitel 4 sind die Versuchsergebnisse und ihre Interpretationen dokumentiert. Kapitel 5 gibt eine Zusammenfassung als Überblick der gesamten Masterarbeit. Kapitel 6 zeigt die Protokolle, dort sind die Versuchsdurchführungen beschrieben.

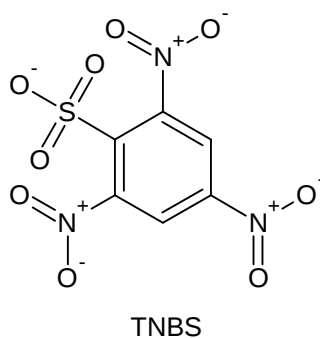
3 Methoden

In diesem Kapitel werden Theorie, Struktur und Funktionsweise der in der Arbeit verwendeten Nachweismethoden und Chemikalien im Allgemeinen beschrieben.

3.1 Aminogruppen- Nachweise

3.1.1 TNBS

Im Jahr 1960 wurde TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) (Abbildung 3-1) von Satake [5] als Farbreagenz zur Bestimmung von Aminogruppen zum analytischen Gebrauch vorgestellt.



TNBS
2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid

Abbildung 3-1: Struktur von TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid)

TNBS reagiert unter milden alkalischen Bedingungen mit Aminen und bildet einen instabilen Meisenheimer Komplex, der orange gefärbt ist. Rasche Ansäuerung mit 1N HCL auf pH1 verwandelt das instabile, orange Produkt in ein stabiles, gelbes Trinitrophenol (TNP) Derivat. Der Amingehalt wird ermittelt anhand der Absorption des TNP-Derivats bei 335nm (Abbildung 3-2). [6]

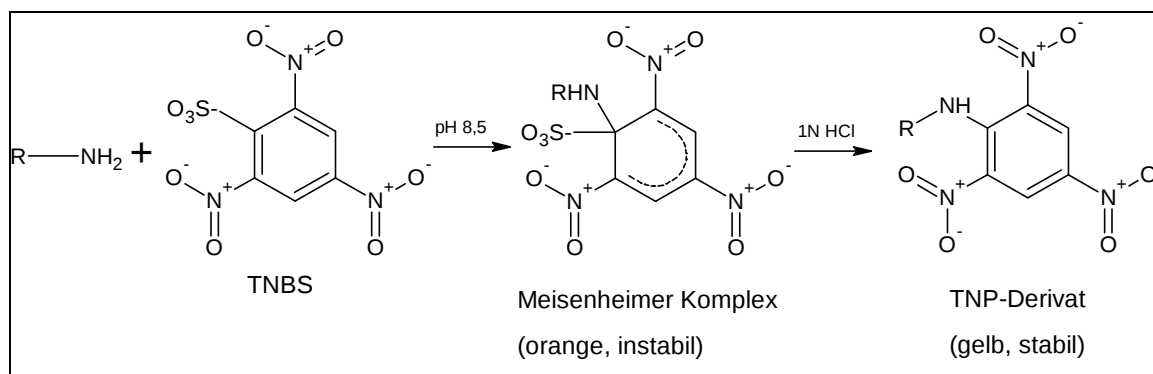


Abbildung 3-2: TNBS-Reaktion mit Aminen

Das Protokoll der TNBS-Bestimmung im Buch „Bioconjugate Techniques“ [7] war die Vorlage für die experimentelle Durchführung des Versuchs:

- Füge 0,5ml TNBS-Lösung zu je 1ml jeder Probelösung. Mische gut.
- Inkubiere bei 37°C für 2h.
- Pipettiere zu jeder Probe 0,5ml 10% SDS und 0,25ml 1N HCl.
- Messe die Absorption jeder Lösung bei 335nm.

Die Menge der zugesetzten Chemikalien und die zeitliche Durchführung wurden aufgrund der festen Probe (Aminogruppen auf glass beads) verändert, wobei die Mengenverhältnisse und die Gesamtzeit beibehalten wurden.

3.1.2 OPA

o-Phthaldialdehyde (OPA) wird heute zur Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren verwendet. Es reagiert mit Aminogruppen von Aminosäuren oder anderen biogenen Aminen zu fluoreszierenden Derivaten. Im Alkalischen bildet es mit primären Aminen einen Fluorophor (Abbildung 3-3).

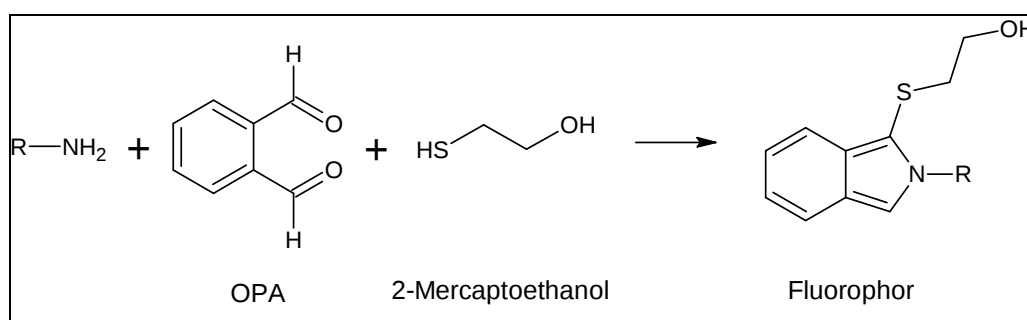


Abbildung 3-3: OPA reagiert mit Aminen zum Fluorophor

Die Zugabe von Thiolen wie zum Beispiel 2-Mercaptoethanol dient zur Erhöhung der Fluoreszenzausbeute. [8]

Zur Detektion wird das fluoreszierende Addukt mit einer Wellenlängen von $\lambda_{\text{exc}}=360\text{nm}$ angeregt und die Emission wird bei $\lambda_{\text{em}}=455\text{nm}$ gemessen. OPA ist empfindlicher als Ninhydrin und das Detektionslimit für Proteine liegt im Bereich von $\mu\text{g/ml}$.

OPA eignet sich zur schnellen Derivatisierung von Aminosäuren im wässrigen Medium vor einer HPLC, zeigt aber einige Probleme sowohl hinsichtlich der Stabilität des OPA-Reagenz als auch der Stabilität der gebildeten Fluorophore bei Anwesenheit von SH-haltigen Molekülen. Für die eingeschränkte Stabilität ist die sterische Hinderung um die Aminogruppen und die Art des verwendeten Thiols verantwortlich. [9], [10]

3.1.3 Enzym Assay - Alkalische Phosphatase

Der Enzym Assay ist in der Bioanalytik eine häufig verwendete Methode. Bei dieser Methode soll die Menge an alkalischer Phosphatase (AP) durch die katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenyl-phosphat (p-NPP) bestimmt werden. Die Aminogruppen an der Oberfläche des Glasträgers werden durch Glutaraldehyd aktiviert und calf intestinal alkalische Phosphatase (AP) daran gebunden (Abbildung 3-3).

Gemäß ihrer Bezeichnung wurde die calf intestinal alkalische Phosphatase früher aus dem Darminhalt von Kälbern isoliert. Die alkalische Phosphatase bevorzugt ein leicht alkalisches Milieu als Reaktionsmedium.

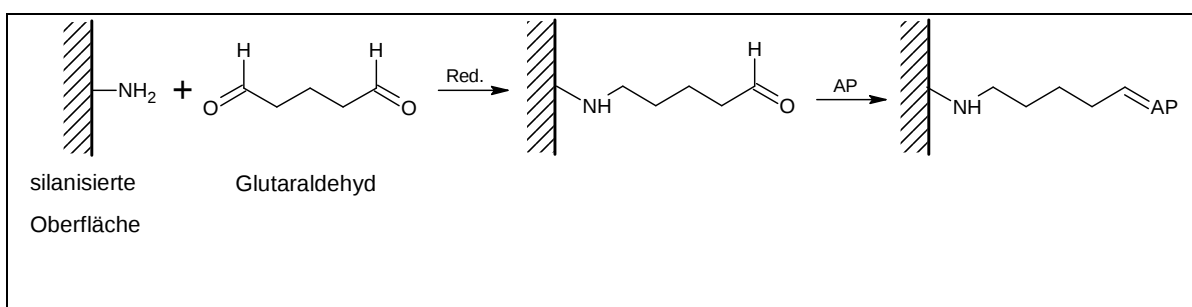


Abbildung 3-4: Aktivierung von aminosilanisierten Oberflächen durch Glutaraldehyd und Binden von alkalischer Phosphatase

Das in der Molekularbiologie gebräuchliche Enzym AP katalysiert die Hydrolyse freier Phosphatgruppen von biologischen Makromolekülen, aber auch von p-

Nitrophenylphosphat (p-NPP). Wie in Abbildung 3-5 zu sehen ist, entsteht aus p-NPP durch die Katalyse von AP ein intensiv gelb gefärbtes, leicht lösliches Produkt das bei 405nm mit einem Spektrometer gemessen werden kann.

Anhand einer Kalibrierfunktion, erstellt durch Messungen von unterschiedlichen Mengen an AP bei konstanter p-NPP-Konzentration, kann die Konzentration der an den Träger gebundenen AP berechnet werden. Diese gibt Aufschluss über die Menge an AP am Glaträger. [11]

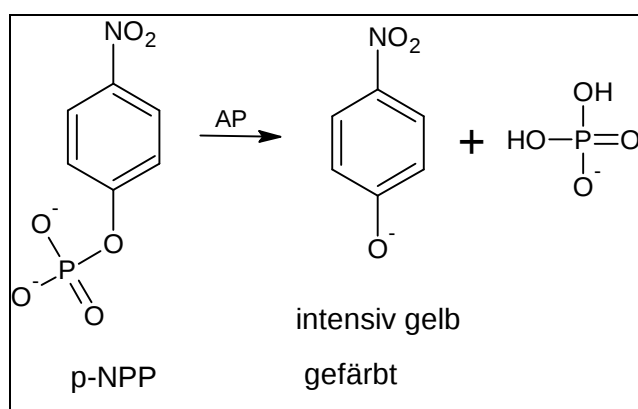


Abbildung 3-5: Hydrolyse von p-NPP durch AP katalysiert und Entstehung eines intensiv gelb gefärbten Produktes, zu messen bei 405nm

3.1.4 Kaisertest – Ninhydrin

Die Ninhydrin-Methode wurde zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren in den späten 1940ern von Moore und Stein [12] eingeführt und im Laufe der Jahre weiterentwickelt und verbessert.

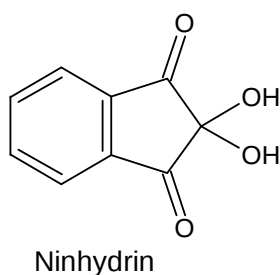


Abbildung 3-6: Struktur von Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-indan-1,3-dion)

Mit Ninhydrin (Abbildung 3-6) können nicht nur Aminosäuren, sondern auch Peptide, Proteine und andere Substanzklassen, die freie Aminogruppen haben, detektiert werden. Die Farbreaktion von Ninhydrin kommt in verschiedenen Bereichen zum Einsatz, wie zum Nachweis von Aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen, in der Forensik zur Sichtbarmachung von Fingerabdrücken und in der Medizin zum Nachweis peripherer Nervenläsionen (Moberg-Test).

Die ursprüngliche Methode von Moore und Stein bezog sich auf die Säulenchromatographie und wurde von Kaiser auf feste Oberflächen adaptiert. [13] Der Kaisertest ist ein qualitativer Test für die An- oder Abwesenheit von freien primären Aminogruppen und wird auch für die Überprüfung der Vollständigkeit eines Kopplungsschritts verwendet.

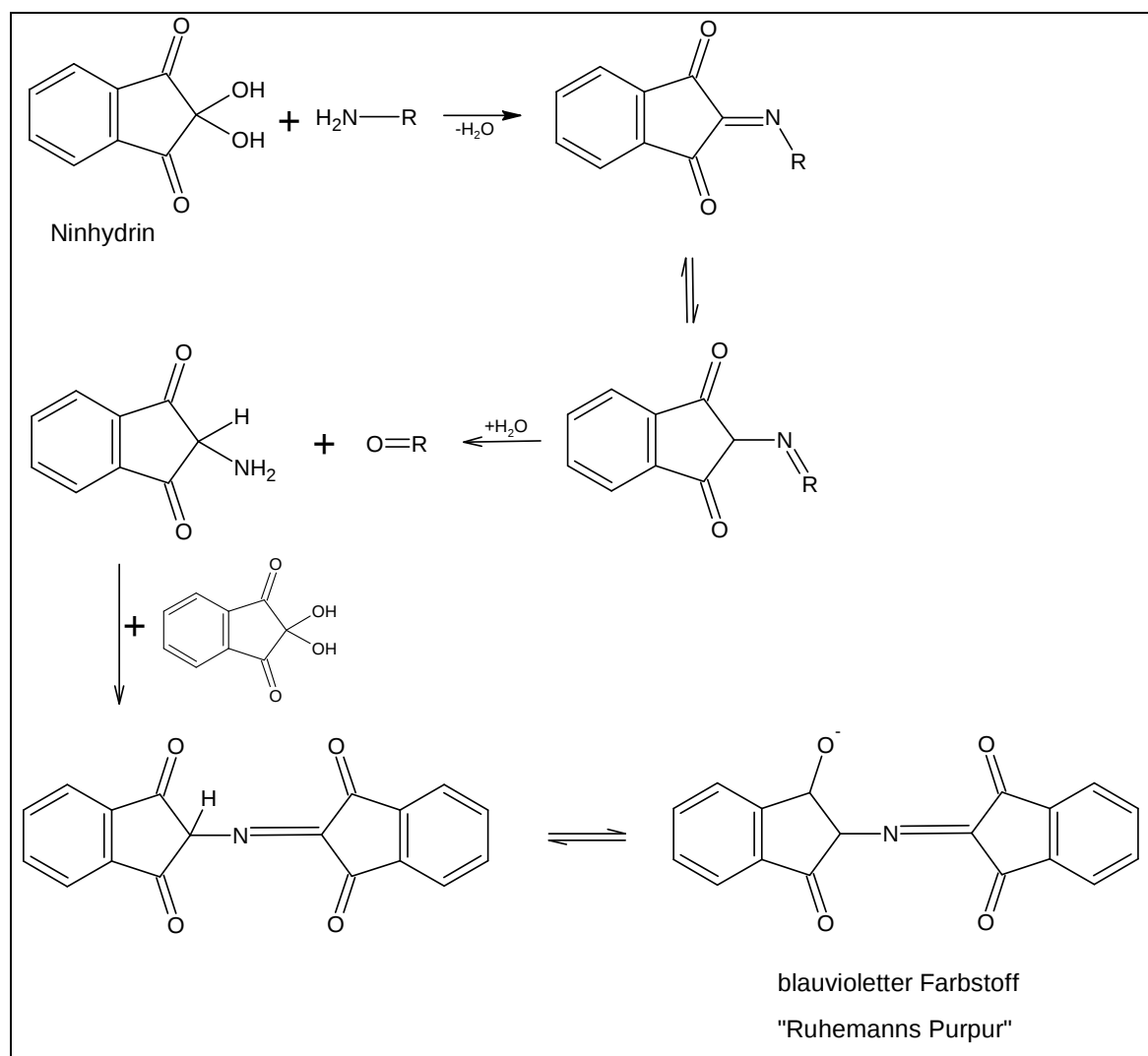


Abbildung 3-7: Kaisertest: Ninhydrin-Reaktion mit Aminogruppe zu „Ruhemanns Purpur“

Der Test basiert auf der Reaktion von Ninhydrin mit primären Aminen, die eine charakteristische blauviolette Farbe (Ruhemanns Purpur) hervorruft. Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-indan-1,3-dion) ist Hydrat des Indan-1,2,3-trions. Es dimerisiert mit einer Aminogruppe und einem weiteren Ninhydrin-Molekül zu einem blauvioletten Farbstoff, dem „Ruhemanns Purpur“ (Abbildung 3-7), mit einem Absorptionsmaximum bei 570nm. Um den Vorgang zu beschleunigen, kann man die Temperatur erhöhen. Der Test braucht nur eine geringe Menge des Analyts.

Bei näherer Betrachtung der Reaktion ist zu erkennen, dass lediglich das N-Atom der Aminogruppe über verschiedene Zwischenstufen in das Farbmolekül Eingang gefunden hat. Das zeigt, dass Ninhydrin für verschiedene Substanzklassen mit Aminogruppen wie Aminosäuren, Proteine, usw. verwendet werden kann. Sekundäre Aminosäuren, wie Prolin und Hydroxprolin, die keine freie Aminogruppe besitzen, führen über einen anderen Reaktionsmechanismus zu einem gelbroten Produkt mit dem Absorptionsmaximum bei 440nm.

3.2 CLISA und ELISA – Vergleich anhand von Albuminen

3.2.1 Kolloide Goldcluster (gold colloid cluster – GCC)

Goldcluster (gold colloid cluster, GCC) haben vielfältige Anwendungsgebiete: Sie werden zum Labeln von Proteinen, DNA, und RNA für verschiedenen Ausführungen der Immunoassays, zur Detektion von Analyten, als toxische Komponenten und für Biosensoren verwendet. Durch ihre Elektronendichte und lichtundurchlässige Natur haben Goldlabel exzellente Detektionsqualitäten für Techniken wie das Blotten und die zytochemische Färbung.

Bei den Versuchen zu dieser Masterarbeit wurden sie zum Labeln von Proteinen wie z. B. der Antikörper für Immunoassays (CLISA), der im folgenden Kapitel 3.3.2 beschrieben wird, verwendet. Ihre Vorteile sind ihre Stabilität über eine lange Zeit, dass ihre Größe über das verwendete Reduktionsmittel gut reguliert werden kann und dass sie mit biologischen Makromolekülen kompatibel sind.

Kolloides Gold in wässriger Lösung ist von orange über rot bis violett gefärbt. Die Färbung hängt von der Größe der Partikel ab und diese wird über die Herstellungsmethode definiert. Bei den geläufigsten Methoden werden Goldpartikel in einer Größe zwischen 5 bis 150nm hergestellt. Die typische Farbe für monodisperses kolloides Gold ist rot. [14]

Eine kolloide Goldsuspension besteht aus kleinen Granulaten in stabiler und einheitlicher Dispersion. Unter dem Licht- und Elektronenmikroskop sehen sie aus wie solide Sphären aus dichtem Material. Das Elektronenmikroskop zeigt die Goldpartikel als dichte, dunkle meist schwarze Marker. Im Lichtmikroskop erscheinen sie als einzelne Lichtpunkte in einem dunklen Hintergrund wegen der hohen Lichtreflexion der Partikel oder als orange-rote Beschichtung, wenn sie dichter an einer Oberfläche gebunden sind. [15]

3.2.1.1 Herstellung der monodispersen kolloiden Goldcluster

Das kolloide Gold wird durch die Reduktion von Goldsalzen erzeugt. Wie groß die Partikel sind und wie stark die Größe der Partikel in der Lösung variiert, hängt von der

Herstellungsmethode ab. Wenn man von Größe der Partikel spricht, ist deren durchschnittlicher Durchmesser gemeint. Wird eine Goldclusterlösung als monodispers bezeichnet, so liegt ihre Abweichung vom Größenmittelwert (coefficient of variation, CV) unter 15%.

Die Methode zur Herstellung der monodispersen kolloiden Goldcluster, die in dieser Arbeit verwendet wird, ist das Verfahren nach Frens. [16] Diese Methode erzeugt monodisperses kolloides Gold mit einem Durchmesser, der zwischen 14 und 50nm liegen kann. Die Größe des Clusters kann durch die Stärke und Menge des Reduktionsmittels (Trinatrium citrat) und durch die Konzentration an Goldchlorid (HAuCl_4) in der wässrigen Lösung beeinflusst werden. Umso mehr und stärker das Reduktionsmittel ist, desto mehr Keimbildner für die Clusterentstehung werden generiert und es bilden sich kleinere Goldcluster. Mit der in Kapitel 6.7 protokollierten Methode werden durch die Reduktion von Goldchlorid (HAuCl_4) mit Trinatrium citrat Goldpartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 17nm erzeugt. [14] Das Au-Atom wird von der Oxidationsstufe +III auf die Oxidationsstufe 0 reduziert.



Goldchlorid + Reduktionsmittel $\rightarrow$ monodisperses kolloides Gold

Der Verlauf der Reduktion ist anhand der Farbe der Goldcluster-Lösung zu beobachten. Das Goldchlorid in dd. H_2O gelöst ist leicht gelblich, bei Zugabe des Reduktionsmittels wird die Lösung dunkelviolet. Der Farbumschlag nach Rot zeigt die Bildung der kolloiden Goldpartikel an.

Direkt nach der Zugabe des Reduktionmittels zur wässrigen Goldlösung kommt es zum Zusammenlagern von Goldatomen und es entsteht ein zentral icoshedraler Goldkern aus zwölf Atomen. Die restlichen Goldatome in der Lösung binden an die entstandenen Goldkerne. Je mehr Kerne in der Lösung gebildet wurden, desto kleiner ist der Durchmesser der entstandenen Goldcluster. Die Kernbildung kann durch die Zugabe des Reduktionsmittels beeinflusst werden. Je größer die Menge an Reduktionsmittel ist, umso kleiner werden die Partikel.

Für die Stabilität der Goldcluster ist es wichtig, dass sie von einer geladenen Schicht, vorzugsweise negativ, umgeben werden. Die Schicht wird von den negativen Ionen in der Lösung gebildet und ist verantwortlich für das zeta-Potential. Dieses Potential stößt die Goldcluster voneinander ab und sorgt dafür, dass sie suspendiert bleiben. [14], [17]

In der kolloiden Suspension herrscht eine Balance zwischen Abstoßung der negativen Ladungen und den anziehenden Kräften, die ein Koagulieren der Partikel verursachen könnten. Wenn sich die Partikel einander annähern, muss die Energiebarriere der abstoßenden Kräfte überwunden werden, um eine Bindung zu erzielen. Diese Barriere kann durch die Zugabe von Elektrolyten gesenkt werden. Die Elektrolyte decken die negative Ladung der Partikel ab. Bei einer bestimmten Konzentration an Elektrolyt, werden die Goldpartikel ein großes Aggregat bilden und ausfallen. Bevor die suspendierten Partikel ausfallen, kann man noch die Farbänderung der Goldclusterlösung von rot zu dunkelviolett beobachten. [15]

3.2.1.2 Binden der Antikörper an die kolloiden Goldcluster

Proteine wie Antigene binden sehr stabil an der Goldclusteroberfläche. Die Antikörper binden mit ihrer Fc-Region an den kolloiden Goldclustern. Die Fab-Region der Antikörper ragt durch die doppelt-ionischen Umgebungsschicht der Goldcluster und ist zum Binden des Antigens da. Um einen stabilen Protein-Gold-Komplex zu bilden kommt es auf verschiedene Wechselwirkungen an (Abbildung 3-8):

- Ionische Wechselwirkungen: Anziehung zwischen dem negativ geladenen Goldpartikel und den positiv geladenen Aminosäuren (z. B. Lysin) des Proteins
- Hydrophobe Wechselwirkungen: Absorption von dem Protein an die Goldoberfläche durch die hydrophoben Taschen (mit z. B. Tryptophan) des Proteins
- Dative Bindung: Potential für eine kovalente Bindung des Goldes an den freien SH-Gruppe des Proteins [15], [17]

Diese Bindungsfähigkeit von Protein an Gold wird bei dem in der Arbeit behandelten cluster-linked immunosorbent assay (CLISA) ausgenutzt.

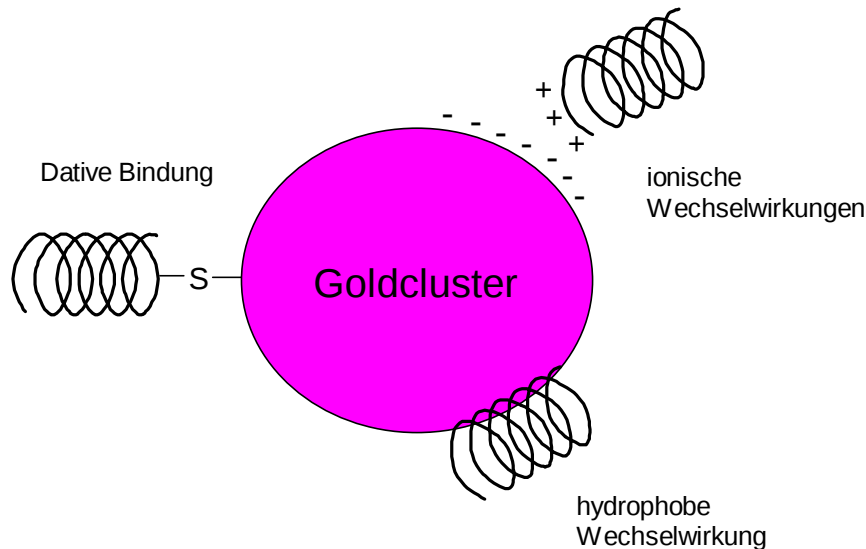


Abbildung 3-8: Drei Mechanismen, die für die Bindung von Proteinen am Goldpartikel verantwortlich sind

3.2.1.3 Stabilität der kolloiden Goldcluster (GCC)

Wenn ein Protein zu einer Goldlösung hinzugefügt wird, kommt es zu einer spontanen Absorption an der Goldoberfläche durch die zuvor angeführten Wechselwirkungen. Beim Herstellen eines GCC-gelabelten Antikörpers wird der Goldclusterlösung schnell unter Rühren eine bestimmte Menge an Antikörper beigefügt. Wenn der Antikörper am Gold gebunden ist, kommt es zu einer Abnahme der Absorption der Lösung bei 580nm. Das zeigt an, dass die Goldpartikel stabilisiert und weniger koaguliert sind. Ob die Goldcluster bei Zugabe des Antikörpers stabil bleiben, hängt von der Art und Menge des Antikörpers ab. In vielen Arbeitsvorschriften wird zur Stabilisierung der kolloiden Suspension nach dem Binden der Antikörper Polyethylenglycol (PEG) oder Block-Reagenzien wie BSA, Milcpulver oder Fischgelatine hinzugegeben.

Bei den in der Arbeit später beschriebenen Versuchen wurden die auf der Goldoberfläche freigebliebenen Stellen mit Fischgelatine und Tween 20 (nicht ionische Flüssigkeit) abgedeckt (Abbildung 3-9).

Die Block-Reagenzien sollen die Goldoberfläche neben den Antikörpern komplett bedecken und dadurch Gold-Gold- und Gold-Protein-Wechselwirkungen verhindern. Es

soll weder zum Ausfallen der Goldcluster noch zu unspezifischen Bindungen kommen.
[15]

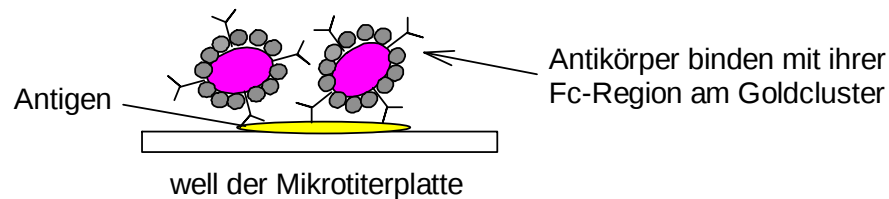


Abbildung 3-9: Antikörper-gelabelte Goldcluster zur Detektion von spezifischen Antigenen. Die freien Stellen auf den Goldclustern neben den Antikörpern wurden mit Blockreagenzien wie Fischgelatine und Tween 20 abgedeckt.

Einige Proteine führen, wenn man sie zu der Goldclusterlösung hinzugibt, zum Ausfallen der Cluster. Die Bildung von größeren Goldaggregaten ist an der Farbänderung der Goldclusterlösung von rot bis zu dunkel violett zu erkennen. Um das Problem des Ausfallens zu verhindern, kann man die Konzentration der zugegebenen Antikörper verringern oder Protein G zur Stabilisierung beifügen. Das Protein G bindet an der Goldoberfläche und schützt das Partikel vor dem Ausfallen, wenn ein weiteres Protein z.B. Antikörper hinzugegeben wird. Die Antikörper bindet dann am Protein G (Abbildung 3-10). [17]

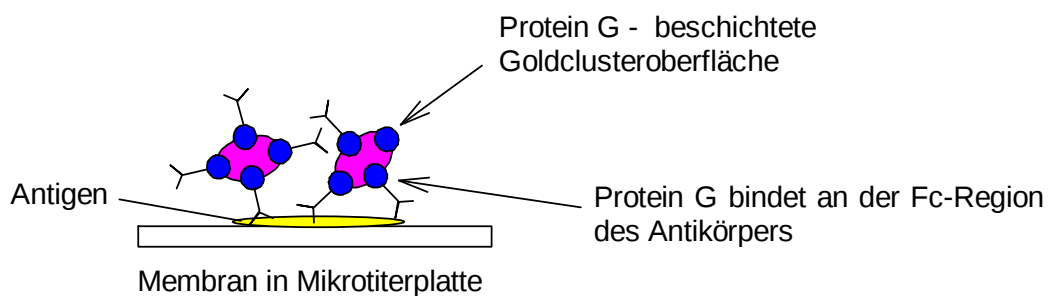


Abbildung 3-10: Stabilisierung der Goldcluster durch Beschichtung mit Protein G

Die Stabilität der Goldclusterlösung muss für jedes Protein getestet werden und durch die Variation der Proteinmenge, durch das Beifügen von Block-Reagenzien, durch die Vermeidung von Elektrolyten (NaCl) oder durch Beschichtung mit Protein G entsprechend eingestellt werden.

3.2.2 CLISA (cluster-linked immunosorbent assay)

Der CLISA ist ein auf Antikörpern basierendes Nachweisverfahren und daher eine Form von Immunoassays. Beim CLISA wird das Labeln mit Goldcluster (GCC) zur Bestimmung von Proteinen wie Antigenen (AG) oder Antikörper(AK) genutzt. Der Antikörper wird für die Detektion mit Goldcluster gelabelt, indem er mit der Fc-Region am Goldcluster bindet. Mit der Fab-Region bindet er an das auf die Mikrotiterplatte gedotete Antigen (Abbildung 3-11).

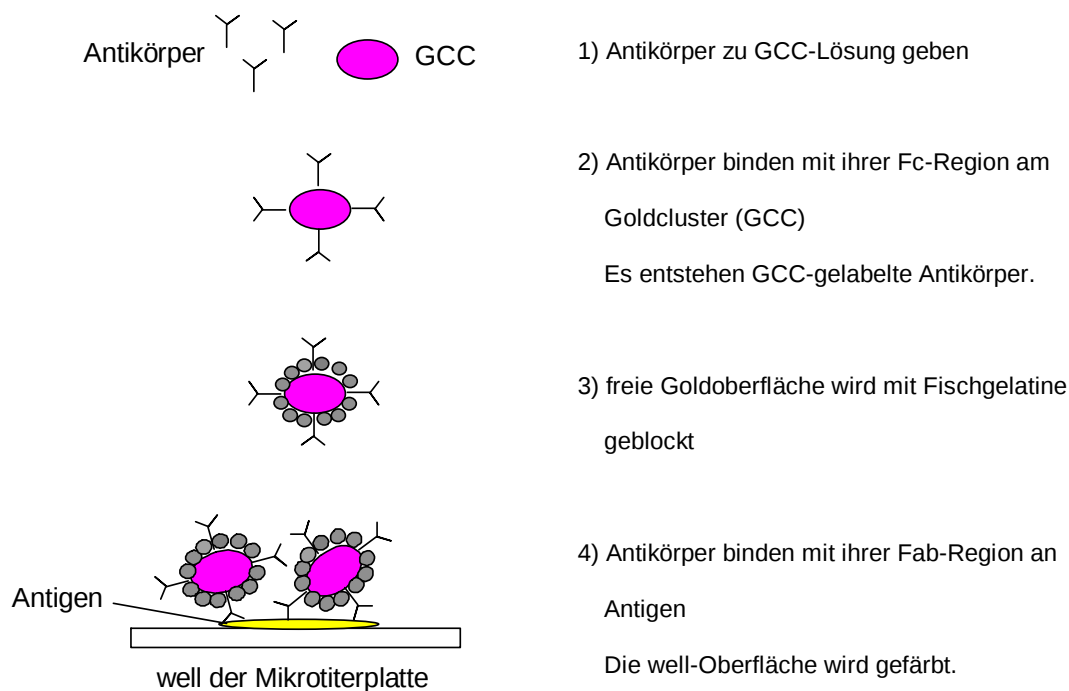


Abbildung 3-11: Schema des CLISAs

Bei einer entstandenen Bindung zwischen Antigen und GCC-gelabeltem Antikörper ist das positive Signal (Rotfärbung der Mikrotiterplatte) mit dem freien Auge zu detektieren. Eine semiquantitative Abschätzung der Analyseergebnisse kann mit Hilfe von Farbskalen erfolgen. Wenn man die Farbintensität des Signals mit der Farbskala einer vorbereiteten Verdünnungsreihe vergleicht, kann man die Konzentration der Probe (Antigen) ermitteln. Zur genauen Messung kann ein ELISA-Reader verwendet werden. Die Sensitivität des Tests ist vergleichbar mit ELISA-Techniken. Die Färbung der Platte ist stabil, denn aufgrund der Farbstabilität der Goldcluster-gelabelten Proteine erfolgt kein

Photobleaching. Diese Farbstabilität erleichtert auch die Langzeitdokumentation und die Archivierung der Ergebnisse. Bei diesem Test ist es sehr wichtig, dass nach Binden der Antikörper an den Goldcluster die restliche GCC-Oberfläche mit Fischgelatine geblockt wird, da es sonst zu unspezifischen Bindungen an der well-Oberfläche kommen kann (Abbildung 3-11). [14], [17]

3.2.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA gehört ebenfalls zu den Immunoassay-Verfahren, deren Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion ist. Zum Nachweis spezifischer Proteine wie Allergene, Antikörper, Peptidhormone oder verschiedener andere reaktiver Proteine werden ELISA-Techniken in unterschiedlicher Form verwendet. Die Auswertung erfolgt dabei mit Hilfe der Bildung von Farbstoffen. Das in Abbildung 3-12 angeführte Schema zeigt den in den Kapiteln 4.4; 6.10 besprochenen und protokollierten Versuch.

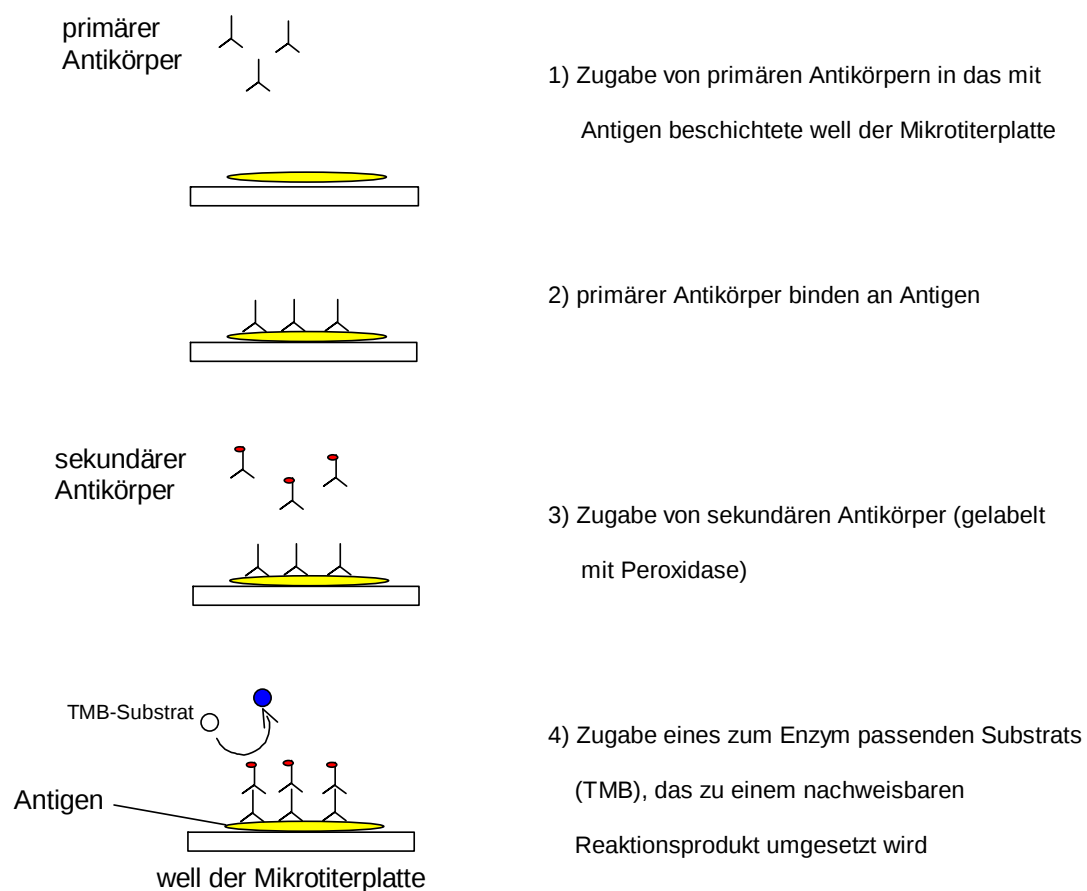


Abbildung 3-12: Schema des ELISAs

Bei dieser Methode wird der nachzuweisende Stoff (Antigen) auf dem Boden des Wells der Mikrotiterplatte aufgebracht. Ein primärer Antikörper, der spezifisch einen Antigen-Antikörper-Komplex mit dem Antigen bildet, wird hinzugesetzt. Nach dem Waschen wird ein mit einem Enzym gelabelter Antikörper (sekundärer Antikörper) zugegeben, der an den primären Antikörper bindet. In diesem Fall ist der Antikörper mit horseradish Peroxidase (HRP) gelabelt. Nach weiterem Waschen wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat zugesetzt. Das farblose Chromogen (TMB) wird dabei von der Peroxidase in ein blaues Zwischenprodukt (TMB Ladungs-Transfer-Komplex) überführt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer 1N H₂SO₄ (Stopplösung) beendet. Durch die daraus resultierende pH-Änderung kommt es zu einer Umwandlung des blauen Oxidationsprodukts in eine gelbe Diimin-Form, das quantitativ bei einer Absorption von 450nm gemessen werden kann (Abbildung 3-13). [18]

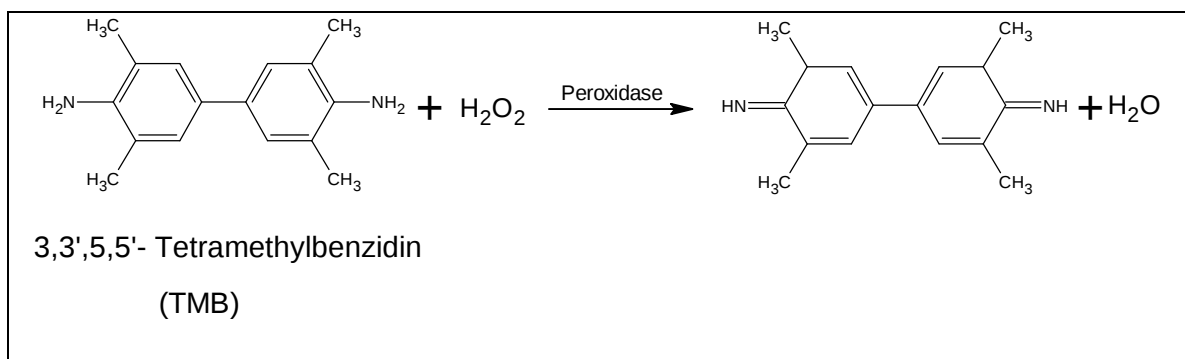


Abbildung 3-13: TMB-Reaktion mit Peroxidase, nach der Zugabe von 1N Schwefelsäure zum Stoppen der Reaktion kann man photometrisch bei 450nm messen

Die Intensität der Farbe steigt mit der Konzentration des gelben Farbstoffes und damit auch mit der Konzentration des zu bestimmenden Antigens. Die Signalstärke ist eine mit einem Photometer gut bestimmbare Funktion der Antigenkonzentration, wenn man sie mit Verdünnungsreihen vergleicht.

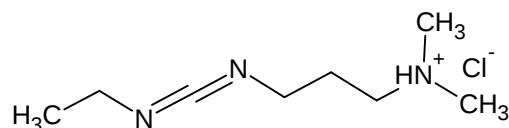
3.3 Zero-Length-Crosslinkers

Für die Durchführung von Crosslinking-Experimenten steht eine große Zahl an verfügbaren Crosslinking-Reagenzien mit unterschiedlichen Längen, Spezifitäten und reaktiven Gruppen zur Verfügung. Sie bestehen aus einem Molekül, das eine Kombination aus zwei oder mehr reaktiven Gruppen beinhaltet. Die Art der reaktiven Gruppen ist abgestimmt auf die Moleküle, die sie verbinden sollen. Die Konjugation kann ohne oder mit zusätzlichen Atomen (Spacer) aus dem Crosslinker stattfinden, das hängt davon ab, welche Distanz zwischen den beiden verbundenen Molekülen benötigt wird.

Bei den Versuchen in dieser Arbeit werden drei Zero-Length-Crosslinker verwendet. Der Zero-Length Crosslinker ist der kleinste Crosslinker, der für eine Biokonjugation verfügbar ist. Er wirkt wie ein Aktivator, der die Bindung zwischen zwei reaktiven Gruppen von verschiedenen Molekülen herbeiführt. Bei der Bindung wird kein zusätzliches Atom (Spacer) eingeführt. Zu den meist verwendeten Zero-Length Crosslinkern gehören die Carbodiimide wie EDC, DCC und DIC. [19], [20]

3.3.1 EDC

EDC (oder EDAC; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) (Abbildung 3-14) ist der am häufigsten genutzte Crosslinker und gehört zu den Carbodiimiden. Er vermittelt die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe und einer Aminogruppe (Abbildung 3-15). EDC ist wasserlöslich und kann deshalb sofort zur Reaktionslösung hinzugefügt werden ohne es zuvor in einem organischen Lösungsmittel zu lösen.



EDC

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
-carbodiimid-hydrochlorid

Abbildung 3-14: Struktur von EDC

Sowohl EDC als auch der Isoharnstoff, der als Nebenprodukt der Crosslinking-Reaktion gebildet wird, sind sehr gut wasserlöslich und beide können einfach durch Dialyse oder Gelfiltration vom Produkt entfernt werden. EDC-Lösungen müssen immer frisch hergestellt und sofort verwendet werden. Es ist nicht ratsam eine wässrige EDC-Lösung zum weiteren Gebrauch aufzubewahren, weil sich der Crosslinker bei Anwesenheit von Wasser rasch zersetzt. [21]

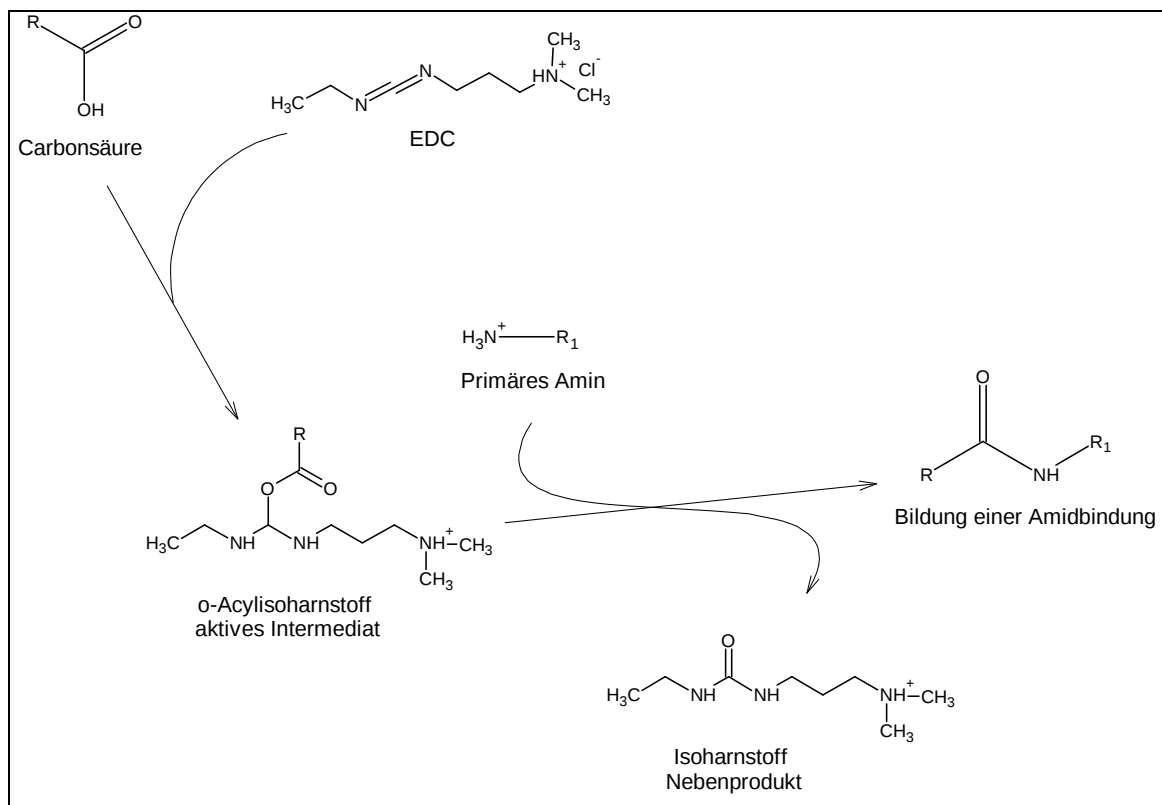


Abbildung 3-15: EDC-Funktionsweise als Crosslinker

Das EDC reagiert mit der Carbonsäure zu o-Acylisoharnstoff, das ist ein hoch reaktionsfreudiges Intermediat. Dieses aktive Intermediat reagiert mit einem Nukleophil wie ein primäres Amin und es entsteht eine Amid-Bindung (Abbildung 3-15). Andere Nucleophile wie Moleküle mit Thiol-Gruppen reagieren mit dem o-Acylisoharnstoff zu Thioestern, aber diese sind nicht so stabil wie die Amid-Bindung mit den Aminen. Sauerstoffatome, die im Wassermolekül zu finden sind, greifen auch als Nukleophil das Intermediat des EDCs an. In wässrigen Lösungen kann es zur Hydrolyse des aktiven Intermediats kommen, dabei bildet sich Isoharnstoff und die Carboxylgruppe der Carbonsäure wird regeneriert. Somit steht der o-Acylisoharnstoff nicht mehr für ein

anderes Nukleophil zu Verfügung und es kommt zu keiner Crosslinking-Reaktion. Dieser Vorgang setzt die Effizienz des EDC als Crosslinker herab. Um ein stabiles Intermediat zu bilden wird EDC oft sulfo-NHS zugesetzt, das Reaktionsschema wird im folgenden Kapitel 3.3.2 beschrieben.

Ein weiteres Problem stellt die Selbstpolymerisation dar. Wenn eines der Moleküle sowohl eine Carboxyl- als auch eine Aminogruppe trägt, kann es vorkommen, dass bei Zugabe von EDC das Molekül mit einem Molekül derselben Art reagiert und keine Bindung mit dem anderen, für die Bindung vorgesehenen Molekül eingeht.

Das Reaktionsmedium für das Crosslinken mit EDC soll für optimale Bedingungen bei einem pH zwischen 4,7 bis 7,5 liegen. [21]

3.3.2 EDC mit sulfo-NHS

Häufig wird EDC in Kombination mit sulfo-NHS (n-Hydroxysulfosuccinimid) eingesetzt, weil es die Effizienz des Crosslinkers erhöht. Sulfo-NHS ist das ungeladene Analogon zu NHS (n-Hydroxysuccinimid). Im Gegensatz zum NHS ist es wasserlöslich, stabiler und hydrolysiert nicht so schnell.

Das Problem beim Crosslinken mit EDC allein ist, dass das gebildete Intermediat o-Acylisoharnstoff nicht schnell genug mit den primären Aminen reagiert. Deshalb kann es zur Hydrolyse des Intermediats kommen und es entstehen Isoharnstoff und das carboxylgruppen-haltige Ausgangsprodukt. Somit steht das hydrolysierte Intermediat nicht mehr zum Crosslinken zur Verfügung. Die Hydrolyse findet verstärkt statt, wenn das Zielmolekül nur in niedriger Konzentration vorliegt.

Bei Zugabe von EDC in Kombination mit sulfo-NHS entsteht durch die Reaktion der Hydroxygruppen am sulfo-NHS mit dem EDC aktivierten Ester-Komplex ein Intermediat mit besserer Wasserlöslichkeit und Stabilität. Dieser Sulfo-NHS-ester hat hydrophile reaktive Gruppen, die sofort mit den primären Aminogruppen auf dem Zielmolekül reagieren und daraus eine Amid-Bindung entsteht (Abbildung 3-16).

Die Gesamtreaktion ist eine 2-Schritt-Reaktion und es entsteht dasselbe Produkt mit Amid-Bindung wie durch die 1-Schritt-Reaktion nur mit EDC. Der Vorteil der 2-Schritt-Reaktion mit EDC und sulfo-NHS liegt bei den höheren Ausbeuten.

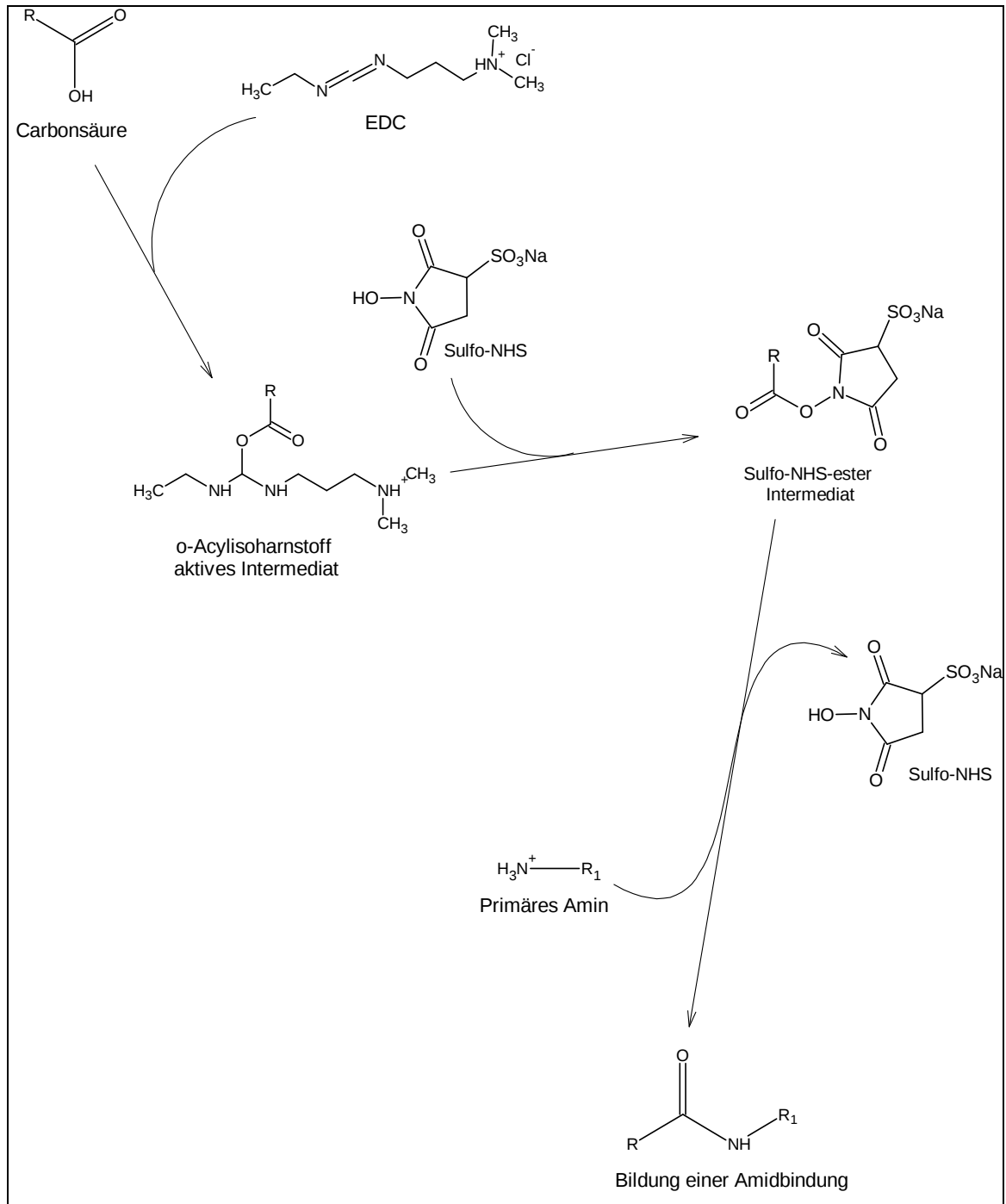
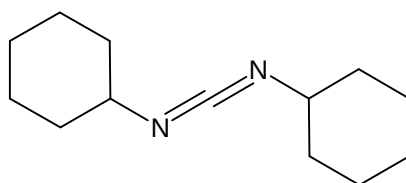


Abbildung 3-16: EDC + sulfo-NHS – Mechanismus als Crosslinker

Einen Nachteil gibt es aber auch bei dieser Version des Crosslinkers. Ungeachtet der Nebenreaktionen des EDCs kommt es durch die hohe Effizienz der sulfo-NHS-begleiteten Reaktion zu unlöslichen Konjugaten z. B. beim Koppeln von Peptiden an Trägerproteine. In diesen Fällen muss die Menge an EDC/sulfo-NHS, die man zugibt, verringert werden oder sulfo-NHS weggelassen werden. [19], [20], [22]

3.3.3 DCC

In der organischen Synthese ist DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) (Abbildung 3-17) eines der am häufigsten eingesetzte Kopplungsreagenzien. Es ist ein wachsartiger Feststoff, der bereits bei Hautkontakt giftig wirken kann. Seine Dämpfe können Reizungen der Atemwege und Augenschädigungen hervorrufen. Deshalb sollte beim Umgang mit DCC immer Handschuhe getragen und ausschließlich unter dem Abzug gearbeitet werden.



DCC

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

Abbildung 3-17: Struktur von DCC

DCC ist wie EDC ein Carbodiimid und es reagiert mit einer Carboxylgruppe zu einem o-Acylisoharnstoff. Dieses instabile Intermediat wird von Nukleophilen wie primären Aminen angegriffen und es kommt neben der Abspaltung eines Dicyclohexylharnstoffs zu einer Amidbindung (Abbildung 3-18).

Anders als EDC ist DCC nicht wasserlöslich und die Synthese des aktiven Esters durch die Carboxylgruppe und DCC findet in organischen Lösungsmitteln statt. Daher spielt das Problem des EDCs, die Hydrolyse des wasserlöslichen Ester-Intermediats, bei DCC keine Rolle. Das Nebenprodukt der DCC-Kopplungsreaktion, Dicyclohexylharnstoff ist ebenfalls wasserunlöslich und zusätzlich in den meisten organischen Lösungsmitteln nicht löslich. Es muss aufwendig von der Reaktionslösung abgetrennt werden.

Das Potential für unerwünschte Nebenreaktionen gibt es auch beim DCC-Crosslinking. Die durch DCC-aktivierte Carboxylverbindung kann mit einer Aminosäure ein Azlacton bilden. Das Azlacton reagiert mit einem Amin zu einer kovalenten Amidbindung, aber das entstandene Produkt ist nicht das Amid, das aus einer direkten Zero-Length-Crosslinking-Reaktion mit DCC entsteht. [21]

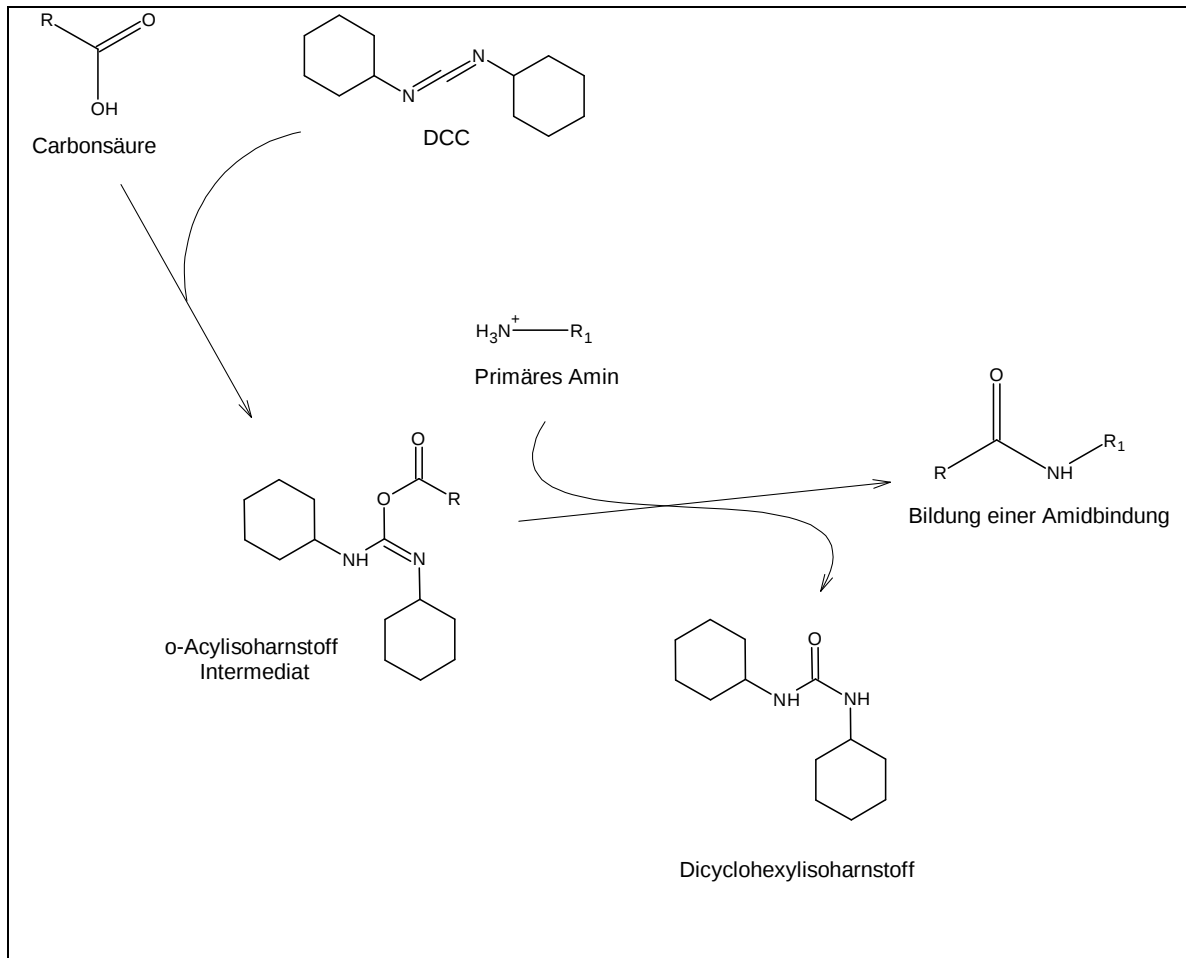


Abbildung 3-18: DCC-Funktionsweise als Crosslinker

Eine weitere Konkurrenzreaktion bei der Veresterung ist häufig eine spontane Umlagerung des *o*-Acylisoharnstoffs, wobei sich irreversibel N-Acylharnstoff bildet (Abbildung 3-19). Zur Umlagerung kommt es besonders oft in aprotischen, organischen Lösungsmitteln wie DMF.

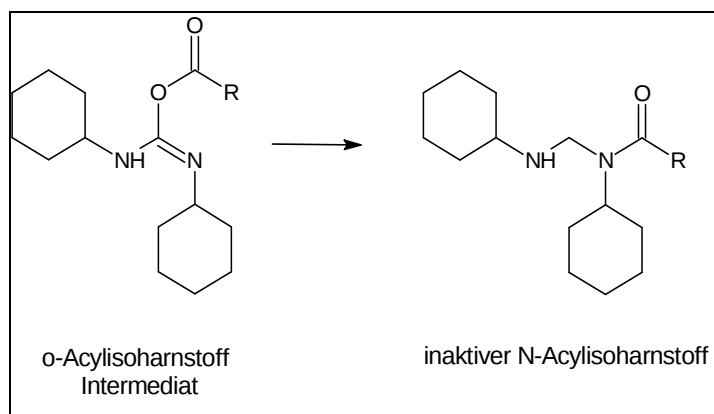


Abbildung 3-19: Umlagerung von *o*-Acylisoharnstoff in N-Acylharnstoff

3.3.4 DCC mit NHS

Die im vorherigen Kapitel 3.3.5 beschriebenen Nebenreaktionen der DCC-Crosslinking-Reaktion können durch den Zusatz von NHS (N-Hydroxysuccinimid) (Abbildung 3-20) vermindert werden und dadurch die Effizienz der Reaktion erhöht werden. NHS wird oft als Zusatz von DCC in der organischen Chemie verwendet, da es sich gut in organischen Lösungsmitteln löst.

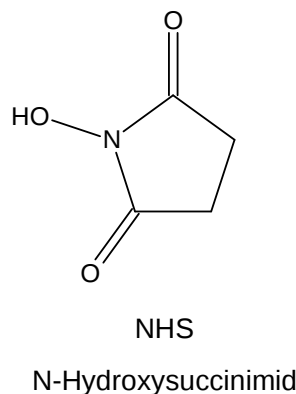
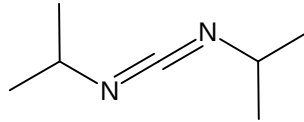


Abbildung 3-20: Struktur von NHS

Der Vorteil des NHS ist das es, wie das auch schon beim Reaktionsverlauf von EDC und Sulfo-NHS zu sehen war (Abbildung 3-16), zur größeren Stabilität des Intermediats führt und die Bindung mit dem Amin forciert. Weiters verhindert es die Umlagerung des o-Acylisoharnstoffes, die zu einem inaktiven Produkt führt. Die Amidbildung durch DCC und NHS verläuft nach dem gleichen Schema wie die Kopplung durch EDC und sulfo-NHS (siehe Abbildung 3-16). [21]

3.3.5 DIC

DIC (N,N'-Diisopropylcarbodiimid) (Abbildung 3-21) ist ein symmetrisches Carbodiimid und ein weiterer wasserunlöslicher zero-length Crosslinker. Gegenüber DCC hat DIC den Vorteil, dass es bei Raumtemperatur flüssig ist und deshalb besser in der Reaktionslösung verteilt werden kann.



DIC

N,N'-Diisopropylcarbodiimid

Abbildung 3-21: Struktur von DIC

Das Nebenprodukt des DIC bei der Crosslinking-Reaktion, der Diisopropylharnstoff ist löslicher in organischen Lösungsmitteln als das Nebenprodukt von DCC.

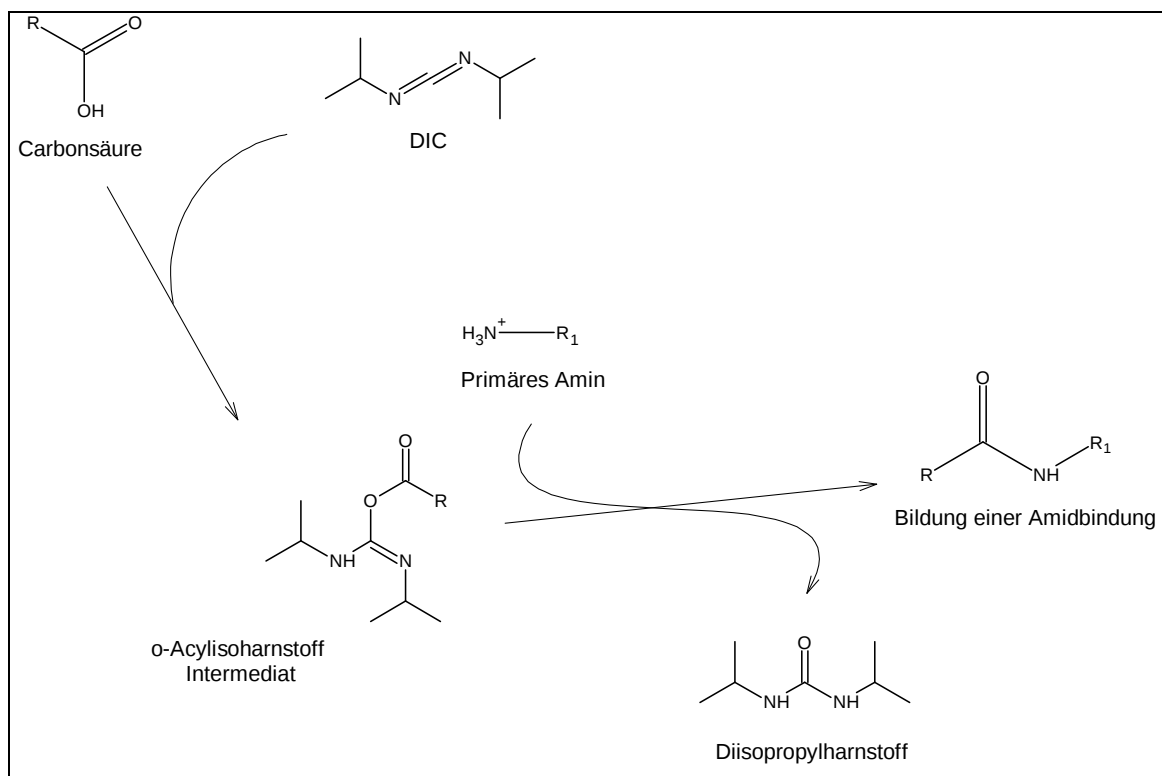
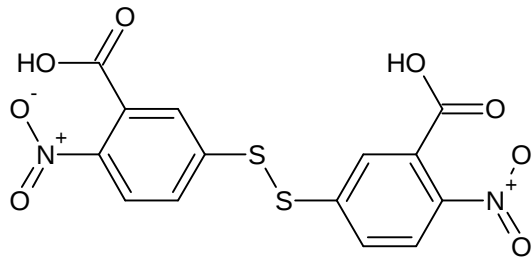


Abbildung 3-22: DIC-Funktionsweise als Crosslinker

Die DIC-Funktionsweise als Crosslinker ist der des DCC ähnlich (Abbildung 3-22). Das symmetrische Carbodiimid DIC reagiert mit einer Carboxylgruppe und bildet ein aktives Ester-Intermediat. Dieses koppelt an ein Amin und eine Amid-Bindung entsteht. Wie auch beim DCC kann es bei der Reaktion mit DIC zu Nebenreaktionen kommen, die die Ausbeute verringern. Aus diesem Grund kann NHS zugegeben werden. [21]

3.4 Ellman's – Test

Der Ellman's-Test ist zur Bestimmung von freien Sulfhydryl(Thiol)gruppen geeignet. Das dabei eingesetzt Ellman's Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) (DTNB) reagiert mit den freien Sulfhydrylgruppen unter leicht alkalischen Bedingungen (pH 8,0) und setzt die chromogene Verbindung, 5- Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) frei (Abbildung 3-23).



Ellman's Reagenz

5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)

Abbildung 3-23: Struktur des Ellman's Reagenz

Das Ellman's Reagenz besteht aus zwei TNB-Gruppen, die durch eine Disulfid-Bindung miteinander verbunden sind. Das Molekül, das die SH-Gruppen enthält, sollte in unprotonierter Form vorliegen. Aus diesem Grund wird der Ellman's-Test bei einem pH von 8,0 durchgeführt. Dabei entsteht ein gemischtes Disulfid, und eines der Produkte, das TNB, kann bei 412nm spektroskopisch erfasst werden (Abbildung 3-24). Optisch ist die Anwesenheit von Sulfhydrylgruppen durch eine Gelb- bis Orange-Färbung des zuvor farblosen Ellman's Reagenz zu erkennen. Der Anstieg der Absorption bei 412nm ist proportional zur Konzentration der Sulfhydrylgruppen in der Probenlösung und durch Vergleich mit einer Standardkurve ist die Konzentration zu ermitteln. [23]

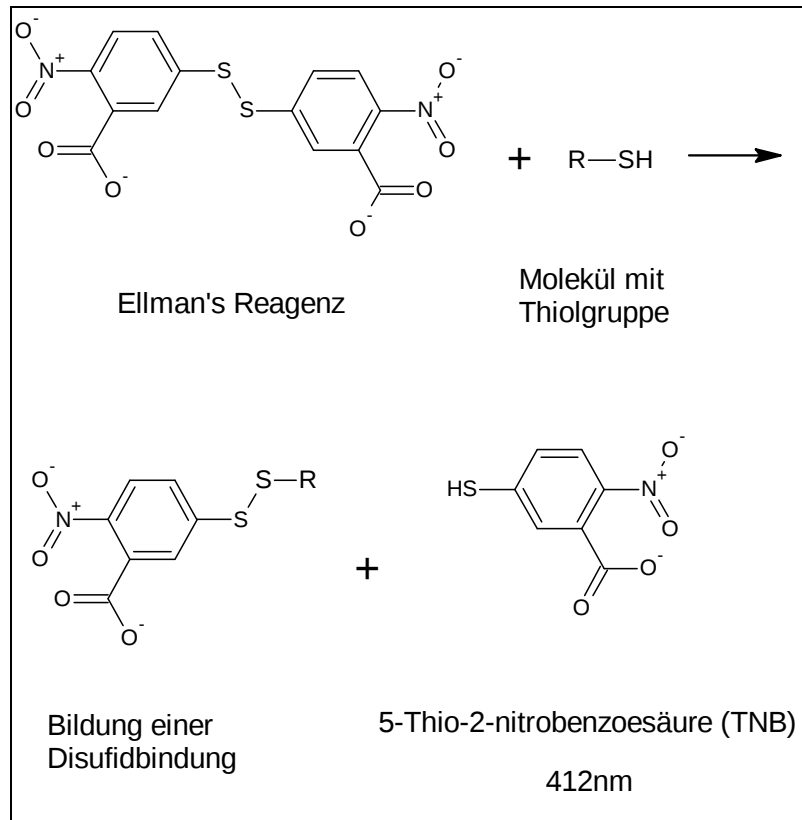


Abbildung 3-24: Mechanismus des Ellman's Tests

4 Ergebnisse

4.1 Aminogruppen-Nachweise

Eine Aufgabe der Masterarbeit war es zu versuchen, die Anzahl der freien primären Aminogruppen auf den Trägermaterialien zu bestimmen. Es wurden vier Methoden auf ihre Anwendbarkeit zur Problemstellung getestet. Das waren die Aminogruppen-Bestimmungen mit TNBS, mit OPA, mit dem enzymatischen Assay mit Hilfe von alkalischer Phosphatase und mit dem Kaisertest (Ninhydrin).

Je mehr Aminogruppen pro Flächeneinheit auf dem Träger vorhanden sind, desto mehr Bindungsstellen für die Nanopartikel mit Wirkstoff können verankert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Partikel gezielt am Implantat gebunden werden.

4.1.1 TNBS

(Durchführung siehe Kapitel 6.2)

Die TNBS-Versuche wurden an silanisierten controlled-pore glass beads (GBs) durchgeführt, da diese im Vergleich zu silanisierten Glasplättchen eine größere Oberfläche bieten und damit mehr Aminogruppen enthalten. Die NH_2 -Gruppen sollten indirekt bestimmt werden, d. h. TNBS bindet sich an die Aminogruppen, die an den silanisierten GBs hängen. Dadurch wird eine zum Aminogruppen-Gehalt der silanisierten GBs proportionale Menge an TNBS aus der Lösung entfernt. Die überstehende TNBS-Lösung wurde abpipettiert, mit Ethanolamin im Überschuss versetzt und gemessen. Anhand des ermittelten TNBS-Gehalts in der überstehenden Lösung, kann die Menge an Aminogruppen pro Gramm GB berechnet werden.

Es wurden mehrere TNBS-Verdünnungen ausprobiert (siehe Tabelle 7-1 und Abbildung 7-1) und man hat sich für die 1:20-Verdünnung entschieden, weil eine Verdünnung zwischen der 1:10- und der 1:50-Verdünnung am beste geeignet ist. Die silanisierten GBs wurden mit TNBS-Lösung versetzt und 1h bei 37°C geschüttelt. Das sollte dazu führen, dass sich TNBS an die Aminogruppen bindet und sich der Meisenheimer Komplex bildet.

Dieser Komplex sollte über die Aminogruppe an die GBs gebunden bleiben und diese orange färben. Aber es waren nach der 1h schütteln nicht nur die GBs, sondern auch die Lösung leicht gelblich gefärbt. Die Abbildung 4-1 zeigt die Absorption dieser schwach gelben Lösung. Vermutlich waren einige der gebildeten Meisenheimer Komplexe löslich und haben zu der Färbung der Lösung geführt. Es ist anhand von Abbildung 4-1 zu sehen, dass TNBS mit den Aminogruppen reagiert hat und es auch selektiv genug ist, um einen Mengenunterschied zwischen 2g und 3g GBs zu zeigen, aber wegen der Eigenfärbung der Lösung ist ein genauer indirekter quantitativer Nachweis der Aminogruppen an den GBs nicht möglich. Trotzdem wurde der Aminogruppen-Nachweis mit TNBS weitergeführt, um das Verhalten des instabilen Meisenheimer Komplexes zu dokumentieren und den Verlauf des Nachweises zu zeigen.

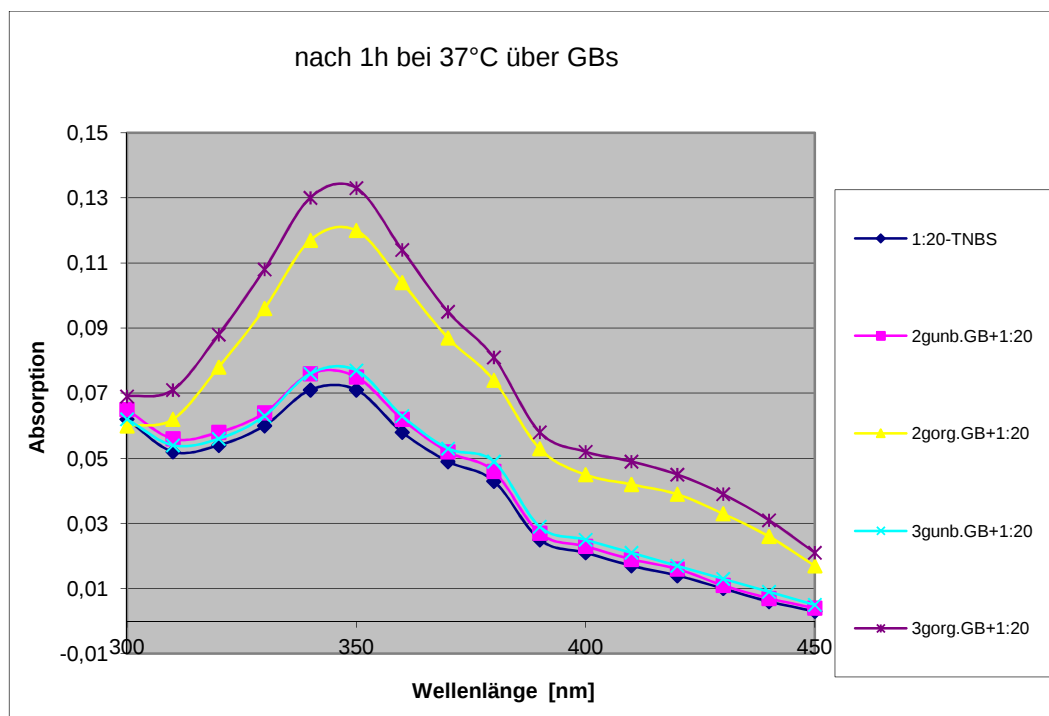


Abbildung 4-1: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln und Trennen des Überstands von GBs; unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-2)

Der Vergleich von Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2 zeigt die Instabilität des Meisenheimer Komplexes. Innerhalb von 1h bei 37°C ist schon ein Teil des gebildeten Komplexes wieder zerfallen.

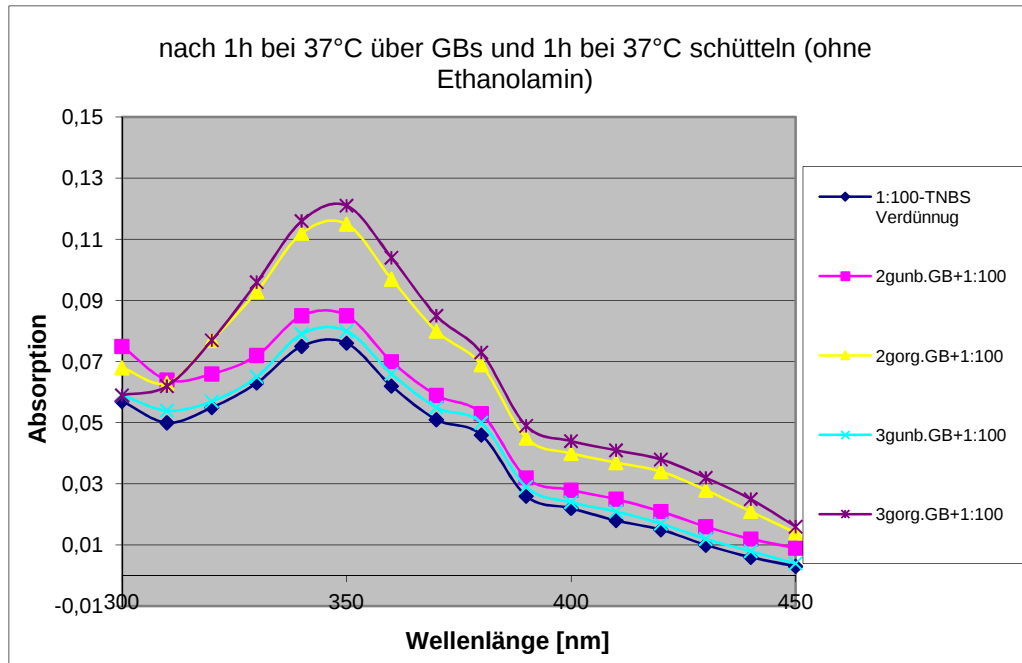


Abbildung 4-2: TNBS(1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen und 1h bei 37°C weiterschütteln (ohne Ethanolamin); unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-3)

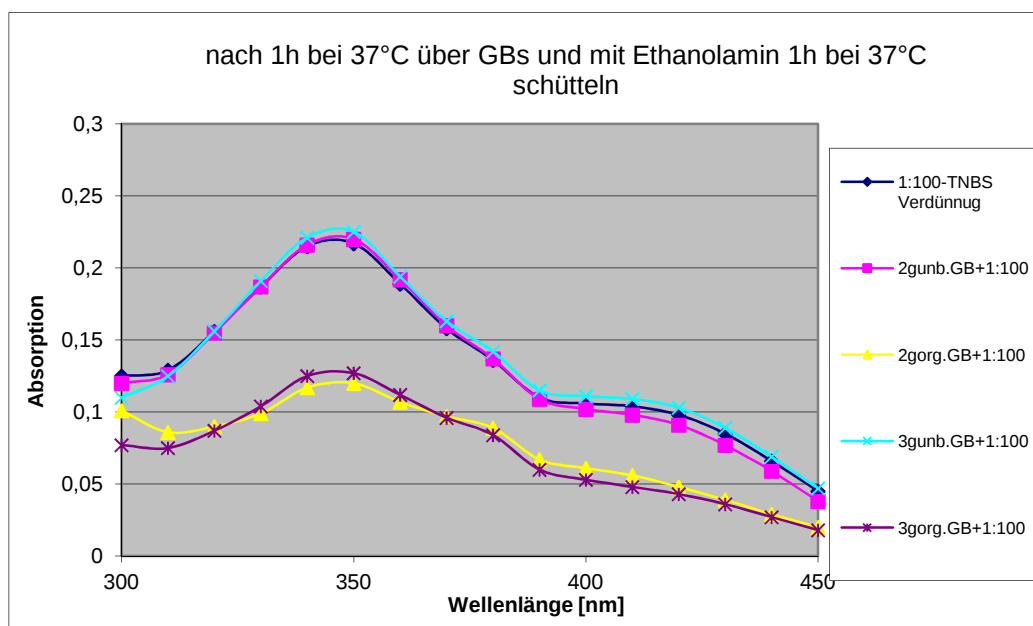


Abbildung 4-3: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen, dann Ethanolamin hinzufügen und 1h bei 37°C weiterschütteln; unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-4)

In Abbildung 4-3 ist die Absorption der Lösung nach Zugabe von Ethanolamin und einer weiteren Stunde bei 37°C zu sehen. Sie zeigt, dass der in Lösung gegangene

Meisenheimer Komplex nur ein kleiner Teil des gebildeten Komplexes war, der größere Teil bleibt an die GBs gebunden. Die 1:20-Verdünnung und die unbehandelten GBs zeigen die höchste Absorption, weil kein TNBS aus der Lösung entzogen wurde. Die organisch silanisierten GBs haben eine geringere Absorption durch das an die Aminogruppen gebundene und somit aus der Lösung entzogene TNBS. Aber es gibt kaum einen Unterschied zwischen den 2g und 3g der organisch silanisierten GBs. Das spricht auch dafür, dass die TNBS-Methode zu unempfindlich ist und nicht geeignet für die exakte quantitative Bestimmung der Aminogruppen auf den GBs.

Trotzdem kann der TNBS-Nachweis eine Tendenz für die Menge an Aminogruppen, die bei der organischen oder wässrigen Silanisierung entsteht, wiedergeben. Abbildung 4-4 zeigt, dass die Lösung über den organisch silanisierten GBs die geringste Absorption verursacht. Aus dieser Lösung wurde das meiste TNBS durch die Aminogruppen an den GBs gebunden und der Lösung entzogen. Daraus folgt, dass durch die organische Silanisierung mehr Aminogruppen ans Trägermaterial gebunden werden als durch die wässrige Silanisierung.

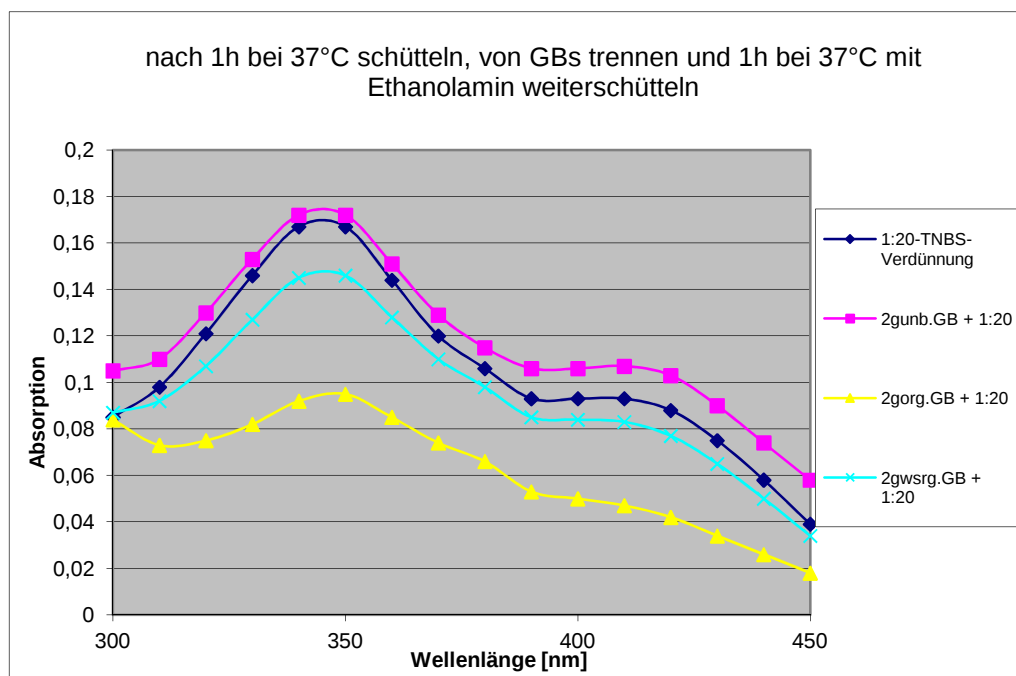


Abbildung 4-4: TNBS-Vergleich zwischen organisch, wässrig silanisierten und unbehandelten GBs, unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert; wsrg. = wässrig aminosilanisiert(Daten siehe Tabelle 7-5)

4.1.2 OPA

(Durchführung siehe Kapitel 6.3, 6.4)

Ebenso wie der TNBS-Nachweis wurde auch die Aminogruppen-Detektion mit OPA als indirekte Methode durchgeführt. Auf organisch silanisierten GBs wurde eine definierte Menge o-Phthaldialdehyd(OPA)/2-mercaptoethanol(MEO)-Lösung pipettiert. OPA reagiert in Anwesenheit von reduzierenden Schwefelverbindungen, wie 2-Mercaptoethanol im alkalischen Medium zu Isoindolderivaten, die fluoreszieren. Diese fluoreszierenden Derivate sollten an den GBs gebunden bleiben und anhand der aus der Lösung entfernten Menge an OPA sollte man auf die Anzahl an Aminogruppen pro Gramm GB zurückschließen können. Die über den GBs befindliche Lösung wurde abpipettiert, mit Ethanolamin versetzt und mit dem Fluorimeter gemessen.

Tabelle 4-1 zeigt die gemessenen Emissionen bei 455nm. Zum Versuch wurden nur organisch silanierte GBs und keine wässrig silanierten GBs verwendet, weil der Aminogruppen-Nachweis mit TNBS zeigte, dass die organisch silanierten GBs mehr Aminogruppe besitzen. Die ersten drei Zeilen der Tabelle zeigen die Werte der OPA/MEO-Lösung ohne GBs, der OPA/MEO-Lösung über unbehandelten GBs und der OPA/MEO-Lösung über den organisch silanierten GBs nach 30min Rühren im Dunklen. Die letzten drei Zeilen zeigen die Werte nachdem man die Lösungen über den GBs abpipettiert, zentrifugiert, mit Ethanolamin versetzt und weiter 30min im Dunklen gerührt hat.

OPA/MEO-Lösung +	Emission bei 455nm
ohne glass beads	1,636
2g unbehandelte glass beads	3,902
2g org. silanierte glass beads	15,476
+Ethanolamin	0,445
2g unbehandelte glass beads + Ethanolamin	0,0766
2g org. silanierte glass beads + Ethanolamin	0,018

Tabelle 4-1: Messung der Emission von fluoreszierenden OPA-Derivaten am Fluorimeter bei 455nm

Da die Werte vor der Ethanolaminzugabe viel höher waren als danach, ist wahrscheinlich so wie bei der TNBS-Methode ein Teil des fluoreszierenden Isoindolderivats in Lösung gegangen. Solche Isoindole sind oft sehr reaktiv und instabil. Das kann der Grund sein, warum diese von den GBs gelösten Derivate bei der Messung nach der Zugabe von Ethanolamin nicht mehr zur Fluoreszenz beigetragen haben und deshalb die Werte viel niedriger waren. Ein anderer Grund für die niedrigen Werte nach der Ethanolaminzugabe kann auch die Instabilität der OPA/MEO-Lösung sein. Die Abbildung 4-5 zeigt die Zeitabhängigkeit der OPA/MEO-Lösung. Zur Lösung wurde sofort, 20min und 40min nach ihrer Herstellung Ethanolamin hinzugefügt und in einem mit Alufolie umwickelten Gefäß bei RT gerührt. Ab der Zugabe von Ethanolamin wurde nach Zeitabständen von einigen Minuten jeweils Lösung entnommen und gemessen. Die Abbildung 4-5 zeigt, wie wichtig es ist die OPA/MEO-Lösung frisch herzustellen und wie instabil der gebildete Fluorophor ist. Aus diesem Grund ist der Aminogruppen-Nachweis mit OPA in der indirekten Methode quantitativ nicht durchführbar.

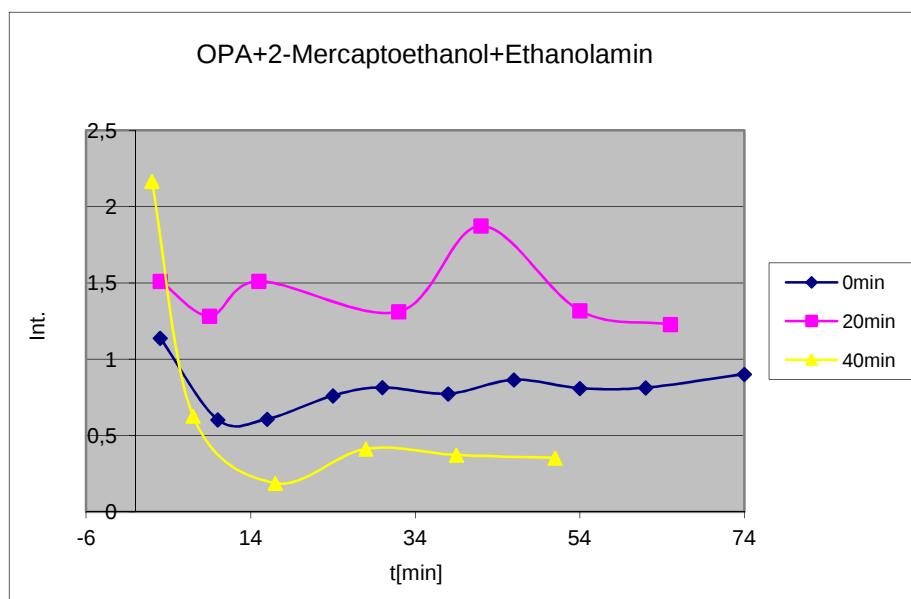


Abbildung 4-5: Zeitabhängigkeit von OPA (Daten siehe Tabelle 7-6)

OPA kann jedoch für die Sichtbarmachung der Aminogruppen auf Glasplättchen und deren Verteilung verwendet werden. Auch den Vergleich zwischen wässriger und organischer Silanisierung kann man dadurch ziehen. Diese Methode wird in der Publikation [11] vorgestellt.

4.1.3 Enzymatische Assay mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase

(Durchführung siehe Kapitel 6.5)

Der Enzymassay mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP) wurde nur auf Glasplättchen durchgeführt, da sich die Reste des nicht gebunden Glutaraldehyds und die ungebundene AP von den Glasplättchen am besten durch Waschen entfernen lassen.

Der Versuch wurde öfters durchgeführt, wobei die Waschschritte und die Reaktionszeiten mit dem Glutaraldehyd, mit der AP und mit dem p-NPP immer wieder verändert wurden. Das Problem war, dass sich neben der p-NPP-Lösung über den organisch silanisierten Plättchen auch die Lösung über den unbehandelten (d. h. nicht silanisierten) Plättchen gelblich verfärbt. Es wurde die Anzahl der Waschschritte erhöht, die Waschlösungen variiert und die Reaktionszeit des Glutaraldehyd mit den Glasplättchen verringert, aber trotzdem verfärbte sich die p-NPP-Lösung gelblich und die Messwerte variierten stark. Das Protokoll (siehe 6.5) zeigt die als letzte nach den Änderungen versuchte Durchführung des Enzym Assays. Die gemessenen Werte konnten nicht zur Ermittlung der Menge an Aminogruppen auf den Plättchen verwendet werden, da man auf Grund der Gelbfärbung der p-NPP-Lösung über den unbehandelten Plättchen davon ausgehen musste, dass es zu unspezifischen Bindungen kam. Es ist möglich, dass der Glutaraldehyd vielleicht nicht nur die Aminogruppen der silanisierten Oberfläche des Plättchens aktiviert hat, sondern die ganze Plättchenoberfläche bedeckte und die AP gebunden hat. Ein anderer Grund könnte sein, dass sich die AP nicht nur spezifisch an das Glutaraldehyd gebunden hat.

Um den Enzym-Assay für die Aminogruppen-Bestimmung auf den silanisierten Glasplättchen durchführen zu können, müssten wahrscheinlich noch einige Parameter an der Versuchsdurchführung geändert werden.

4.1.4 Kaisertest- Ninhydrin

(Durchführung siehe Kapitel 6.6)

Der Aminogruppen-Nachweis mit Ninhydrin wurde ebenfalls als indirekte Methode, wie mit OPA und TNBS, durchgeführt, um eine exakte Quantifizierung der Aminogruppen auf den Trägermaterialien zu erreichen. Jedoch ist der zwischen Ninhydrin und dem N-Atom

der Aminogruppe gebildete Farbstoff „Ruhemanns Blau“ leicht löslich und färbte sowohl die Trägeroberfläche als auch die Lösung. Aus diesem Grund war eine exakte Bestimmung der Aminogruppen auf dem Träger nicht möglich.

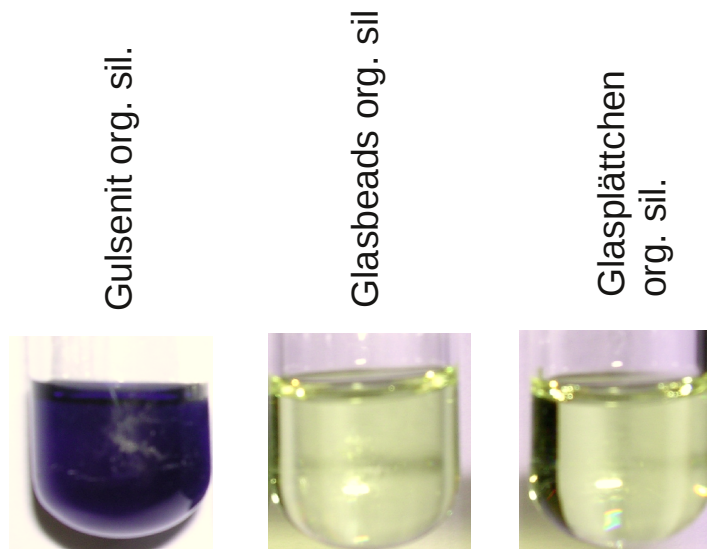


Abbildung 4-6: Detektion der freien Aminogruppen mit dem Kaisertest: Vergleich der Anzahl der Aminogruppen der organischen Silanisierung von Glasplättchen, glass beads und Gulsenit

Trotzdem wurde der Kaisertest (Protokoll siehe 6.6) zum Vergleich der einzelnen Trägermaterialien und deren Effizienz bei der organischen Silanisierung genutzt. In Abbildung 4-6 ist zu sehen, dass organisch silanisiertes Gulsenit eine tief blaue Farbe mit der Ninhydrin-Lösung entwickelte. Das lässt auf eine große Menge an freien Aminogruppen auf dem Gulsenit schließen. Gulsenit ist ein poröses Silikat und bietet nach der Silanisierung eine große Oberfläche mit Aminogruppen an. Bei den beiden anderen Trägermaterialien gab es nur eine gelbliche Färbung der Lösung, was zeigt, dass die Detektionsgrenze des Kaisertests unterschritten war. Der Kaisertest ist nicht empfindlich genug, um die Aminogruppen auf den Glasplättchen und auf den nichtporösen GBs ausreichend gut zu detektieren.

Anscheinend kann die größere Menge an Aminogruppen auf Gulsenit bei der organischen Silanisierung gut genutzt werden und damit bietet Gulsenit nach dem Silanisieren im Gegensatz zu den Glasplättchen und Glasbeads eine große Menge von Aminogruppen an.

4.2 CLISA: Vergleich der Intensität von alten und neuen BSA- und HSA-Lösungen und alter und neuer Goldclusterlösung

(Durchführung siehe Kapitel 6.7, 6.8)

Ein CLISA (cluster-linked immunosorbent assay) ist ein Immunassay bei dem kolloide Goldcluster zur Markierung eines Antikörpers genutzt werden. Ein wichtiger Teil des CLISA, der sich entscheidend auf die Empfindlichkeit des Tests auswirkt, ist die Intensität der Rotfärbung auf den mit Probe beschichteten Wells der Mikrotiterplatte. Sie zeigt an wie hoch die Konzentration der Probe ist. Aus diesem Grund muss man die optimalen Bedingungen entwickeln, damit die Färbung abhängig von den Konzentrationen der Proben gut zu sehen ist.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Versuchs besprochen, bei dem der CLISA mit alten und neuen Albumin und alter und neuer Goldclusterlösung durchgeführt wurde. Die einzelnen Schritte der Durchführung sind im Kapitel 6.8 beschrieben. Das hier gebrauchte Adjektiv „alt“ bedeutet, dass die Lösungen einen Tag alt waren und zwischen Herstellung und Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Die Eigenschaft „neu“ sagt aus, dass die Lösungen frisch hergestellt wurden. Das Labeln der Antikörper mit den kolloiden Goldclustern wurde immer zur vor dem Start des Test am selben Tag gemacht.

Der CLISA sollte getestet und optimiert werden, weil er in Rahmen des Projekts „Entwicklung von neuartigen Implantatoberflächen“ für Analysen und Titerbestimmungen genutzt wurde. Unabhängig von dem Projekt zeigten sich für den CLISA auch andere Einsatzmöglichkeiten nämlich im Bereich der Allergietests.

Beim CLISA wurden Dynatech Microlite™ 2 Platten genutzt und die BSA (bovine serum albumin)- oder HSA (human serum albumin)-Verdünnungsreihen wurde beginnend mit der höchsten Konzentration von links nach rechts aufgetragen (500µg/ml-0,005ng/ml Albumin). Die verwendeten Antikörper waren mc-anti-HSA Antikörper (monoklonal), pc-anti-BSA Antikörper (polyklonal) und mc-anti-β-Galactosidase Antikörper (monoklonal).

In der Reihe A der Platte wurde der CLISA durchgeführt und in den Reihen B – F wurden die Negativkontrollen dazu gemacht. Dabei wurde getestet, ob die Goldcluster (GCC)

auch ohne Antikörper (Reihe B) oder mit einem anderen, nicht für die Albumine spezifischen, Antikörper (Reihe C) binden. Eine weitere Negativkontrolle war die unspezifische Bindungsfähigkeit von den GCC-gelabelten Antikörpern auf unbeschichteten (ohne Albumin) Wells zu kontrollieren (Reihe D). Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde mit dem jeweils anderen Albumin in Reihe E getestet. Die Inkubation in Reihe F sollte zeigen, wie stark die unspezifischen Bindungen der Goldclusteroberfläche sind, wenn sie nicht durch Fischgelatine und Tween 20 blockiert ist.

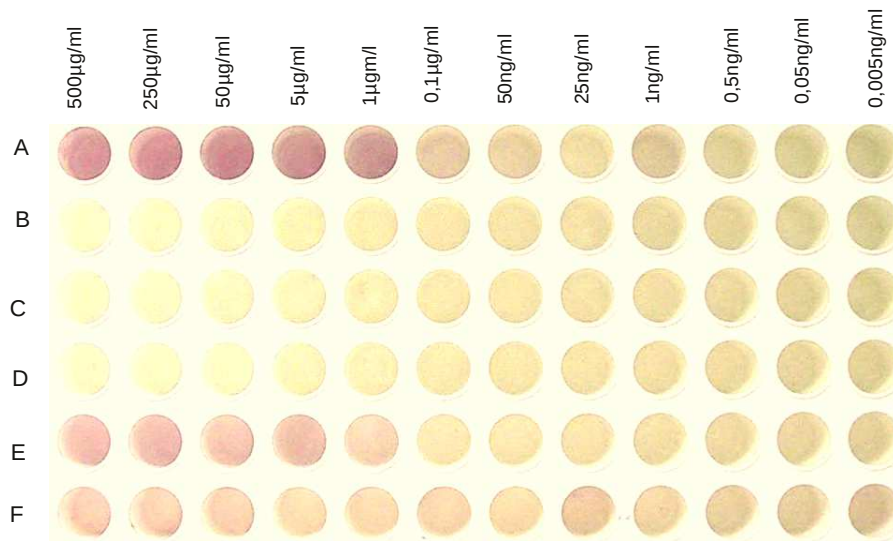
Die Auswirkungen auf die Empfindlichkeit des CLISAs, ob die verwendeten Goldcluster- und Albumin-Lösungen neu oder alt sind, zeigen die Abbildungen 4-7 bis 4-14 auf den folgenden Seiten.

Das detaillierte Auftragsschema auf die Mikrotiterplatten (am Beispiel der HSA-Platte):

- A HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK
- B HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) → NEGATIVKONTROLLE
- C HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti- β -Galactosidase-AK → NEGATIVKONTROLLE
- D GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK → NEGATIVKONTROLLE
- E BSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK → NEGATIVKONTROLLE: zum Test der Spezifität der Antikörper
- F HSA + GCC → NEGATIVKONTROLLE: zum Zeigen wie wichtig das Blocken der GCCs mit 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Fotos von den CLISA-Platten mit HSA und BSA gemacht, die auf den folgenden Seiten zu sehen sind. Die Fotos können die Farbintensität der Platten im Original nicht hundertprozentig wiedergeben. Besonders bei den niedrigen Konzentrationen ist die leichte Rotfärbung der Wells nicht gut zu erkennen. Jedoch werden die Platten in diesem Kapitel miteinander verglichen und zum Vergleich und zur Dokumentation der Ergebnisse auf denen die Auswertung beruht, sind sie gut geeignet.

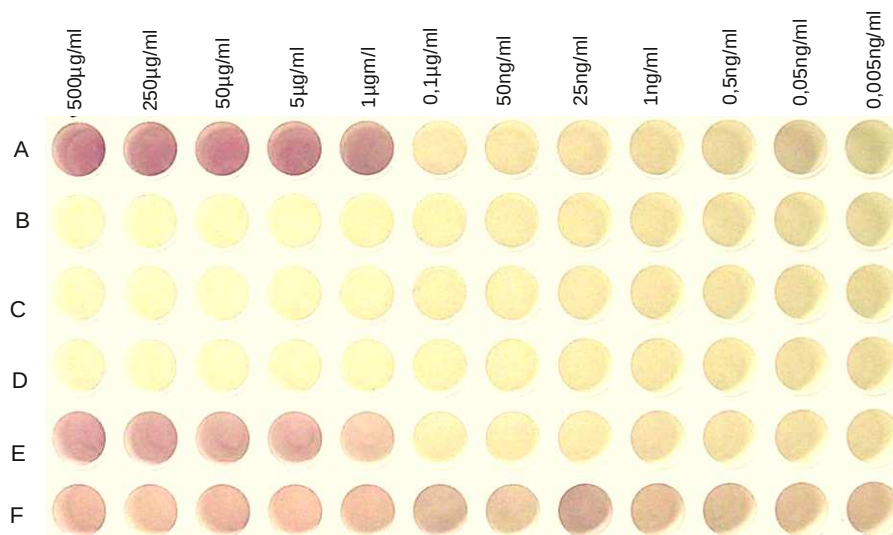
BSA neu + GCC neu



- A BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- B BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- E HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- F BSA + GCC

Abbildung 4-7: BSA neu + GCC neu

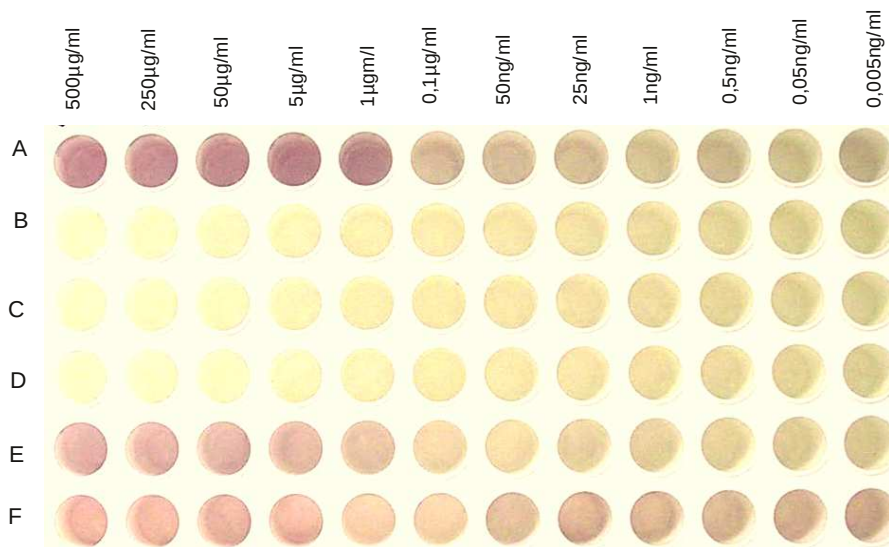
BSA alt + GCC neu



- A BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- B BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- E HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- F BSA + GCC

Abbildung 4-8:BSA alt + GCC neu

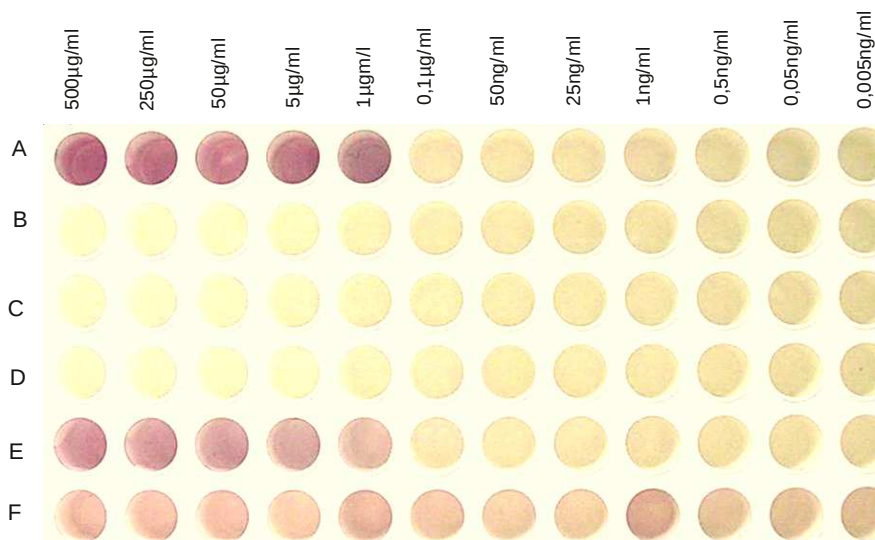
BSA neu + GCC alt



- A BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- B BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- E HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- F BSA + GCC

Abbildung 4-9: BSA neu+ GCC alt

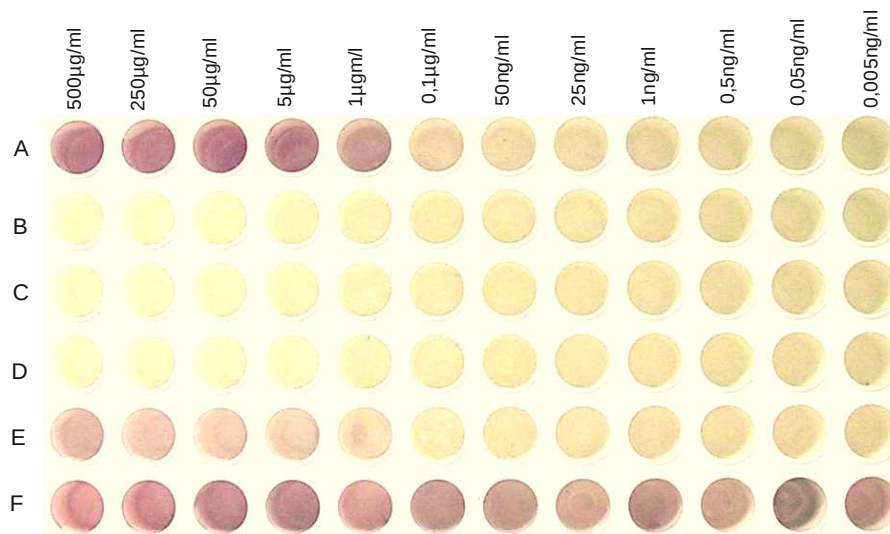
BSA alt + GCC alt



- A BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- B BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- E HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- F BSA + GCC

Abbildung 4-10: BSA alt + GCC alt

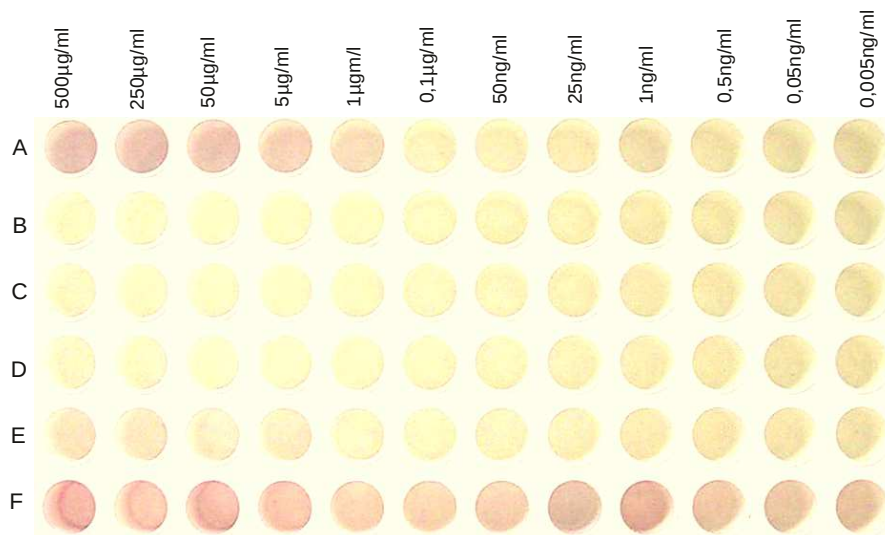
HSA neu + GCC neu



- A HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- B HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- E BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- F HSA + GCC

Abbildung 4-11: HSA neu + GCC neu

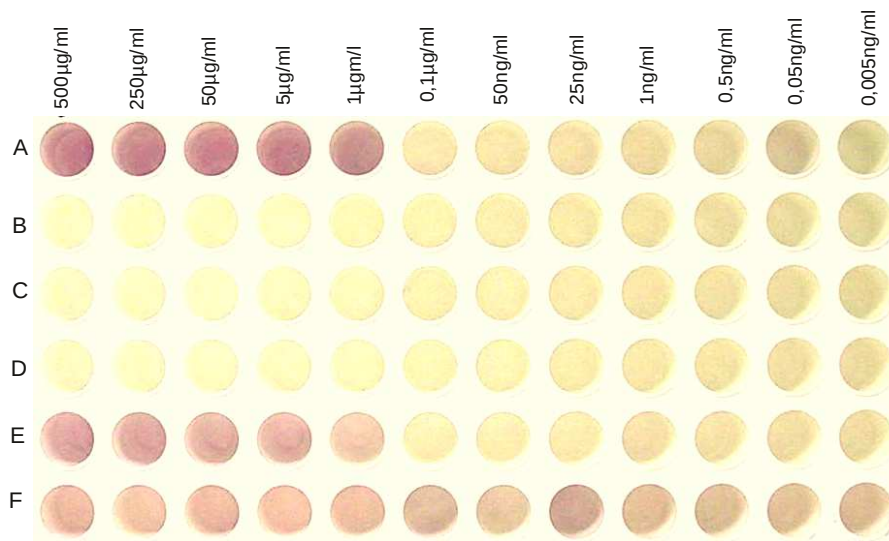
HSA alt + GCC neu



- A HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- B HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- E BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- F HSA + GCC

Abbildung 4-12: HSA alt + GCC neu

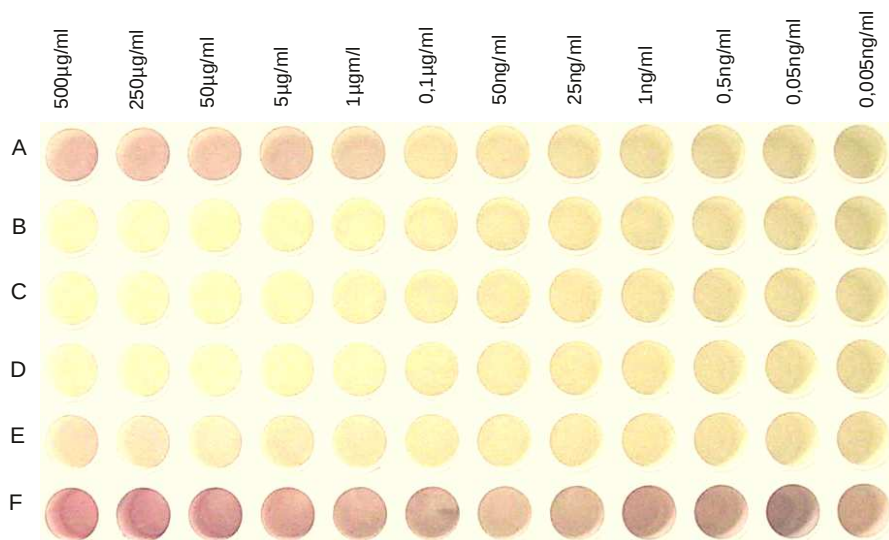
HSA neu + GCC alt



- A HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- B HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- E BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- F HSA + GCC

Abbildung 4-13: HSA neu + GCC alt

HSA alt + GCC alt



- A HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- B HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- E BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
- F HSA + GCC

Abbildung 4-14: HSA alt + GCC alt

Die Durchführung des CLISAs mit neuen und alten Lösungen (Fotos der Platten in Abbildung 4-7 bis 4-17 zu sehen) zeigten folgende Ergebnisse:

Reihe A

(Beispiel HSA-Platte: HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK)

Vergleich BSA und HSA:

Wenn man BSA neu und HSA neu miteinander vergleicht, zeigen sie sowohl bei GCC-Lösung neu oder alt dieselbe Farbtintensität. HSA zeigt immer eine stärkere Färbung als BSA. (Das war auf den Originalplatten besser zu sehen.)

Wenn man BSA alt mit HSA alt miteinander vergleicht, gibt es auch keinen Unterschied, ob man mit GCC-Lösung alt oder neu inkubiert. Jedoch zeigt diesmal BSA eine wesentlich stärkere Färbung als HSA.

Vergleich Albumin (HSA, BSA) neu und alt:

Beim Vergleich von BSA neu und alt sieht man in der Intensität keinen Unterschied. Bei HSA neu und alt ist hingegen zu erkennen, dass HSA alt deutlich schwächer gefärbt ist als HSA neu.

Aus diesen Vergleichen lässt sich die Folgerung ziehen, dass HSA wesentlich instabiler bei der Lagerung (24h bei 4°C) ist als BSA und deshalb ein Intensitätsverlust beim CLISA zu sehen ist.

Reihe B, C, D

(Negativkontrollen)

Die wells der drei Reihen blieben ungefärbt. Beim richtigen Blocken der Goldcluster gibt es sowohl auf der Albumin beschichteten Platte als auch auf der unbeschichteten Platte keine unspezifischen Bindungen.

Reihe E

NEGATIVKONTROLLE: zum Test der Spezifität der Antikörper

HSA-Platte: BSA + GCC + 1% Fischgelatine (+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK

BSA-Platte: HSA + GCC+ 1% Fischgelatine (+0,1% Tween 20) + pc-anti-BSA-AK

Die Reihe E auf den HSA-Platten zeigt eine geringere Farbintensität als die Reihe E auf der BSA-Platte. Der Grund dafür ist, dass die anti-HSA-Antikörper monoklonal und die anti-BSA-Antikörper polyklonal sind.

Reihe F

(Beispiel HSA-Platte: HSA + GCC → NEGATIVKONTROLLE: zum Zeigen wie wichtig das Blocken der GCCs mit 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung)

Auf allen Platten war die Reihe F intensiv gefärbt. Wenn man Goldcluster ungeblockt verwendet, werden diese instabil und es kommt zu unspezifischen Wechselwirkungen mit dem HSA, dem BSA oder der Mikrotiterplattenoberfläche. Deshalb muss die Goldclusteroberfläche immer mit Fischgelantine und Tween 20 geblockt werden.

Schlussendlich kann man auf die Frage „Muss man eine frische Goldclusterlösung und frische Protein-Lösungen für den CLISA verwenden, um eine intensive Rotfärbung auf den Mikrotiterplatten zu erzielen?“ antworten.

Frische BSA- und HSA-Lösungen ergaben eine stärkere Farbintensität. Zwischen neuer und alter GCC-Lösung war der Unterschied sehr klein, es kann aber bei der alten Lösung zu eher unspezifischen Wechselwirkungen kommen oder sie kann instabil werden und eine dunkelviolette Färbung ergeben, was bedeutet die Goldcluster koagulieren und fallen auf der well-Oberfläche der Platte aus. Deshalb wäre eine frische Goldclusterlösung besser.

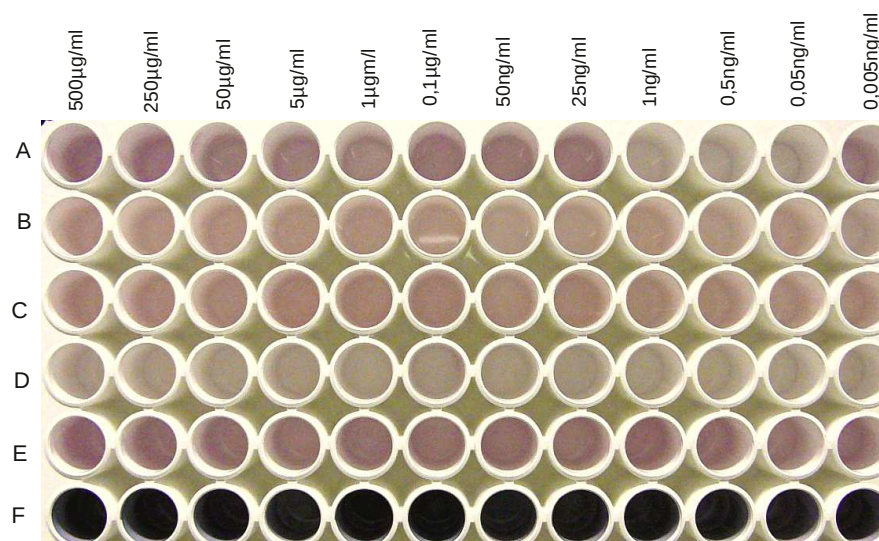
Bei einem CLISA-Test ist zu empfehlen, die Proben und die Goldclusterlösung so frisch wie möglich zu verwenden, denn ältere Proben könnten die Empfindlichkeit des Tests senken.

4.3 CLISA von Albuminen auf Nunc Maxisorp-Platten

(Durchführung siehe Kapitel 6.9)

Der Versuch mit BSA und HSA und GCC-Lösung wurde auch mit Nunc Maxisorp Platten durchgeführt (Protokoll siehe Kapitel 6.9). Es hat jedoch weniger gut funktioniert, da die Goldcluster unspezifisch gebunden wurden und dadurch auch eine starke Färbung bei den Negativkontrollen erzeugten. Als Beispiel wird der CLISA-Test mit der mit BSA-Verdünnungen präparierten Mikrotiterplatte in Abbildung 3-15 gezeigt.

BSA neu + GCC neu



- A BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- B BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
- C BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
- D GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- E HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
- F BSA + GCC

Abbildung 4-15: Nunc Maxisorp Platten mit BSA neu + GCC neu

4.4 Vergleich von CLISA und ELISA

(Durchführung siehe Kapitel 6.8, 6.10)

Es wurde die Leistungsfähigkeit des cluster-linked immunosorbent assay (CLISA) mit der Standardmethode für Proteintests, dem enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) verglichen. Zur Beschreibung der Vor- und Nachteile der Tests werden die Assays des Albumins HSA herangezogen. Die Durchführung des CLISA- und des ELISA-Tests ist in den Kapiteln 6.8 und 6.10 protokolliert. Für beide Tests wurde die HSA-Verdünnungsreihe frisch hergestellt und für den CLISA-Test wurde die frisch hergestellte Goldclusterlösung am selben Tag mit den Antikörpern gelabelt.

CLISA - Test mit HSA-Verdünnungen

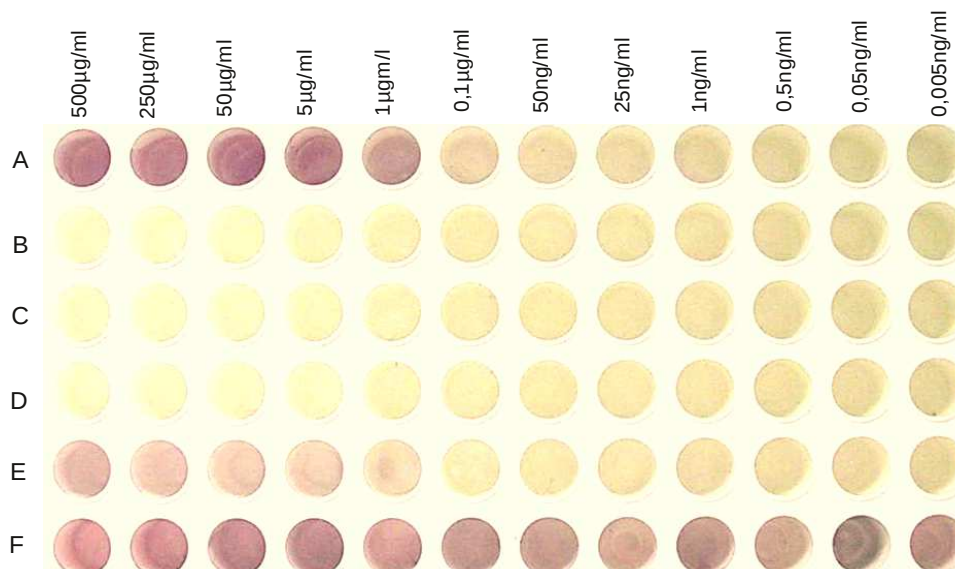


Abbildung 4-16: CLISA-Test (HSA neu + GCC neu): Detektion durch Goldcluster

ELISA - Test mit HSA-Verdünnungen

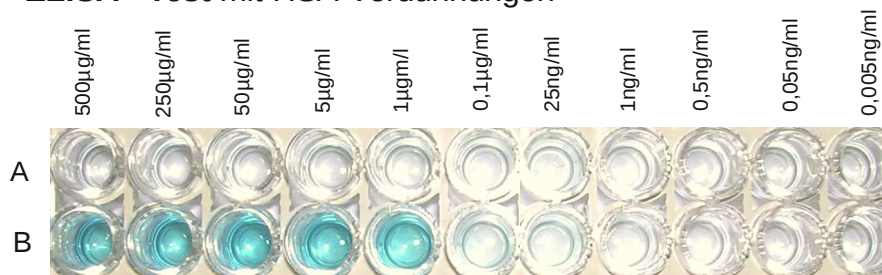


Abbildung 4-17: ELISA-Test: Detektion durch Farbreaktion von TMB

CLISA – Auftragungsschema zu Abbildung 4-16

- A HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK
- B HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) → NEGATIVKONTROLLE
- C HSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti- β -Galactosidase-AK
→NEGATIVKONTROLE
- D GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK →
NEGATIVKONTROLLE
- E BSA + GCC + 1% Fischgelatine(+0,1% Tween 20) + mc-anti-HSA-AK →
NEGATIVKONTROLLE: zum Test des Spezifität der Antikörper
- F HSA + GCC → NEGATIVKONTROLLE: Zum Zeigen wie wichtig das Blocken der
GCCs mit 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung ist.

ELISA – Auftragungsschema zu Abbildung 4-17

- A BSA + mc-anti-HSA-AK + anti-mouse IgG + TMB → NEGATIVKONTROLLE
- B HSA + mc-anti-HSA-AK +anti-mouse IgG + TMB

Die Detektion des Antigens (HSA) wurde beim CLISA in einer Dynatech Microlite™ 2 Platte und beim ELISA in einer Nunc Maxisorp-Platte (clear) durchgeführt.

Die Bestimmung der HSA-Verdünnungen mit dem CLISA war bezogen auf die Empfindlichkeit etwas besser als mit dem ELISA. Das Detektionslimit des Goldcluster-Tests lag etwas niedriger als das des ELISAs (Abbildung 4-16, Reihe A und Abbildung 4-17, Reihe B). Die leicht rötliche Färbung der wells bei niedrigen Konzentrationen war auf den Originalplatten besser zu sehen als sie auf den Fotos zu erkennen ist.

Reihe B bis F waren Negativkontrollen zum CLISA, um unspezifische Bindungen der GCCs an den mit dem Albumin beschichteten wells auszuschließen. In den wells, die nach der Inkubation nur mit den durch die 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung geblockten GCCs behandelt wurden, war keine Färbung zu beobachten (Abbildung 4-16, Reihe B). Die nächste Negativkontrolle mit den GCCs, die durch einen nicht bindenden Antikörper (mc-anti-Galactosidase Antikörper) gelabelt wurden, auf den mit HSA beschichteten wells, ergab ebenfalls kein Signal (Abbildung 4-16, Reihe C). Nach der Inkubation der mit

GCC gelabelten Antikörper in einem geblockten und gewaschenen well ohne gecoatete HSA-Probe, blieb auch diese Plattenreihe ungefärbt (Abbildung 4-16, Reihe D).

Die Reihe E auf Abbildung 4-16 zeigte bei den höheren Konzentrationen eine schwache Rotfärbung. In dieser Reihe war das well mit HSA beschichtet und es wurde wie in Reihe A mit GCCs, die mit mc-anti-HSA-Antikörper gelabelt und durch die 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung geblockt waren, inkubiert. Die Färbung kann auf eine schwache Kreuzreaktivität der Antikörper zurückgeführt werden, da BSA und HSA eine ähnliche Struktur haben. Die mit Reihe E vergleichbare Reihe A in Abbildung 4-17 am ELISA zeigte keine Färbung. Beide Reihen sowohl am ELISA als auch am CLISA waren zum Testen der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper (mc-anti-HSA-Antikörper) gedacht. Der Grund für das Ausbleiben einer Färbung in der Reihe A des ELISAs kann auch die geringere Empfindlichkeit es ELISAs sein. Es kann sein, dass wenige Antikörper an BSA gebunden waren, aber das Detektionslimit des ELISAs zu hoch war, um die Kreuzreaktivität des Antikörpers anzuzeigen. In beiden Tests wurden dieselben mc-anti-HSA-Antikörper verwendet.

Wie wichtig das Blocken der Goldclusteroberfläche mit der 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung ist zeigt Reihe F in Abbildung 4-16. Die mit HSA beschichteten wells wurden mit ungeblockten und ungelabelten GCCs inkubiert. Die starke Rotfärbung der Reihe F zeigt wie stark Goldcluster an Protein binden. Um diese spezifischen Bindungen zu verhindern, muss die Goldclusteroberfläche immer nach dem Labeln mit Antikörpern mit der 1% Fischgelatine, 0,1% Tween 20 – Lösung geblockt werden.

Die GCC-Label Methode hat folgende Vorteile:

- Die Sensitivität des CLISA ist vergleichbar mit den ELISA-Techniken, es werden nur geringe Mengen des Antigens benötigt.
- Der Test ist kostengünstiger: Man braucht keine Enzym-konjugierten sekundären Antikörper und kein Substrat und die Menge an Gold, die man zum Herstellen der Cluster braucht ist relativ gering.
- Der Test ist einfach durchführbar und kann visuell ausgewertet werden. Eine semiquantitative Abschätzung der Analyseergebnisse kann mit Hilfe von Farbskalen erfolgen.

- Für eine genaue Auswertung ermöglicht er auch den Einsatz von ELISA-Readern.
- Die Goldcluster sind farbstabil und das erleichtert die Langzeitdokumentation.
- Der Test ist nicht zeitaufwendig, für die Durchführung braucht man 4 Stunden.

[17]

4.5 Liponsäure: Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials, Reduktion der Liponsäure und Spalten der Antikörper

4.5.1 Vergleich der Crosslinker EDC, EDC + sulfo-NHS, DCC und DCC + NHS beim Binden der Liponsäure an Aminogruppen

(Durchführung siehe Kapitel 6.11.1, 6.11.2, 6.11.3)

Für einige Experimente zur Drug targeting – Methode sollten Antikörperfragmente erzeugt werden. Die sollten als spezifische Erkennungsstellen für das Binden von Nano- oder Mikropartikel fungieren. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine spezifischen Antikörper gegen Partikel, die Wirkstoffe enthalten, zur Verfügung standen, wurden als Modell andere käufliche Antikörper verwendet, die ebenfalls über Disulfidbrücken verbunden sind. Es ging darum, das Prinzip des Immobilisierens der Liponsäure, des Reduzierens zu Dihydrolipoamid und des Spaltens der Antikörper zu testen und zu verbessern.

Die Methode der Reduktion von Disulfiden mit auf einem Gel immobilisiertem Dihydrolipoamid wurden erstmals von Gorecki und Patchornick 1973 vorgestellt. [24] Dabei werden die Antikörper durch Dihydrolipoamid in zwei Fab-Fragmente gespalten.

In den durchgeführten Versuchen (Protokolle siehe Kapitel 6.11) wurde die Liponsäure mit verschiedenen Crosslinkern an die Aminogruppen eines Trägermaterials gebunden. Das verwendete Trägermaterial war organisch silanisierte glass beads (GBs). Sie besitzen im Unterschied zu Glasplättchen eine viel größere Oberfläche und stellten dadurch mehr Aminogruppen zur Verfügung. Um die effektivsten Methoden zu ermitteln, wurde das Binden der Liponsäure an das Trägermaterial mit verschiedenen Crosslinkern versucht. Die verwendeten Crosslinker waren EDC, EDC mit sulfo-NHS, DCC, und DCC mit NHS.

Die Liponsäure wurde über ihre Carboxylgruppe durch die Crosslinker an die Aminogruppe des Trägermaterials gebunden. Alle verwendeten Crosslinker sind zero-length-Crosslinker, d. h. es wird kein zusätzliches Atom in die Bindung eingebaut. Nach dem Binden wurden die zyklischen Disulfide der Liponsäure durch Natriumdithionit zu Thiol-Gruppen reduziert (Abbildung 4-18). Das entstandene Dihydrolipoamid ist fähig die

Disulfid-Brücken der Antikörper zu spalten und zwei Antikörper-Bruchstücke mit freien Sulfhydrylgruppen herzustellen (Abbildung 4-19).

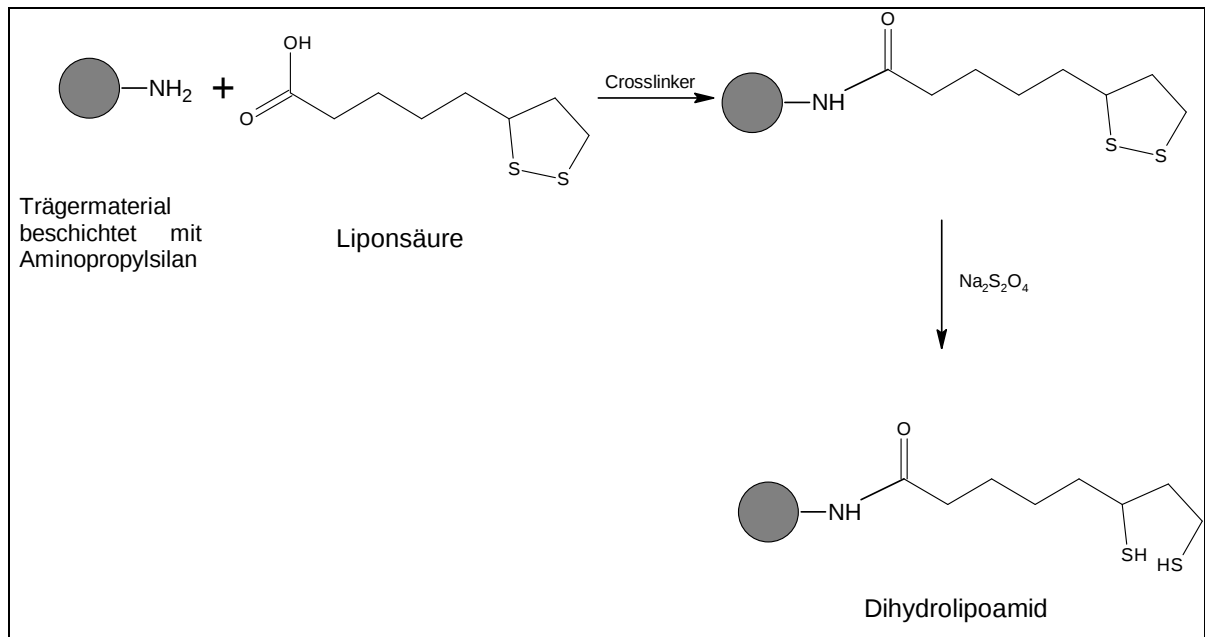


Abbildung 4-18: Binden der Liponsäure ans Trägermaterial und Reduktion zum Dihydrolipoamid

Das Dihydrolipoamid wurde durch die Reduktion der Disulfid-Brücken am Antikörper wieder zur Liponsäure oxidiert. Die immobilisierte Liponsäure kann man einfach durch das Zentrifugieren der Probelösung von den Antikörperfragmenten trennen.

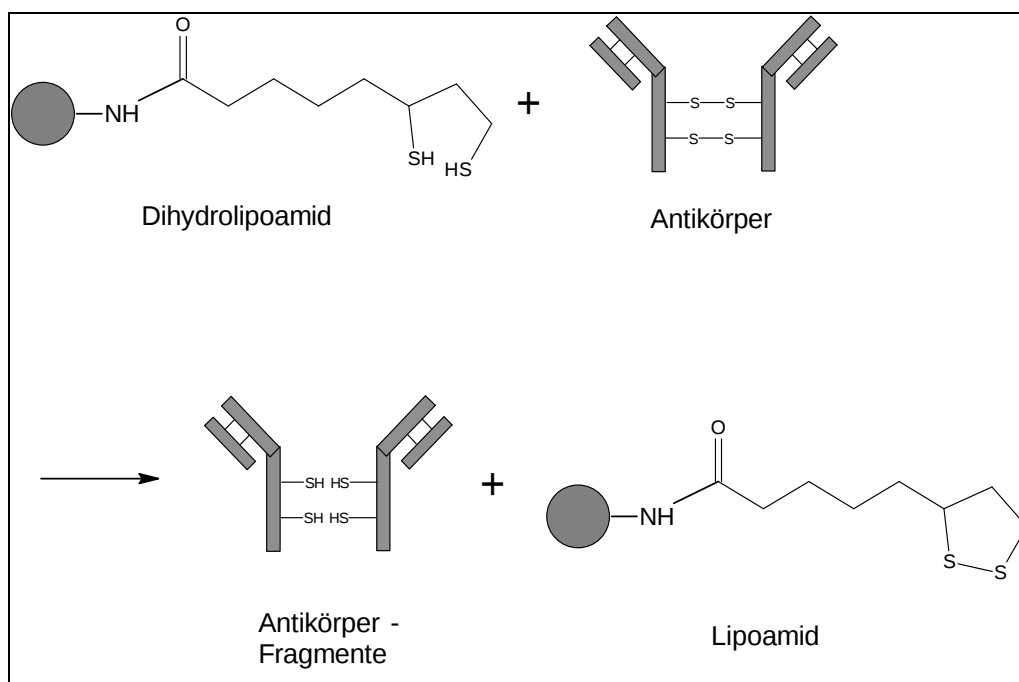


Abbildung 4-19: Spalten der Antikörper mit Liponsäure durch Aufbrechen der Disulfid-Brücken

Das Spalten und Trennen verläuft zeitsparend und ökonomisch, weil sich das Trägermaterial abzentrifugieren lässt und die darauf gebundene Liponsäure wieder verwendet werden kann. Die Disulfid-Bindung an der gebundenen Liponsäure kann dann mit Natriumdithionit reduziert werden und zu Dihydrolipoamid regeneriert werden. Es ist eine mehrfache Verwendung möglich. [4]

Die Versuche mit unterschiedlichen Crosslinkern sollten zeigen, welcher der geeignetste zum Binden der Liponsäure ist. In der Tabelle 4-2 sind die einzelnen Crosslinker angeführt, deren Wirkung durch die Stabilisierung mit sulfo-NHS oder NHS laut Literatur noch effizienter wird. [21] Die Crosslinker wurden anhand ihrer Ergebnisse beim Ellman's Test verglichen. Dieser Test zeigt proportional zur Menge an Sulfhydrylgruppen eine gelbe bis orange Färbung. Er wurde nach der Reduktion der Liponsäure zu Dihydrolipoamid und nach dem Spalten mit Antikörpern durchgeführt. Der Ellman's Test nach der Reduktion der Liponsäure zeigt wieviele Sulfhydrylgruppen am Trägermaterial vorhanden sind, um die Disulfid-Brücken der Antikörper zu spalten und indirekt auch wieviel Liponsäure gebunden wurde. Der durchgeführte Test nach dem Spalten der Antikörper gibt Aufschluss über die Menge an gespaltenen Disulfid-Brücken und somit auch wie viele Fab-Fragmente entstanden sind. Die nicht an der Reduktion beteiligten Sulfhydrylgruppen des Dihydrolipoamids am Trägermaterial, die den Test verfälschen können wurden schon vor dem Test durch Zentrifugieren aus der Probelösung entfernt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Crosslinker Ansätze von A-E ist in Kapitel 6.11 aufgelistet. Der Unterschied zwischen Ansatz A und C stellt das verwendete Lösungsmittel dar. In Ansatz A wurde als Lösungsmittel Ethanol verwendet und in Ansatz B wurde mit einer Mischung aus Ethanol und 0,1M Phosphatpuffer pH 7,1 gelöst. Da Liponsäure sehr schlecht in Wasser löslich ist und einige Crosslinker gut und andere wiederum nicht wasserlöslich sind, mussten Vorversuche gemacht werden. In einigen Vorversuchen wurde getestet, welche die beste Lösungsmittelmischung für den jeweiligen Crosslinker und die Liponsäure ist.

Vergleicht man die Ellman's Tests der Crosslinker nach der Reduktion mit Natriumthionit in Tabelle 4-2 miteinander so sind Ansatz A mit EDC, Ansatz B mit EDC + sulfo-NHS und Ansatz E mit DCC + NHS am intensivsten gefärbt und am effektivsten beim Binden der

Liponsäure. Die Ergebnisse nach dem Spalten der Antikörper zeigen, dass der Ansatz A mit EDC die stärkste Färbung hat. Die Lösungen, die mit Ansatz B mit EDC + sulfo-NHS und Ansatz E mit DCC + NHS behandelt wurden, waren auch noch gut gefärbt.

	Crosslinker	glass beads + Ellman's Reagenz	Lösung mit gespaltenen AK + Ellman's Reagenz
A	EDC	intensiv gefärbt	stark gefärbt
B	EDC + sulfo-NHS	intensiv gefärbt	gefärbt
C	EDC	schwach gefärbt	schwach gefärbt
D	DCC	schwach gefärbt	schwach gefärbt
E	DCC + NHS	Intensiv gefärbt	gefärbt

Tabelle 4-2: Vergleich der Crosslinker für das Binden von Liponsäure an ein Trägermaterial

Die Immobilisierungsversuche haben ergeben, dass der Ansatz A mit EDC die beste Crosslinking-Methode für Liponsäure unter den fünf Methoden ist. Schon nach den Ergebnissen des ersten Ellman's Test, nach der Reduktion hätte man sich wahrscheinlich für den Ansatz A entschieden, weil dieser den geringsten Einsatz an Reagenzien benötigt und der ungefährlichste ist. Die Methode mit DCC wäre wegen dessen Gesundheitsschädlichkeit bei der Herstellung bei gleichen oder nur gering stärkeren Werten, zur weiteren Herstellung von gebundener Liponsäure nicht ausgewählt worden.

4.5.2 Vergleich von Trägermaterial für Liponsäure: organisch silanisierte glass beads (GBs) und organisch silanisierter Gulsenit und Testen des Bindungsvermögens der Liponsäure ans Trägermaterial

(Durchführung siehe Kapitel 6.11.4)

Als Trägermaterial mit freien Aminogruppen steht neben den organisch silanisierten GBs auch noch organisch silanisierter Gulsenit zur Verfügung. Gulsenit ist ein Gesteinsabbaunebenprodukt mit sehr vielen OH-Gruppen an der Oberfläche. Durch organisches Silanisieren können daher auf Gulsenit viele freie Aminogruppen erzeugt werden. Die Anzahl der Aminogruppen ist wesentlich höher als auf organisch

silanisierten GBs, weil Gulsenit ein sehr poröses Material ist, das mehr Oberfläche pro Gramm bietet als die nicht porösen GBs. Um so viel Liponsäure wie möglich auf dem Trägermaterial zu binden, wurde die Bindungskapazität von GBs und Gulsenit miteinander verglichen. Der Vorteil einer größeren Menge an Liponsäure am Trägermaterial ist, dass man weniger an Liponsäure-gebundenem Material zur Spaltung der Antikörper einsetzen muss und man daher weniger Material aus der Lösung entfernen muss. Das ist besonders bei höher konzentrierten Antikörperlösungen von Vorteil. Die Liponsäure, gebunden an GBs und Gulsenit, wurde, wie im Protokoll 6.11.4 angegeben, mit dem effektivsten Crosslinker EDC (wie Ansatz A) hergestellt. An Gulsenit wurde die einfache, zweifache und vierfache Menge an Liponsäure gebunden, um die maximale Ladekapazität zu bestimmen. An die GBs wurde nur die einfache Menge gebunden, da man von einer begrenzten Kapazität der GBs ausgehen musste. Die Menge an eingesetzten GBs und Gulsenit war jeweils gleich groß.

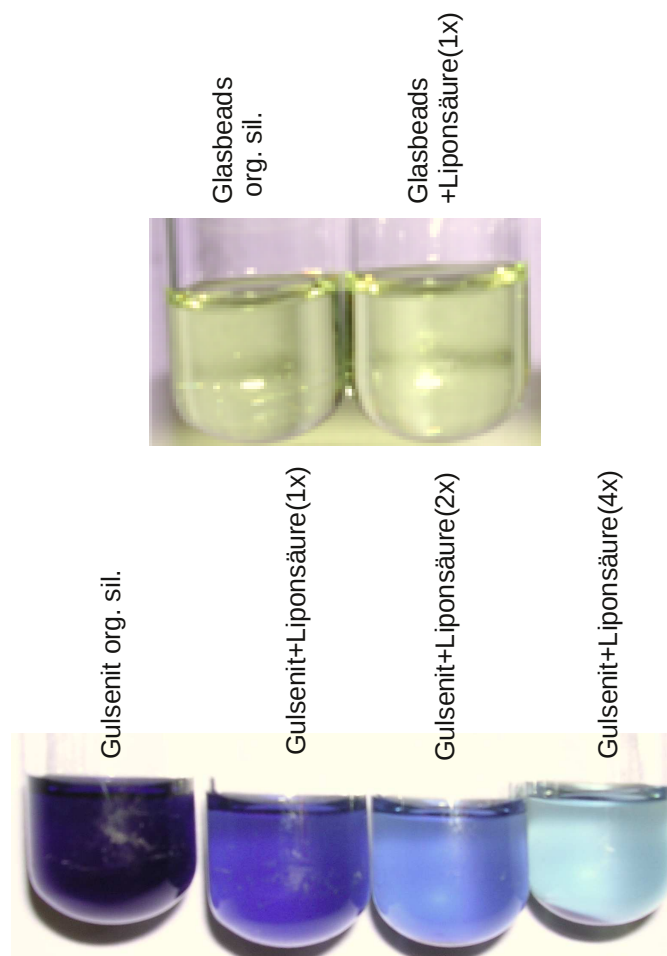


Abbildung 4-20: Kaisertests der GBs und des Gulsenits ohne und mit Liponsäure

Zur Kontrolle der Menge an gebundener Liponsäure wurde nach dem Crosslinken ein Kaisertest gemacht. Der Test zeigt durch seine Färbung an wie viele Aminogruppen an den GBs und am Gulsenit noch frei sind. Je weniger Liponsäure gebunden ist, desto stärker gefärbt ist die Lösung des Kaisertests.

In Abbildung 4-20 sind die Kaisertests der GBs und des Gulsenits ohne und mit Liponsäure zu sehen. In der ersten Reihe sind die Tests der organisch silanisierten GBs ohne und mit Liponsäure abgebildet. Die Kaisertestlösung zeigte, als sie zu den GBs hinzugefügt wurde, keine Verfärbung. Zur Förderung der Farbreaktion wurde die Lösung mit den Glasbeads erhitzt, jedoch erfolgte keine Änderung. Die Konzentration der Aminogruppen an den GBs ist so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze des Kaisertests liegt.

In der zweiten Reihe sind die Kaisertests des organisch silanierten Gulsenits ohne und mit verschiedenen Konzentrationen an Liponsäure zu sehen. Beim Hinzupipettieren der Kaiserlösung zu den Gulsenit-Proben kam es sofort zu starken Verfärbungen der Lösung ins Blaue. Die Konzentration der gebundenen Liponsäure steigert sich von der linken Epruvette bis zur rechten Epruvette. Der Farbverlauf von dunkel zu hell zeigt deutlich, dass die Menge an freien Aminogruppen mit der Menge an zugegebener Liponsäure proportional abnimmt. Die erste Lösung von links ohne Liponsäure ist sehr stark gefärbt und ist ein Signal für eine große Menge an freien Amino-Gruppen. Die vierte Lösung von links ist nur noch hellblau gefärbt und das bedeutet, dass an eine große Zahl der freien Aminogruppen Liponsäure gebunden wurde, aber es stehen noch freie Amino-Gruppen für das Binden von Liponsäure zur Verfügung. Mit der zugegebenen Menge an Liponsäure wurde die vollständige Bindungskapazität des Gulsenits noch nicht ausgenutzt.

Bei einem weiteren Test wurde die Menge an Sulfhydrylgruppen nach der Reduktion der an Gulsenit gebundenen Liponsäure und nach dem Spalten von Antikörpern damit überprüft. Es wurde ein Ellman's Test an organisch silanisiertem Gulsenit ohne und mit einfach und zweifach konzentrierter Liponsäure gemacht. An der stark orangen Farbe der unteren Reihe in Abbildung 4-21 mit dem Gulsenit mit gebundener Liponsäure sieht man, dass zum Spalten der Antikörper eine große Anzahl an Sulfhydrylgruppen

vorhanden ist. Es gibt keinen Unterschied zwischen der einfach und zweifach konzentrierten Liponsäure, weil der Ellman's Test bei diesen Mengen an seine Grenzen kommt. Die obere Reihe in Abbildung 4-21 ist gelblich gefärbt und gibt Aussage über die mit Liponsäure gespaltenen Antikörper. Die Konzentration der vorgelegten anti-BSA-Antikörper betrug 1µl/ml. Es gibt keinen deutlich erkennbaren Unterschied zwischen einfach und zweifach konzentrierter Liponsäure. Da die Lösungen in der ersten Reihe schwächer gefärbt sind als die der zweiten Reihe kann man davon ausgehen, dass genügend Sulfhydrylgruppen zur Reduktion der Disulfid-Brücken zur Verfügung standen und alle Antikörper gespalten werden konnten.

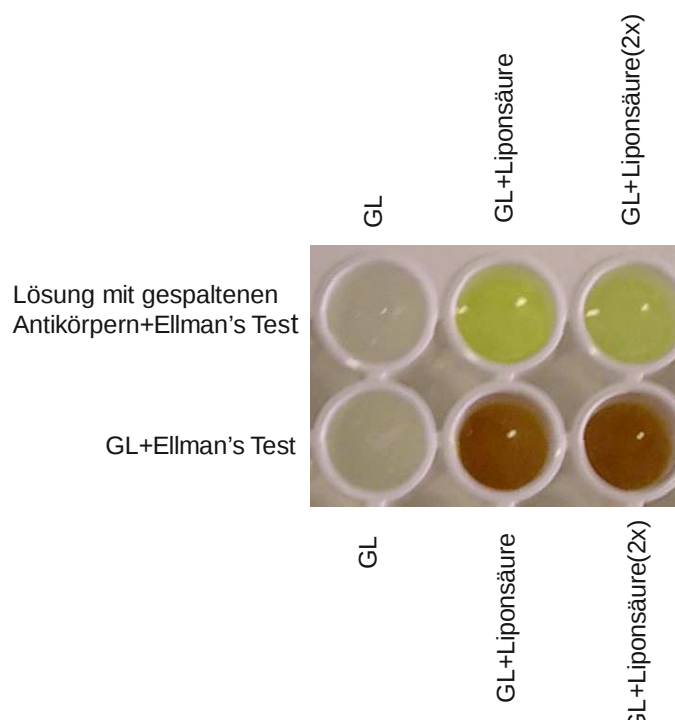


Abbildung 4-21: Vergleich der zur Spaltung zur Verfügung stehenden Sulfhydryl-Gruppen und der gespaltenen Antikörper bei einer vorgegebenen Antikörperkonzentration

Somit können beim Spalten der Antikörper für weitere Versuche sehr kleine Mengen an Gulsenit gewählt werden, da genügend reduktionsfähige Gruppen auf der Gulsenitoberfläche vorhanden sind. Bei höher konzentrierten Antikörper-Lösungen kann mit zweifach- oder vierfach-konzentrierter Liponsäure belegter Gulsenit zur Spaltung verwendet werden, um die Mengen des Trägermaterials so gering wie möglich zu halten, unspezifische Adsorption der Spaltprodukte am Gulsenit zu minimieren und dessen schnellere Entfernung nach der Spaltung zu ermöglichen.

4.6 Testen von Affinitätschromatographiesäulenmaterial: Kurzketziges oder langketziges PLGA

(Durchführung siehe Kapitel 6.12.1, 6.12.2)

Die Affinitätschromatographie wird genutzt, um Substanzen, die eine höhere Affinität zum verwendeten Säulenmaterial haben, von der restlichen Lösung zu trennen. Zum Zuge dieser Arbeit sollte überprüft werden, welches das besser geeignete PLGA (Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid) (entweder kurz- oder langketzig) ist, das gebunden an Gulsenit zur Trennung der PLGA-Antikörper aus der Lösung dienen sollte.

Zur Herstellung von PLGA-Antikörpern wurden Kaninchen mit PLGA immunisiert. Diese Antikörper benötigt man zum Binden von PLGA-Nanopartikeln an die biokompatibel beschichtete Implantatoberfläche, die das im Projekt vorgeschlagene Drug-targeting ermöglichen soll. Das Kaninchen wurde vor der Immunisierung (Präserum) und nach der Immunisierung und erhoffter Antikörperbildung Blut abgenommen (Serum). Sowohl Präserum als auch Serum sollten gereinigt werden. Das Präserum wurde als Negativkontrolle verwendet, um auszuschließen, dass Substanzen, die vor der Immunisierung im Blut des Kaninchens enthalten waren, bei den weiteren Versuchen positiver Ergebnisse liefern und die Resultate verfälschen. Aus dem Serum sollten durch die Reinigung die durch die Immunisierung gebildeten PLGA-Antikörper gewonnen werden und die restlichen im Blut enthaltenen Antikörper und Proteine abgetrennt werden.

Das Blut wurde nach der Entnahme vom Kaninchen abzentrifugiert und die Immunoglobuline G (IgGs) wurden durch eine Protein A – Säule oder Dynabeads vom restlichen Serum getrennt. Anschließend sollten die PLGA-Antikörper von den erhaltenen IgGs durch Affinitätschromatographie separiert werden. Als Säulenmaterial wurde Gulsenit mit gebunden PLGA verwendet.

Sowohl kurzketziges als auch langketziges PLGA wurde mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in Anwesenheit von NHS an das Gulsenit gekoppelt. Dabei wurde die Carboxylgruppe des PLGA mit der Aminogruppe des Gulsenit durch den Crosslinker verbunden und es entstand eine Amid-Bindung (Protokoll siehe Kapitel 6.12.1). Nach der Immobilisierung des kurzketzigen bzw. langketzigen PLGA am Gulsenit wurde von den

beiden Produkten und vom Gulsenit ohne PLGA ein Kaisertest durchgeführt. Durch den Kaisertest wurde die Effizienz der Immobilisierung bestimmt. Abbildung 4-22 zeigt die farblichen Unterschiede zwischen den gebundenen kurzkettigen und langkettigen PLGA.

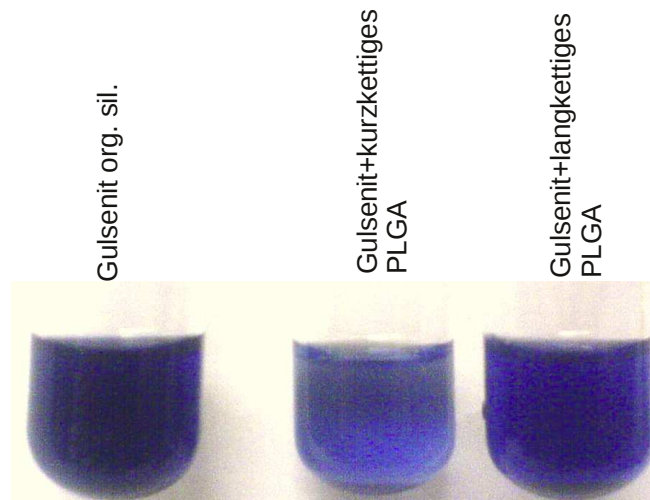


Abbildung 4-22: Der Kaisertest von organisch silanisierter Gulsenit ohne und mit kurzkettigen bzw. langkettigen PLGA. Umso heller die Blaufärbung, desto mehr Aminogruppen wurden mit PLGA gekoppelt.

Die Ursprungsfarbe der Kaisertest-Lösung ist gelb. Je mehr Aminogruppen vorhanden sind, desto stärker ist die Lösung gefärbt, von gelb bis rosa nach blau.

Organisch silanierter Gulsenit hat die meisten freien Aminogruppen und ist deshalb am stärksten gefärbt. Nach der Reaktion mit kurzkettigem PLGA zeigt sich eine hellere Färbung als nach der Reaktion mit langkettigen PLGA.

Ein Grund für die schwächere Färbung kann sein, dass bei der gleichen Menge an PLGA, beim kurzkettigen mehr Carboxylgruppen zur Verfügung stehen, mit denen das PLGA an die Aminogruppen des organisch silanisierten Gulsenits bindet und die Anzahl der freien Aminogruppen stärker verringert.

Eine weitere Erklärung für die Farbunterschiede kann sein, dass das langkettige PLGA einige Aminogruppen des organisch silanisierten Gulsenits abgedeckt hat und dadurch aus sterischen Gründen nicht alle Aminogruppen zur Bindung zu Verfügung standen.

Letzendlich zeigte die schwächere Blaufärbung der Lösung über dem organisch silanisierten Gulsenit mit kurzkettigem PLGA, dass dadurch eine effizientere

Immobilisierung mit kurzkettigem PLGA erzielt wurde und dass es das zu präferierende Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie ist.

Nach einmaliger Durchführung einer Affinitätschromatographie zur Reinigung des Präserums des Kaninchens 95 wurde ein weiterer Kaisertest des Säulenmaterials durchgeführt. Es sollte der Verbrauch des Säulenmaterials dokumentiert und die Auswirkung der starken pH-Änderungen während der Chromatographie gezeigt werden.

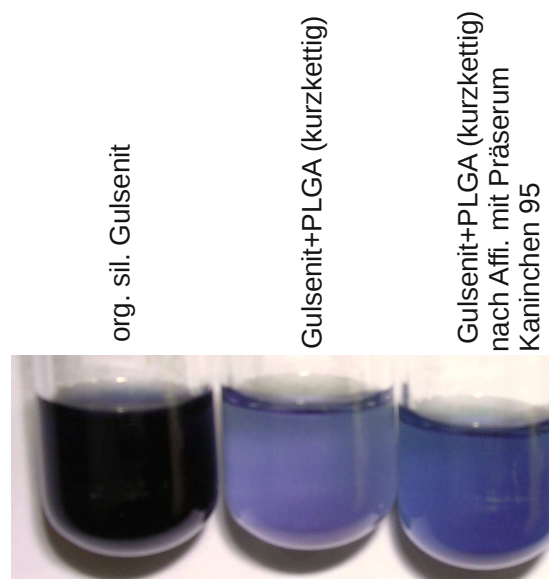


Abbildung 4-23: Der Kaisertest von org. sil. Gulsenit und org. sil. Gulsenit mit gebunden kurzkettigen PLGA vor und nach einer Affinitätschromatographie.

In Abbildung 4-23 ist eine stärkere Blaufärbung der Lösung über dem Säulenmaterial nach der Affinitätschromatographie im Vergleich zum ungenutzten Säulenmaterial zu sehen. Durch die Änderung des pH-Wertes während der Chromatographie wurde die Amidbindung einiger PLGA-Moleküle am Gulsenit gelöst und dadurch wieder mehr Aminogruppen frei. Diese konnten mit der Kaisertest-Lösung reagierten und eine stärkere Blaufärbung verursachen.

Es kommt daher zum Verbrauch des Säulenmaterials und vergleicht man es mit der intensiven Färbung des organisch silanisierten Gulsenits ohne gebundenes PLGA und der schwachen Färbung des organisch silanisierten Gulsenits mit gebundenen PLGA vor der

Chromatographie, kann das Trägermaterial für mehrere Trennungen genutzt werden bevor eine weitere Immobilisierung des PLGAs am Gulsenit vorgenommen werden muss.

5 Zusammenfassung und Zukunftsausblicke

Die in der Masterarbeit behandelten Themen sollten einen Beitrag zu einem Projekt, das sich mit der Entwicklung von neuartigen Implantatoberflächen befasst, leisten.

In einem Teil der Arbeit wurden Aminogruppen-Nachweise auf ihre Nutzbarkeit im Bezug auf die Problemstellung des quantitativen Nachweises von geringen Mengen an Aminogruppen pro Flächeneinheit überprüft. Es wurden Tests mit TNBS und OPA, enzymatische Assays mit alkalischer Phosphatase und Kaisertests mit Ninhydrin durchgeführt. Eine quantitative Bestimmung der Menge der Aminogruppen auf den Trägermaterialien konnte mit den getesteten Methoden jedoch nicht erreicht werden. Die Tests zeigten qualitativ die Anwesenheit von Aminogruppen an, aber eine genaue quantitative Analyse war mit der gewählten Durchführung der Tests nicht möglich.

Der CLISA-Test und dessen Vergleich mit dem ELISA-Test war ein weiteres Gebiet der Arbeit. Der CLISA-Test sollte im Rahmen des Projektes als Analysemethode genutzt werden. Bei den Versuchen rund um den CLISA-Test zeigt sich, dass die stärksten Signale bei frischen Proteinlösungen und neu hergestellten Goldclusterlösungen zu sehen sind. Wobei die Frische der Proteinlösungen mehr Einfluss auf die Signalstärke hatte. Eine ältere Goldclusterlösung ist nicht mehr so stabil und könnte deshalb ausflocken und zu mehr unspezifischen Signalen führen. Der CLISA kann auch als Allergietest genutzt werden.

Ein weiteres Thema der Arbeit ist die Spaltung von Antikörpern, zur Bindung der Antikörperfragmente an die biokompatibel beschichtete Oberfläche des Implantatmaterials. Zu diesem Zweck sollte Liponsäure immobilisiert werden, und die durch Reduktion mit Dithionit erzeugte Dihydroliponsäure ihrerseits als Reduktionsmittel zur Spaltung der Disulfidbrücken des Antikörpers verwendet werden. Es wurden zur Immobilisierung verschiedene Crosslinker getestet und EDC zeigte sich als die beste Wahl für die Immobilisierung der Liponsäure an Trägermaterial. Dadurch konnte die Trennung der Liponsäure von der Antikörperlösung nach der Spaltung wesentlich vereinfacht werden.

Die Reinigung des Serums, des mit PLGA immunisierten Kaninchens, war ein weiteres Gebiet des Projekts. Für den Reinigungsschritt mit der Affinitätschromatographie sollte

das geeignete PLGA ermittelt werden. Am besten geeignet für die Chromatographie als Säulenmaterial ist auf Gulsenit immobilisiertes kurzkettiges PLGA. Die Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit des Säulenmaterials zeigten, dass es mehrmals verwendet werden kann bis wieder PLGA neu immobilisiert werden muss.

Ein Thema der Arbeit, das noch weiterer Forschungstätigkeit bedarf, ist die Aminogruppen-Bestimmung. Dabei könnte man noch andere Nachweismethoden anwenden oder von den vier überprüften Tests die Durchführung variieren.

6 Protokolle

6.1 Amino-Silanisierung von Glasplättchen, controlled-pore glass beads und Gulsenit

Die Trägermaterialien (Glasplättchen, controlled-pore glass beads (GBs), Gulsenit) wurden sowohl bei der organischen als auch bei der wässrigen Silanisierung von Fett und Schmutz befreit, indem man sie mit Isopropanol und ddH₂O einige Male gewaschen hat. Das Glasgefäß für die Silanisierung wurde mit Isopropanol gewaschen und vorsilanisiert, d. h. bei der organischen Silanisierung mit 5% (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) – Lösung oder bei der wässrigen Silanisierung mit 10% (v/v) APTS-Lösung befüllt und 1h bei RT auf den Schüttler gestellt.

6.1.1 Organische Amino-Silanisierung

In das vorsilanisierte Glasgefäß wurden die Trägermaterialien gegeben und mit 25ml einer 5% (v/v) APTS-Lösung (1,3ml APTS mit 95% (v/v) EtOH auf 25ml verdünnt) bedeckt und 1h bei RT geschüttelt. Danach wurde die APTS-Lösung dekantiert oder abgenutscht und das Trägermaterial 2x mit 95% EtOH gewaschen. Das Glasgefäß mit dem Trägermaterial wurde mit Alufolie abgedeckt, Löcher hineingestochen und über Nacht bei 110°C in den Trockenschrank gestellt.

6.1.2 Wässrige Amino-Silanisierung

In das vorsilanisierte Glasgefäß wurden die Trägermaterialien gegeben und mit 25ml einer 10% (v/v) APTS-Lösung (2,5ml APTS mit ddH₂O auf 25ml verdünnt und auf pH3,5 eingestellt) bedeckt und 2h bei 75°C geschüttelt. Danach wurde die APTS-Lösung dekantiert oder abgenutscht und das Trägermaterial 2x mit ddH₂O gewaschen. Das Glasgefäß mit dem Trägermaterial wurde mit Alufolie abgedeckt, Löcher hineingestochen und über Nacht bei 110°C in den Trockenschrank gestellt.

6.2 Aminogruppen-Nachweis mit TNBS

Eine 0,01% (w/v) TNBS-Stammlösung wurde durch Verdünnen einer 5% (w/v) TNBS-Lösung (Sigma) mit einem 0,1M Natriumbicarbonat-Puffer (pH 8,5) frisch hergestellt. Die Stammlösung wurde weiter verdünnt (1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100), um zu ermitteln, welche für den Nachweis am geeignetsten ist (siehe Tabelle 7-1 in Kapitel 7.1). 3ml von jeder Verdünnung wurden mit 20µl Ethanolamin (Aminogruppenquelle) versetzt und in Glasflaschen mit Schraubverschluss 2h bei 37°C geschüttelt. 2ml der Lösung wurden entnommen und mit 0,75ml SDS und 0,38ml 1NHCl versetzt. Anschließend wurden die Verdünnungen am Photometer gemessen.

Als Probe wurde controlled-pore glass beads verwendet. Dabei wurden unbehandelte (nur mit Aceton gewaschen), organisch silanisierte und wässrig silanisierte GBs getestet. Jeweils 0,8g GBs wurden in eine Glasflasche eingewogen und 5ml einer TNBS-Verdünnung zugegeben. Es wurde 1h bei 37°C geschüttelt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und ein Teil photometrisch gemessen. Zu 3ml des restlichen Überstands wurden 20µl Ethanolamin hinzugefügt und 1h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 2ml daraus entnommen, mit 0,75ml SDS und 0,38ml 1NHCl versetzt und am Photometer gemessen.

6.3 Aminogruppen-Nachweis mit OPA

Herstellen der OPA/MEO – Lösung: 0,23g o- Phthaldialdehyd (OPA) wurden in 22,5ml Methanol gelöst. Zur OPA-Lösung wurden 22,5ml 0,6M Natrium-Borat-Puffer (pH10,4) und 30µl 2-Mercaptoethanol (MEO) hinzugefügt (im Abzug), damit das stöchiometrische OPA/MEO-Verhältnis = 1:1 betrug.

Es wurden je 2g unbehandelte und organisch silanisierte controlled-pore GBs in verschraubbare, mit Alufolie umwickelte Glasfläschchen eingewogen und je 7ml OPA/MEO-Lösung hinzugefügt. Zum Vergleich wurde in ein Fläschchen nur die OPA/MEO-Lösung gegeben. Anschließend wurde die Lösung mit den GBs für 30min bei RT in einem dunklen Raum gerührt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und zentrifugiert. Ein Teil der erhaltenen Lösung wurde am Fluorimeter mit 360nm angeregt und die Emission bei 455nm gemessen. Vom anderen Teil wurden je 2ml mit 200µl

Ethanolamin versetzt und weitere 30min bei RT im Dunklen gerührt. Nach 30min wurde auch diese Lösung mit dem Fluorimeter auf dieselbe Art wie zuvor vermessen.

6.4 Zeitabhängigkeit von OPA

Zu je 20ml der OPA/MEO-Lösung (Herstellung siehe Kapitel 6.3) wurden sofort, 20min und 40min nach Herstellung der OPA/MEO-Lösung 450µl Ethanolamin hinzugefügt und in einem mit Alufolie umwickelten Gefäß bei RT gerührt. Ab der Zugabe von Ethanolamin wurde nach Zeitabständen von einigen Minuten jeweils Lösung entnommen und gemessen. Zur Messung am Fluorimeter wurde mit 369nm angeregt und die Emission bei 455nm aufgenommen.

6.5 Aminogruppen-Nachweis: Enzym Assay – Alkalische Phosphatase

0,05M Phosphatpuffer (pH 7) wurde hergestellt. 6 unbehandelte Glasplättchen wurden in wasser gegeben, 1x mit 2ml Isopropanol und 1x mit ddH₂O gewaschen (je 5min am Schüttler). Wenn in den folgenden Versuchsschritten „gewaschen“ aufgeführt wird, heißt das, dass die Glasplättchen mit der genannten Flüssigkeit übergossen und je 5min auf den Schüttler gestellt wurden.

3 unbehandelte Glasplättchen wurden 2x mit 1ml Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit 1ml 2,5% Glutaraldehyd-Lösung versetzt (Reaktionszeit:1h am Schüttler). Der Glutaraldehyd, der sich nicht an die Aminogruppen des Glassträgers gebunden hat, wurde abpipettiert und die Glasplättchen wurden 6x mit 2ml Eiswasser gewaschen.

Herstellen der alkalische Phosphatase-Lösung: 3µl calf intestinal alkalische Phosphatase (AP) wurden mit 600µl Phosphatpuffer verdünnt.

Die 3 zuvor mit Glutaraldehyd versetzten, die 3 gewaschenen, unbehandelten und die 3 organisch silanisierten Glasplättchen wurden auf einen Objektträger gelegt und je 100µl alkalische Phosphatase-Lösung auf die Plättchen pipettiert. Die Plättchen wurden in eine feuchte Kammer gestellt und die AP-Lösung blieb über Nacht bei RT auf den Glassträgern.

Am nächsten Tag wurde die AP-Lösung abpipettiert und die Glasplättchen in wells transferiert. Dann wurden sie 4x mit Phosphatpuffer gewaschen, in andere wells transferiert und 4x mit 100mM Tris-puffer (pH9,5) (beinhaltete 100mMNaCl und 100mMgCl₂) gewaschen. Danach wurden die Glasplättchen wieder in andere wells gegeben und zu jedem Plättchen 3ml Tris-Puffer und 10µl p-Nitrophenyl Phosphat-Lösung (p-NPP)(50mg/ml) hinzugegeben und die Lösung vermischt. Die Reaktionszeit betrug 1,5h.

Anschließend wurden 3ml der p-NPP-Lösung abpipettiert und mit dem Photometer bei 405nm vermessen.

6.6 Aminogruppen- Nachweis mit Kaisertest – Ninhydrin

Dieser Test wird als Test für freie Aminogruppen verwendet:

- Lösung A – Ninhydrin (5% w/v) in EtOH: 250mg Ninhydrin + 5ml EtOH
- Lösung B-Phenol (4:1 w/v) in EtOH : 4g Phenol (giftig!) + 1ml EtOH
- Lösung C – Kaliumcyanid, KCN (2% v/v von einer 1 mM/l wässriger Lösung) in Pyridin: 6,5mg KCN in 10ml ddH₂O lösen und davon 200µl auf 10ml mit Pyridin auffüllen

Es wurde je 1 Spartelspitze der Probe in eine Glaseprouvette gegeben und zu jeder Probe folgendes pipettiert:

0,5ml Lösung A + 0,5ml Lösung B + 0,5ml Lösung C

Die Lösung der drei Komponenten ohne Probe ist leicht gelblich gefärbt. Bei Anwesenheit von Aminogruppen färbt sich die Lösung rosa bis dunkelblau. Das ist abhängig von der Menge der Aminogruppen.

Zur Verbesserung der Reaktion kann man die Epruvette auch in ein kochendes Wasserbad (100°C) eintauchen. Das führt zur Beschleunigung der Reaktion.

6.7 Goldcluster (GCC – gold colloid cluster) - Synthese (17nm) nach Frens

10mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ wurden schnell (sonst färbt sich die Substanz schwarz) auf einer Alufolie eingewogen und in einen zuvor mit dd H_2O gewaschenen und mit Alufolie umwickelten Erlenmeyerkolben gegeben. (!Erlenmeyerkolben und Spatel müssen gründlich gewaschen sein!) Ein kleiner Teil von 100ml dd H_2O war schon zuvor beim Einwiegen im Erlenmeyerkolben, damit $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nicht so lange an der Luft ist. Der restliche Teil des dd H_2O wurde zugegeben. Die Lösung wurde unter Rühren zum Kochen gebracht. Ab dem Zeitpunkt des Kochens wurden rasch 4ml 1%(w/v)ige Trinatrium-citrat-Lösung hinzugegeben. Die Lösung verfärbte sich von leicht gelblich ins dunkelviolette und weiter ins rötliche (nach ca. 4min). Die rote Farbe zeigt die Bildung der monodispersen, sphärischen Goldcluster an. Die Lösung wurde weitere 10min gekocht, um die Reduktion vollständig abzuschließen, und 1h bei RT auskühlen gelassen.

6.8 CLISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Goldcluster-Lösung auf Dynatech Microlite™ 2 Platten (Mikrotiterplatten)

Lösungen

- Trinatrium – Citrat – Lösung 1%(w/v)
0,5g Sodium citrate tribasic dehydrate + 50ml dd. H_2O
anschließend filtrieren
- Tris/HCL – Puffer (50mM)
7,88g Tris + 8,78g NaCl in 1000ml dd. H_2O lösen und mit 6N HCl auf pH7,3 bringen
- 1% (w/v) Fischgelatine + 0,1%(v/v) Tween
0,5g Fischgelatine + 50µl Tween 20 + 50ml dd. H_2O
- Blocklösung (0,1%(v/v) Tween - Lösung)
1g Fischgelatine + 50ml Tris/HCL – Puffer + 50µl Tween 20
- Waschlösung (0,5%(v/v) Tween - Lösung)

250µl Tween 20+ 50ml Tris/HCl – Puffer

Die aufgelisteten Lösungen wurden zu Beginn des Versuches hergestellt.

Als Trägermaterial für das Antigen wurden Dynatech Microlite™ 2 Platten (Mikrotiterplatten) genutzt. Diese Mikrotiterplatten hatten einen flachen Boden, waren weiß und frei von elektrostatischer Ladung.

Als Antigen wurden BSA (Bovine Serum Albumin) und HSA (Human Serum Albumin) verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen von beiden Albuminen mit 50mM Tris/HCl-Puffer hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden nach dem Pipettierschema siehe Tabelle 6-1 oder Tabelle 6-2 in einem Konzentrationsbereich von 0,005ng/ml bis 10mg/ml zusammengestellt.

Tabelle 6-1: Pipettier- und Inkubationsschema – BSA – Goldcluster auf Mikrotiterplatten und Maxisorp-Platten

Mikrotiterplatte BSA

Verdünnungsreihe

	BSA%	Konz.	
	1	10mg/ml	0,01g BSA + 1ml Tris HCl
1	0,05	500µg/ml	250µl 1% + 4750µl Tris.HCl
2	0,025	250µg/ml	500µl 0,05% + 500µl Tris.HCl
3	0,005	50µg/ml	100µl 0,05% + 900µl Tris.HCl
4	0,0005	5µg/ml	10µl 0,05% + 990µl Tris.HCl
5	0,0001	1µg/ml	20µl 0,05% + 9980µl Tris.HCl
6		0,1µg/ml	100µl 0,0001% + 900µl Tris.HCl
7		50ng/ml	50µl 0,0001% + 950µl Tris.HCl
8		25ng/ml	25µl 0,0001% + 975µl Tris.HCl
9		1ng/ml	10µl 0,0001% + 9990µl Tris.HCl
10		0,5ng/ml	500µl 1ng/ml + 500µl Tris.HCl
11		0,05ng/ml	50µl 1ng/ml + 950µl Tris.HCl
12		0,005ng/ml	50µl 1ng/ml + 9950µl Tris.HCl

Inkubation

A	BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
B	BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
C	BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β-Galactosidase-AK
D	GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
E	HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + BSA-AK
F	BSA + GCC

Tabelle 6-2: Pipettier- und Inkubationsschema – HSA – Goldcluster auf Mikrotiterplatten und Maxisorp-Platten

Mikrotiterplatte HSA

Verdünnungsreihe

	HSA%	Konz.	
	1	10mg/ml	0,01g HSA + 1ml Tris HCl
1	0,05	500µg/ml	250µl 1% + 4750µl Tris.HCl
2	0,025	250µg/ml	500µl 0,05% + 500µl Tris.HCl
3	0,005	50µg/ml	100µl 0,05% + 900µl Tris.HCl
4	0,0005	5µg/ml	10µl 0,05% + 990µl Tris.HCl
5	0,0001	1µg/ml	20µl 0,05% + 9980µl Tris.HCl
6		0,1µg/ml	100µl 0,0001% + 900µl Tris.HCl
7		50ng/ml	50µl 0,0001% + 950µl Tris.HCl
8		25ng/ml	25µl 0,0001% + 975µl Tris.HCl
9		1ng/ml	10µl 0,0001% + 9990µl Tris.HCl
10		0,5ng/ml	500µl 1ng/ml + 500µl Tris.HCl
11		0,05ng/ml	50µl 1ng/ml + 950µl Tris.HCl
12		0,005ng/ml	50µl 1ng/ml + 9950µl Tris.HCl

Inkubation

A	HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
B	HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween)
C	HSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + β -Galactosidase-AK
D	GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
E	BSA + GCC + 1%Fischgelatine(+0,1%Tween) + HSA-AK
F	HSA + GCC

Dotten

60µl der BSA- bzw. HSA-Verdünnungen wurden pro well auf der Mikrotiterplatte in den Reihen A-C und Reihe F gedottet und 1h bei RT stehen gelassen. In der Reihe D wurde weder eine BSA- noch eine HSA-Verdünnung aufgebracht und in der Reihe E wurde das jeweils andere Albumin aufgebracht. Beide Reihen dienten wie auch alle anderen bis auf Reihe A zur Negativkontrolle. Die zuvor und danach durchgeführten Wasch- und Blockschritte wurden bei allen Reihen auf gleiche Weise umgesetzt.

Blocken

Nach 1h wurden die Mikrotiterplatten ausgeleert, die wells mit Blocklösung vollgefüllt und 20min bei RT geschüttelt.

Waschen

Die Platten wurden 2x mit Waschlösung befüllt und je 5min auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde 4x mit dd.H₂O gewaschen.

Herstellen der GCC (Goldcluster)-gelabelten Antikörper (AK)

Drei verschieden Antikörper wurden mit GCC gelabelt: Das waren mc-anti-β-Galactosidase-AK (monoklonal), pc-anti-BSA-AK (polyklonal) und mc-anti-HSA-AK (monoklonal).

Zur Herstellung der drei verschiedenen GCC-gelabelten AK-Lösungen wurde 1μl AK zu 10ml GCC-Lösung (Herstellung siehe vorheriges Kapitel 6.7) unter Rühren hinzugefügt und bei RT 20min weitergerührt. Anschließend wurde 1ml 1% Fischgelatine, 0,1% Tween – Lösung (zuvor hergestellt) zugegeben und die Lösung weitere 10min geschüttelt.

Als Negativkontrolle wurde auch eine 10ml GCC-Lösung ohne Antikörper, aber mit 1ml 1% Fischgelatine, 0,1% Tween– Lösung auf dieselbe Weise wie die GCC-Lösung mit Antikörpern hergestellt.

Inkubation

Die Öffnungen der Mikrotiterplatte wurden mit den GCC-gelabelten AK und anderen Lösungen (Negativkontrollen) nach dem Inkubationsschema siehe Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2 bis zum Maximum befüllt und danach 2h bei RT geschüttelt.

Waschen

Nach 2h wurden die Mikrotiterplatten ausgeleert und die wells wurden 3x 10min mit Waschlösung und 3x mit ddH₂O gewaschen.

Die Detektion konnte mit dem Auge durchgeführt werden. Die positiven Signale (rote Färbung durch Goldcluster) waren gut zu sehen.

6.9 CLISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Goldcluster-Lösung auf Nunc Maxisorp-Platten

Der Versuch CLISA zur BSA und HSA –Bestimmung mit der GCC-Lösung wurde auch mit Nunc Maxisorp Platten durchgeführt. Die einzelnen Schritte, das Pipettierschema und die Inkubation wurde wie im vorherigen Versuch mit den Mikrotiterplatten siehe Kapitel 6.8 durchgeführt.

6.10 ELISA: BSA- und HSA-Bestimmung mit Antikörpern, Peroxidase und TMB

Bei diesem Versuch wurden die gleichen BSA- und HSA- Verdünnungsreihen (siehe Pipettierschema Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2) wie in CLISA-Versuch (siehe Kapitel 6.8) verwendet. Die Block- und Waschlösungen sind auch die aus dem CLISA-Versuch (siehe Kapitel 6.8).

Es wurde eine durchsichtige, für ELISA geeignete Nunc Maxisorp-Platte (Mikrotiterplatte) verwendet.

Dotten

Pro well wurden 60µl der BSA- oder HSA – Verdünnungen gedottet (gleiches Pipettierschema und Verdünnungen wie beim Nachweis mit Goldclustern) und über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Aber im Gegensatz zum CLISA wurde nur die Reihe B mit den BSA- bzw. HSA- Verdünnungen beschichtet, da nicht so viele Negativkontrollen notwendig waren. Zur Negativkontrolle wurde die Reihe A jeweils mit dem anderen Albumin beschichtet und in einer Reihe wurden einige wells nicht mit Albumin, sondern nur mit dem Tris/HCl-Puffer versetzt. Die Negativkontrollen wurden in den weiteren Schritten wie die beschichteten wells bearbeitet.

Waschen

Am nächsten Tag wurden die Mikrotiterplatten ausgeleert und kurz mit Waschlösung gewaschen.

Blocken

Die wells wurden mit Blocklösung befüllt und 20min bei RT geschüttelt.

Waschen

Es wurde 3x 5min mit Waschlösung gewaschen.

Inkubieren mit primären AK

Die Stammlösung der primären Antikörper wurden 1:5000 mit 0,01M PBS (phosphate-buffered saline) pH7,4 verdünnt. Anschließend wurden die gedoteten Proben mit 100µl Antikörper-Lösung pro well für 2h bei RT inkubiert.

Primärer Antikörper für BSA-Platte: pc-anti-BSA-AK (polyklonal), rabbit

Primärer Antikörper für HSA-Platte: mc-anti-HSA-AK (monoklonal), mouse

Waschen

Die Öffnungen der Mikrotiterplatte wurden 3x5min mit Waschlösung gewaschen.

Inkubieren mit sekundären AK

Die Stammlösung der sekundären Antikörper wurden 1:10000 mit 0,01M PBS (phosphate-buffered saline) pH7,4 verdünnt. Anschließend wurden die gedoteten Proben mit 100µl Antikörper-Lösung pro well für 1h bei RT inkubiert.

Die sekundären Antikörper waren mit Horseradish Peroxidase gelabelt.

Sekundärer Antikörper für BSA-Platte: anti-rabbit IgG

Sekundärer Antikörper für HSA-Platte: anti-mouse IgG

Beispiel: HSA – Dotten und Inkubation

- A BSA + prim. AK (für HSA) + sek. AK (anti-mouse IgG; für prim. AK-HSA)
(Negativkontrolle)
- B HSA + prim. AK (für HSA) + sek. AK (anti-mouse IgG; für prim. AK-HSA)

Waschen

Die Platten wurden weitere 3x für 5min mit Waschlösung gewaschen.

Zugabe von Substrat

100µl Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat wurden in jedes well pipettiert und für 10min bei RT inkubiert. Es kam zu einer Farbänderung des TMB-Substrats von klar zu blau. Der Grad der Blaufärbung ist proportional zur Peroxidasemenge im well und damit proportional zur Menge des detektierten Proteins.

Die Mikrotiterplatte wurde fotografiert.

Stoppen der Peroxidase-Reaktion

Nach 10min wurde mit 50µl 1M H_2SO_4 pro well die Reaktion gestoppt. Es kam zu einer Änderung der Farbe von blau zu gelb.

Messung mit Plattenreader bei 450nm

Das Absorptionsmaximum der gestoppten Lösung(gelblich gefärbt) liegt bei 450nm. Es wurde mit einem microplate reader (Model 450, Bio-Rad, Hercules, CA) gemessen.

6.11 Liponsäure: Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials, Reduktion der Liponsäure und Spalten der Antikörper

6.11.1 Binden an die Aminogruppen des Trägermaterials

Liponsäure (1,2-Dithiolan-3-pentansäure) sollte mit einem Crosslinker an die Aminogruppen der organisch silaniserten GBs gebunden werden. Das Problem war, dass Liponsäure sehr schlecht wasserlöslich ist. Der Crosslinker EDC (1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carboiimid Hydroxychlorid) ist wasserlöslich und der Crosslinker DCC (N,N'-Dicyclohexylcarboiimid) löst sich in organischen Lösungsmitteln.

Es wurden einige Vorversuche betreffend der Löslichkeit der Liponsäure, der Crosslinker und der Zusätze (NHS (N-Hydroxysuccinimid) und sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)) in verschiedenen Lösungsmitteln gemacht. Dann wurden je 5g organisch silanierte GBs mit den unterhalb angeführten Crosslinking-Ansätzen versetzt. Bei jedem der 5 Ansätze wurden die gelösten Reagenzien gleichzeitig unter Rühren in das Gefäß mit den GBs geleert und nicht vorher vermischt.

ACHTUNG!: Arbeiten mit DCC immer unter einem Abzug und mit Handschuhen! Es soll nicht eingeatmet oder berührt werden.

Die Crosslinking-Reaktionen, bei denen DCC beteiligt waren, wurden in verschraubaren Glasflaschen durchgeführt.

A Binden mit EDC

40mg Liponsäure gelöst in 20ml Ethanol und

50mg EDC gelöst in 10ml Ethanol

B Binden mit EDC + sulfo-NHS

40mg Liponsäure gelöst in 10ml Ethanol und

400mg EDC gelöst in 10ml dd.H₂O und

50mg sulfo-NHS gelöst in 10ml dd.H₂O

C Binden mit EDC

40mg Liponsäure gelöst in 10ml Ethanol, anschließende Zugabe von 15ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7,1 und

400mg EDC gelöst in 5ml 0,1M Phosphatpuffer pH7,1

D Binden mit DCC

40mg Liponsäure gelöst in 20ml H₂O/DMF (1:4-Volumsverhältnis) und

40mg DCC gelöst in 10ml H₂O/DMF (1:4-Volumsverhältnis)

E Binden mit DCC + NHS

40mg Liponsäure gelöst in 10ml DMF und

120mg DCC gelöst in 10ml DMF und

65mg NHS gelöst in 10ml DMF

Die GBs mit den Crosslinking-Ansätzen wurden über Nacht bei RT gerührt und am nächsten Tag abgenutscht mit einer Nutsche (Porengröße 4). Anschließend wurden sie 3x mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel und 3x mit dd.H₂O gewaschen.

6.11.2 Reduktion der Liponsäure mit Natriumdithionit

Zu denen am Vortag mit Liponsäure behandelten GBs (je 5g pro Ansatz) wurden je 20ml Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) – Lösung (8mg/ml in H₂O) gegeben und 30min bei RT gerührt. Die gebunden Liponsäure wurde zu Dihydrolipoamid reduziert. Nach der Reduktion der Disulfidbindung an der Liponsäure wurde 2x mit dd.H₂O und 2x mit Ethanol gewaschen und abgenutscht. Die GBs wurden bei RT getrocknet.

Ellman`s Test

Zum Nachweis der Immobilisierung der Liponsäure am Trägermaterial und der erfolgreichen Reduktion der gebunden Liponsäure wurden durch den Ellman`s Test die Anwesenheit von SH-Gruppen getestet. Dabei wurden 50µl Ellman`s Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)) (4mg/ml 0,1M Phosphatpuffer pH 8,0) zu 60mg GBs, an die Liponsäure oder nach der Reduktion Dihydrolipoamid gebunden war, gegeben. Das

Ellman's Reagenz und die GBs wurden mit einer Pipettenspitze verrührt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen entwickeln. Der Ellman's Test wurde in weißen Mikrotiterplatten durchgeführt, um die Verfärbung des Reagenz besser zu erkennen und die einzelnen Proben gut vergleichen zu können.

6.11.3 Liponsäure: Spalten der Disulfidbrücken von Antikörpern

Zum Spalten von den Disulfidbrücken der Antikörper wurden GBs verwendet, die mit dem Ansatz A (siehe Kapitel 6.11.1) bearbeitet und anschließend reduziert (siehe Kapitel 6.11.2) wurden. 0,5 g der Dihydrolipoamid-gebundenen GBs wurden in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt und 1ml 0,1M Phosphatpuffer pH8 und 2µl Antikörper (z. B. Anti-Bovine Serum Albumin Rabbit) hinzugefügt. Nach 30min Rühren bei RT wurde die Reaktion beendet, indem der Überstand abpipettiert und kurz zentrifugiert wurde. Durchs Zentrifugieren wurden alle GBs mit den vielleicht noch vorhandenen SH-Gruppen von der Lösung mit den gespaltenen Antikörpern getrennt. Der Überstand wurde mit dem Ellman's Test auf freie SH-Gruppen untersucht, indem man 60µl Ellman's Reagenz mit 60µl abzentrifugierten Überstand vermischt hat. War der Test positiv (Gelbfärbung), wurde der Überstand für weiter Experimente verwendet.

Die GBs wurden gewaschen und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert wie in Kapitel 6.11.2, dadurch waren sie regeneriert und für eine weitere Spaltung zu nutzen.

6.11.4 Gulsenit als Trägermaterial und seine Bindungsfähigkeit

Anstelle der organisch silanisierten GBs wurde organisch silanisierten Gulsenit für einen weiteren Liponsäure-Versuch als Trägermaterial verwendet. Das org. sil. Gulsenit bietet viel mehr Aminogruppen zur Immobilisierung der Liponsäure als die org. sil. GBs. Gulsenit wurde nur mit einem der Liponsäurebindungs-Ansätze präpariert, nämlich mit Ansatz A aus Kapitel 6.11.1. Die weiteren Reaktionsschritte wurden am Gulsenit wie in den Kapiteln 6.11.2 und 6.11.3 mit den GBs durchgeführt.

Um die Bindungsfähigkeit des Gulsenit für die Liponsäure zu testen, wurde das Gulsenit mit der einfachen, zweifachen und vierfachen Menge an Liponsäure und Crosslinker

versetzt. Dabei musste auch wegen der Löslichkeit des Crosslinkers und der Liponsäure die Menge des Lösungsmittel (Ethanol) erhöht werden.

Liponsäure (1x)

40mg Liponsäure gelöst in 20ml Ethanol und

50mg EDC gelöst in 10ml Ethanol

reduzieren der gebundenen Liponsäure mit 20ml Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – Lösung (8mg/ml in H_2O)

Liponsäure (2x)

80mg Liponsäure gelöst in 40ml Ethanol und

100mg EDC gelöst in 20ml Ethanol

reduzieren der gebundenen Liponsäure mit 40ml Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – Lösung (8mg/ml in H_2O)

Liponsäure (4x)

160mg Liponsäure gelöst in 80ml Ethanol und

200mg EDC gelöst in 40ml Ethanol

reduzieren der gebundenen Liponsäure mit 80ml Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – Lösung (8mg/ml in H_2O)

Anschließend wurde der derivatisierte Gulsenit mit dem Ellman's Test und Kaisertest (Durchführung siehe Kapitel 6.6) überprüft.

6.12 Testen von Affinitätschromatographiesäulenmaterial zur Reinigung von Serum: Kurzkettiges oder langkettiges PLGA

6.12.1 Immobilisierung von kurzkettigem bzw. langkettigem PLGA an organisch silanisierten Gulsenit

Die Immobilisierung am Gulsenit wurde sowohl mit kurzkettigem (Resomer RG 502H) als auch mit langkettigem (Resomer RG 503H) PLGA (Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid) durchgeführt. In der weiteren Beschreibung des Versuchs wird aus diesem Grund nur noch von PLGA geschrieben, ohne weitere Definition.

1g PLGA wurde in 20ml Ethylacetat gelöst. 575mg NHS wurden in 40ml Ethylacetat gelöst und danach wurde zu dieser Lösung 310µl DIC (N,N'-Diisopropylcarbodiimid) hinzugefügt. Anschließend wurde die PLGA-Lösung und Crosslinker-Lösung zusammengeleert und 1h bei RT gerührt. Nach 1h wurde das aktivierte PLGA mit 20g org. sil. Gulsenit versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde der Gulsenit mit Hilfe einer Nutsche 3x mit Ethylacetat und 3x mit Methanol gewaschen, um das nicht gebundene PLGA zu entfernen.

Zur Kontrolle des Ausmaßes der Immobilisierung wurde ein Kaisertest beim org. sil. Gulsenit ohne PLGA, mit kurzkettigen PLGA und mit langkettigen PLGA durchgeführt. Je geringer die Kaisertestlösung gefärbt war, desto weniger freie Aminogruppen waren vorhanden und desto mehr PLGA war gebunden. (Kaisertestdurchführung siehe Kapitel 6.6).

6.12.2 Affinitätschromatographie von Präserum bzw. Serum mit Gulsenit gekoppelt mit kurzkettigem PLGA als Säulenmaterial

Die Affinitätschromatographie wurde mit Präserum und Serum von immunisierten Kaninchen Nr. 95 und Nr. 96 durchgeführt. Präserum nennt man das Blut, das dem Kaninchen vor der Immunisierung abgenommen wurde. Serum nennt man das Blut, das

dem Kaninchen nach der Immunisierung abgenommen wurde. Die Kaninchen wurden mit PLGA immunisiert, um anti-PLGA-Antikörper zu erzeugen.

Das abgenommene Blut wurde sofort abzentrifugiert und der Überstand entweder mit einer Protein A – Säule oder mit Dynabeads gereinigt. Dadurch wurden alle Antikörper (IgGs) vom Rest getrennt. Die vorgereinigten Präseren und Seren wurden danach einer Affinitätschromatographie unterzogen, damit nur die gegen das PLGA gerichteten Antikörper übrig blieben.

Für die Affinitätschromatographie wurde eine 2,5ml Säule verwendet. Es wurden einzelne Lösungen hergestellt:

- Bindepuffer (5mM PBS, 0,15M NaCl, pH 7,2)
- Neutralisierungspuffer (0,5M NaHCO₃)
- Elutionspuffer (0,1M CH₃COONa, 0,1M CH₃COOH, pH 3)

Binden

500µl Serum wurden mit 1500µl Bindepuffer im Verhältnis 1:4 verdünnt. Das wie im vorherigen Kapitel 6.12.1 beschrieben hergestellte Gulsenit mit kurzkettigen PLGA wurde mit dem Bindepuffer vermischt und in die Säule gefüllt (ca. 2ml). Anschließend wurde das Säulenmaterial 15min bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,5ml/min mit Bindepuffer gewaschen. Danach wurde das verdünnte Serum auf die Säule aufgetragen. Die Durchflussgeschwindigkeit des Bindepuffers wurde auf 0,16ml/min verringert und es wurden 13ml des Bindepuffers nach dem Auftragen der Probe durch die Säule tropfen gelassen. Die Säule wurde mit Bindepuffer gewaschen bis kein Protein in den aufgefangenen Fraktionen durch den Bradford-Protein-Assay detektiert wurde.

Eluieren

Die PLGA-Antikörper wurden mit dem Elutionspuffer mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,17ml/min aus der Säule gewaschen. Es wurden durchschnittlich 30ml Elutionspuffer verwendet, um die PLGA-Antikörper aus der Säule zu eluieren. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 2 Tropfen gesammelt und zu jeder Fraktion wurde 14µl Neutralisationspuffer getropft. Da der Elutionspuffer einen pH-Wert

von 3 hat, muss die Antikörperlösung schnell wieder auf einen neutralen pH-Wert gebracht werden, damit die Antikörper nicht denaturieren.

Zur Nachverfolgung des Elutionsverlaufs wurde von jeder 24. Fraktion ein Bradford-Protein-Assay gemacht. Damit war es auch möglich die Fraktionen mit den höchsten Antikörperkonzentrationen zu ermitteln.

Nach der Affinitätschromatographie wurde ein Kaisertest von dem verwendeten Säulenmaterial gemacht. Zum Vergleich wurde ein Kaisertest von org. sil. Gulsenit ohne kurzkettiges PLGA, mit kurzkettigen PLGA und mit kurzkettigen PLGA nach einer Affinitätschromatographie gemacht. Es sollte gezeigt werden, wie oft man den Gulsenit gekoppelt mit PLGA für eine Affinitätschromatographie verwenden kann und wie groß der Kopplungsverlust an PLGA durch die starken pH-Schwankungen ist.

7 Tabellen und Grafiken

7.1 TNBS-Versuche

Tabelle 7-1: TNBS-Verdünnung

TNBS-Stammlösung: c=0,01g/L						
WL	Stammlösung	Verdünnung 1:1	Verdünnung 1:5	Verdünnung 1:10	Verdünnung 1:50	Verdünnung 1:100
	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption
450	0,479	0,284	0,143	0,048	0,008	0,003
440	0,709	0,434	0,208	0,071	0,013	0,006
430	0,911	0,565	0,267	0,092	0,017	0,008
420	1,037	0,648	0,306	0,106	0,02	0,01
410	1,072	0,676	0,321	0,112	0,021	0,011
400	1,061	0,68	0,321	0,113	0,022	0,012
390	1,063	0,698	0,323	0,115	0,024	0,013
380	1,142	0,779	0,351	0,13	0,031	0,02
370	1,357	0,948	0,411	0,153	0,037	0,024
360	1,597	1,157	0,488	0,185	0,046	0,03
350	1,699	1,295	0,543	0,208	0,054	0,037
340	1,632	1,272	0,531	0,203	0,053	0,036
330	1,55	1,147	0,465	0,176	0,044	0,031
320	1,272	0,911	0,369	0,141	0,038	0,027
310	0,926	0,655	0,273	0,108	0,033	0,026
300	0,626	0,448	0,204	0,089	0,037	0,034

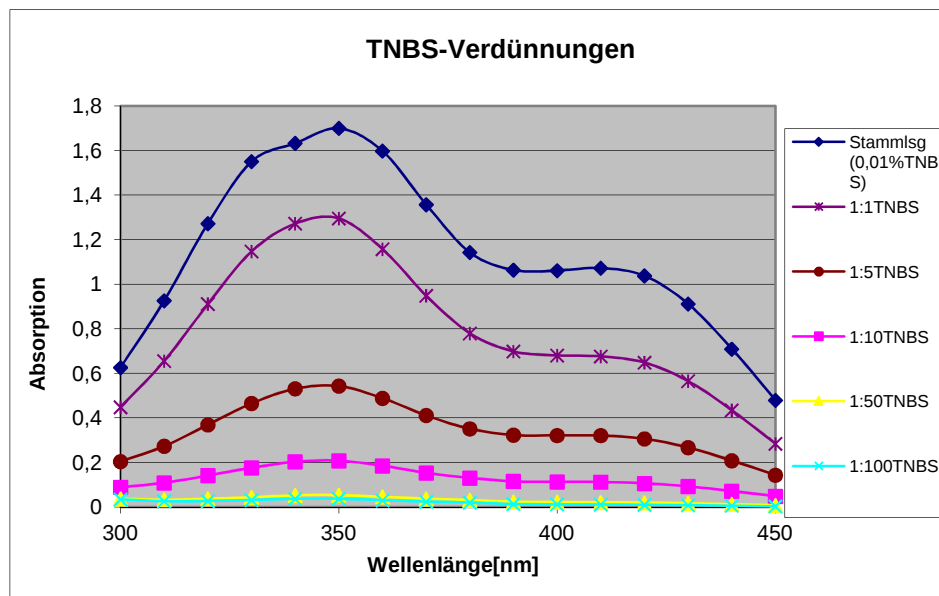


Abbildung 7-1: TNBS-Verdünnungen

Tabelle 7-2: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln und trennen des Überstands von GBs

nach 1h bei 37°C schütteln Überstand von GBs trennen					
WL	1:20-TNBS Verdünnung	2g unb.GB +1:20TNBS	2g org.GB +1:20TNBS	3g unb.GB +1:20TNBS	3g org.GB +1:20TNBS
450	0,003	0,004	0,017	0,005	0,021
440	0,006	0,007	0,026	0,009	0,031
430	0,01	0,011	0,033	0,013	0,039
420	0,014	0,016	0,039	0,017	0,045
410	0,017	0,019	0,042	0,021	0,049
400	0,021	0,023	0,045	0,025	0,052
390	0,025	0,027	0,053	0,029	0,058
380	0,043	0,046	0,074	0,049	0,081
370	0,049	0,052	0,087	0,053	0,095
360	0,058	0,062	0,104	0,063	0,114
350	0,071	0,075	0,12	0,077	0,133
340	0,071	0,076	0,117	0,076	0,13
330	0,06	0,064	0,096	0,063	0,108
320	0,054	0,058	0,078	0,056	0,088
310	0,052	0,056	0,062	0,054	0,071
300	0,062	0,065	0,06	0,062	0,069

Tabelle 7-3: TNBS(1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen und 1h bei 37°C weiterschütteln (ohne Ethanolamin)

nach 1h bei 37°C schütteln Überstand von GBs trennen, dann 1h bei 37°C weiter schütteln (ohne Ethanolamin)					
WL	1:20-TNBS Verdünnung	2g unb.GB +1:20	2g org.GB +1:20	3g unb.GB +1:20	3g org.GB +1:20
450	0,003	0,009	0,014	0,004	0,016
440	0,006	0,012	0,021	0,008	0,025
430	0,01	0,016	0,028	0,012	0,032
420	0,015	0,021	0,034	0,017	0,038
410	0,018	0,025	0,037	0,021	0,041
400	0,022	0,028	0,04	0,024	0,044
390	0,026	0,032	0,045	0,029	0,049
380	0,046	0,053	0,069	0,05	0,073
370	0,051	0,059	0,08	0,055	0,085
360	0,062	0,07	0,097	0,066	0,104
350	0,076	0,085	0,115	0,08	0,121
340	0,075	0,085	0,112	0,079	0,116
330	0,063	0,072	0,093	0,065	0,096
320	0,055	0,066	0,077	0,057	0,077
310	0,05	0,064	0,063	0,054	0,062
300	0,057	0,075	0,068	0,059	0,059

Tabelle 7-4: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen, dann Ethanolamin hinzufügen und 1h bei 37°C weiterschütteln

nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen und Zugabe von Ethanolamin, dann 1h bei 37°C weiterschütteln					
WL	1:20-TNBS Verdünnung	2g unb.GB +1:20	2g org.GB +1:20	3g unb.GB +1:20	3g org.GB +1:20
450	0,045	0,038	0,02	0,047	0,018
440	0,066	0,059	0,029	0,069	0,027
430	0,085	0,077	0,039	0,089	0,036
420	0,098	0,091	0,048	0,103	0,043
410	0,104	0,098	0,056	0,109	0,048
400	0,106	0,102	0,061	0,111	0,053
390	0,11	0,109	0,067	0,115	0,06
380	0,136	0,137	0,089	0,142	0,084
370	0,158	0,16	0,097	0,163	0,096
360	0,189	0,192	0,107	0,194	0,112
350	0,217	0,22	0,12	0,225	0,127
340	0,215	0,216	0,117	0,221	0,125
330	0,187	0,187	0,099	0,191	0,104
320	0,156	0,155	0,09	0,156	0,087
310	0,129	0,126	0,086	0,125	0,075
300	0,125	0,12	0,101	0,11	0,077

Tabelle 7-5: TNBS-Vergleich zwischen organisch, wässrig silanisierten und unbehandelten GBs

nach 1h bei 37°C schütteln Überstand von GBs trennen, dann 1h bei 37°C mit Ethanolamin weiterschütteln				
WL	1:20-TNBS Verdünnung	2g unb.GB +1:20	2g org.GB +1:20	2g wsrg.GB +1:20
450	0,039	0,058	0,018	0,034
440	0,058	0,074	0,026	0,05
430	0,075	0,09	0,034	0,065
420	0,088	0,103	0,042	0,077
410	0,093	0,107	0,047	0,083
400	0,093	0,106	0,05	0,084
390	0,093	0,106	0,053	0,085
380	0,106	0,115	0,066	0,098
370	0,12	0,129	0,074	0,11
360	0,144	0,151	0,085	0,128
350	0,167	0,172	0,095	0,146
340	0,167	0,172	0,092	0,145
330	0,146	0,153	0,082	0,127
320	0,121	0,13	0,075	0,107
310	0,098	0,11	0,073	0,092
300	0,085	0,105	0,084	0,087

Tabelle 7-6: Zeitabhängigkeit von OPA

OPA+MEO+EA					
Zeit [min]	Zugabe von Ethanolamin nach 0min	Zeit [min]	Zugabe von Ethanolamin nach 20min	Zeit [min]	Zugabe von Ethanolamin nach 40min
3	1,13786	3	1,51023	2	2,1659
10	0,602753	9	1,28332	7	0,627176
16	0,607357	15	1,51131	17	0,187169
24	0,760477	32	1,31086	28	0,411245
30	0,814719	42	1,87466	39	0,370732
38	0,773253	54	1,31751	51	0,352023
46	0,864168	65	1,2272		
54	0,809077				
62	0,812653				
74	0,9014508				

8 Reagenzien

Name	Formel	Hersteller
1%(w/v) Tri-natrium-citrat-Lösung	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Riedel-de Haen
2-Mercaptoethanol	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Fluka
5% (w/v)TNBS - Lösung; 2,4,6-Trinitro-benzenesulfonic acid solution	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$	Sigma
Anti-BSA-Antikörper (polyklonal) Rabbit (2mg/ml) Anti Bovine Serum Albumin		Sigma-Aldrich Lot. 113K4800
Anti-HSA-Antikörper (monoclonal) Mouse (7,8mg/ml) Monoclonal Anti-Human Albumin Clone HSA-11		Sigma-Aldrich Lot. 093K4857
Anti- β -galactosidase-Antikörper (monoclonal) (2,5mg/ml)		Promega, Fitchburg, WI
APTS; 3-aminopropyltriethoxysilane	$\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$	Fluka
calf intestinal alkalische Phosphatase (AP) (10mg/ml) 2600units/mg		Sigma
Conjugated horseradish peroxidase sekundärer Antikörper (anti mouse IgG)		Sigma-Aldrich

Reagenzien

Conjugated horseradish peroxidase sekundärer Antikörper (anti rabbit IgG)		Sigma-Aldrich
controlled-pore glass (glass beads) nicht porös		Sigma
DCC (N,N'- Dicyclohexylcarbodiimid)	$C_{13}H_{22}N_2$	Merck 802954
DIC (N,N'- Diisopropylcarbodiimid 99%)	$(CH_3)_2CHN=C=NCH(CH_3)_2$	Sigma Aldrich Cat.: D125407 Lot.: S44516-168
Dynatech Microlite™ 2 Flat bottom plates (Mikrotiterplatte)		Dynatech Laboratories Inc, Chantilly, VA Cat. Nr.: 011-010-7417
EDC; 1-ethyl-3-(3-dimethyl- aminopropyl)carbodiimid hydrochlorid	$C_8H_{17}N_3.HCl$	Sigma
Ellman's Reagenz; 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	Pierce Lot.: 94121365A
Fischgelatine		Sigma-Aldrich
Glasplättchen-Silica glass slides (12mm)		Assistant, Austria
Glutaraldehyd-Lösung (25wt. % in H ₂ O)	$OHC(CH_2)_3CHO$	Fluka
Gold Colloid	$HAuCl_4.3H_2O$	Sigma Aldrich
Gulsenit (poröses Silikatpulver mit großer Oberfläche)		MAGINDAG, Austria
Kaliumcyanid	KCN	Merck
Liponsäure (DL-α-Lipoic acid)	$C_8H_{14}O_2S_2$	Fluka, 62320
Maxisorp 96F – Platten white microwell		Nunc, Roskilde, Denmark Cat. Nr.: 436110

Reagenzien

Maxisorp™-Platten für ELISA (clear)		Nunc, Roskilde, Denmark
Natriumdithionit	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Merck Lot.: 6213083
Natriumhydroxid	NaOH	Riedel-de Haen
NHS (N-Hydroxysuccinimid) 98%	$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$	Aldrich Lot.: S28347-265
Ninhydrin (2,2-Dihydroxy- indan-1,3-dion)	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$	Merck
OPA; o-phthaldialdehyde	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$	Fluka
p-Chloranil	$\text{C}_6\text{Cl}_4\text{O}_2$	Fluka
Phenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Fluka
PLGA (kurzkettig) Resomer RG 502H, 400mg, Poly(D,L- lactide-co-glycolide) acid terminated, M_w 7000-17000	$[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$	Boehringer Ingelheim
PLGA (langkettig) Resomer RG 503H, 400mg, Poly(D,L- lactide-co-glycolide) acid terminated, M_w 24000-38000	$[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$	Sigma Aldrich
p-Nitrophenyl-phosphate di salt (p-NPP)	$(\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{P})(\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NO}_3)_2$	Koch-Light-Limited
Salzsäure, 37-38%	HCl	Riedel-de Haen
Sulfo-NHS (N- Hydrosulfosuccinimid)	$\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$	Pierce Lot.: JA117790
Tetramethylbenzidin (TMB)- Substrat		Sciotec, Wien TMB51-Lot. 10_2006
Tween 20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aminosilanisieren der anorganischen Trägermaterialoberfläche mit der Organosilan-Verbindung APTS.....	2
Abbildung 1-2: Struktur eines Antikörpers (IgGs).....	4
Abbildung 1-3: Schema des Drug reloading-Systems mit Nano- oder Mikropartikeln [3].	5
Abbildung 3-1: Struktur von TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid)	9
Abbildung 3-2: TNBS-Reaktion mit Aminen	10
Abbildung 3-3: OPA reagiert mit Aminen zum Fluorophor	10
Abbildung 3-4: Aktivierung von aminosilanisierten Oberflächen durch Glutaraldehyd und Binden von alkalischer Phosphatase	11
Abbildung 3-5: Hydrolyse von p-NPP durch AP katalysiert und Entstehung eines intensiv gelb gefärbten Produktes, zu messen bei 405nm	12
Abbildung 3-6: Struktur von Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-indan-1,3-dion)	12
Abbildung 3-7: Kaisertest: Ninhydrin-Reaktion mit Aminogruppe zu „Ruhemanns Purpur“	13
Abbildung 3-8: Drei Mechanismen, die für die Bindung von Proteinen am Goldpartikel verantwortlich sind	18
Abbildung 3-9: Antikörper-gelabelte Goldcluster zur Detektion von spezifischen Antigenen. Die freien Stellen auf den Goldclustern neben den Antikörpern wurden mit Blockreagenzien wie Fischgelatine und Tween 20 abgedeckt.	19
Abbildung 3-10: Stabilisierung der Goldcluster durch Beschichtung mit Protein G	19
Abbildung 3-11: Schema des CLISAs	20
Abbildung 3-12: Schema des ELISAs	21
Abbildung 3-13: TMB-Reaktion mit Peroxidase, nach der Zugabe von 1N Schwefelsäure zum Stoppen der Reaktion kann man photometrisch bei 450nm messen	22
Abbildung 3-14: Struktur von EDC	23
Abbildung 3-15: EDC-Funktionsweise als Crosslinker.....	24
Abbildung 3-16: EDC + sulfo-NHS – Mechanismus als Crosslinker	26
Abbildung 3-17: Struktur von DCC	27

Abbildung 3-18: DCC-Funktionsweise als Crosslinker.....	28
Abbildung 3-19: Umlagerung von o-Acylisoharnstoff in N-Acylharnstoff	28
Abbildung 3-20: Struktur von NHS.....	29
Abbildung 3-21: Struktur von DIC	30
Abbildung 3-22: DIC-Funktionsweise als Crosslinker.....	30
Abbildung 3-23: Struktur des Ellman's Reagenz	31
Abbildung 3-24: Mechanismus des Ellman's Tests.....	32
Abbildung 4-1: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln und Trennen des Überstands von GBs; unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-2)	34
Abbildung 4-2: TNBS(1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen und 1h bei 37°C weiterschütteln (ohne Ethanolamin); unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-3)	35
Abbildung 4-3: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen, dann Ethanolamin hinzufügen und 1h bei 37°C weiterschütteln; unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert (Daten siehe Tabelle 7-4)	35
Abbildung 4-4: TNBS-Vergleich zwischen organisch, wässrig silanisierten und unbehandelten GBs, unb. = unbehandelt, nicht aminosilanisiert; org. = organisch aminosilanisiert; wsrg. = wässrig aminosilanisiert(Daten siehe Tabelle 7-5).....	36
Abbildung 4-5: Zeitabhängigkeit von OPA (Daten siehe Tabelle 7-6).....	38
Abbildung 4-6: Detektion der freien Aminogruppen mit dem Kaisertest: Vergleich der Anzahl der Aminogruppen der organischen Silanisierung von Glasplättchen, glass beads und Gulsenit	40
Abbildung 4-7: BSA neu + GCC neu.....	43
Abbildung 4-8:BSA alt + GCC neu.....	43
Abbildung 4-9: BSA neu+ GCC alt.....	44
Abbildung 4-10: BSA alt + GCC alt.....	44
Abbildung 4-11: HSA neu + GCC neu	45

Abbildung 4-12: HSA alt + GCC neu	45
Abbildung 4-13: HSA neu + GCC alt	46
Abbildung 4-14: HSA alt + GCC alt	46
Abbildung 4-15: Nunc Maxisorp Platten mit BSA neu + GCC neu	49
Abbildung 4-16: CLISA-Test (HSA neu + GCC neu): Detektion durch Goldcluster	50
Abbildung 4-17: ELISA-Test: Detektion durch Farbreaktion von TMB	50
Abbildung 4-18: Binden der Liponsäure ans Trägermaterial und Reduktion zum Dihydrolipoamid	55
Abbildung 4-19: Spalten der Antikörper mit Liponsäure durch Aufbrechen der Disulfid- Brücken	55
Abbildung 4-20: Kaisertests der GBs und des Gulsenits ohne und mit Liponsäure	58
Abbildung 4-21: Vergleich der zur Spaltung zur Verfügung stehenden Sulfhydryl-Gruppen und der gespaltenen Antikörper bei einer vorgegebenen Antikörperkonzentration	60
Abbildung 4-22: Der Kaisertest von organisch silanisierten Gulsenit ohne und mit kurzkettigen bzw. langkettigen PLGA. Umso heller die Blaufärbung, desto mehr Aminogruppen wurden mit PLGA gekoppelt.....	62
Abbildung 4-23: Der Kaisertest von org. sil. Gulsenit und org. sil. Gulsenit mit gebunden kurzkettigen PLGA vor und nach einer Affinitätschromatographie.	63
Abbildung 7-1: TNBS-Verdünnungen	85

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Messung der Emission von fluoreszierenden OPA-Derivaten am Fluorimeter bei 455nm	37
Tabelle 4-2: Vergleich der Crosslinker für das Binden von Liponsäure an ein Trägermaterial	57
Tabelle 6-1: Pipettier- und Inkubationsschema – BSA – Goldcluster auf Mikrotiterplatten und Maxisorp-Platten	72
Tabelle 6-2: Pipettier- und Inkubationsschema – HSA – Goldcluster auf Mikrotiterplatten und Maxisorp-Platten	73
Tabelle 7-1: TNBS-Verdünnung.....	85
Tabelle 7-2: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln und trennen des Überstands von GBs	86
Tabelle 7-3: TNBS(1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen und 1h bei 37°C weiterschütteln (ohne Ethanolamin)	86
Tabelle 7-4: TNBS (1:20-Verdünnung) – Messung nach 1h bei 37°C schütteln, Überstand von GBs trennen, dann Ethanolamin hinzufügen und 1h bei 37°C weiterschütteln.....	87
Tabelle 7-5: TNBS-Vergleich zwischen organisch, wässrig silanisierten und unbehandelten GBs	87
Tabelle 7-6: Zeitabhängigkeit von OPA.....	88

11 Literaturverzeichnis

- [1] Hermanson G. T. Bioconjugate Techniques (second edition), Elsevier, p562-570 (2008)
- [2] Murlisch M., Welsch U. (Hrsg.) Romeis Mikroskopische Technik (18. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag, p388 (2010)
- [3] Al-Dubai H., Pittner G., Pittner F., Gabor F. Biocompatible medical implant materials with binding sites for a biodegradable drug-delivery system. Nanotechnology, Science and Applications, 4:87-94 (2011)
- [4] Al-Dubai H., Oberhofer G., Kerleta V., Hinterwirth H. H., Strobl M., Gabor F. Cleavage of antibodies using dihydrolipoamide and anchoring of antibody fragments on to biocompatibly coated carriers. Chemical Monthly, 141:485-490 (2010)
- [5] Okuyama T., Satake K. On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl-amino acids and –peptides. The Journal of Biochemistry, 47(4):454-466 (1960)
- [6] Palmer D. W., Peters T. Jr. Automated Determination of Free Amino Groups in Serum and Plasma Using 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonate. Clinical Chemistry, 15:891-901 (1969)
- [7] Hermanson G. T. Bioconjugate Techniques (second edition), Elsevier, p127-128 (2008)
- [8] Hermanson G. T. Bioconjugate Techniques (second edition), Elsevier, p128-129 (2008)
- [9] Molnár-Perl I., Vasanits A. Stability and characteristics of the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine-reagents and their amino acid derivatives measured by high-

- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 835:73-91 (1999)
- [10] Campins-Falcó P., Molins-Lagua C., Sevillano-Cabeza, Tortajada Genaro L. A. O-Phthalaldehyde-n-acetylcysteine Polyamine derivatives: formation and stability in solution and in C₁₈ supports. *Journal of Chromatography B*, 759:285-297 (2001)
- [11] Hinterwirth H. H., Strobl M., Al- Dubai H. Analytical methods for detection of small amounts of amino groups on solid surfaces: a survey. *Chemical Monthly*, 141:291-299 (2010)
- [12] Moore St., Stein W. H. Photometric Ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 176:367-388 (1948)
- [13] Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, 34:595-598 (1970)
- [14] Al-Dubai H., Pittner G., Pittner F. A dot-blot test using gold colloid cluster technology as a miniaturizable alternative to ELISA and hapten inhibition tests. *Chemical Monthly* , 139:1531-1536 (2008)
- [15] Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques* (second edition), Elsevier, p924-935 (2008)
- [16] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension. *Nature Physical Science*, 241:20-22 (1973)
- [17] Al-Dubai H., Lichtscheidl I., Strobl M., Pittner G., Pittner F. Immunosorbent assay using gold colloid cluster technology for determination of IgEs in patients' sera. *Nanotechnology, Science and Applications.*, 3:91-100 (2010)

- [18] Frey A., Meckelein B., Externest D., Schmidt M. A. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methode*, 233:47-56 (2000)
- [19] Schulz D. M., Sinz A. Chemisches Cross-Linking und Massenspektrometrie zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Proteinen. *BIOspektrum*, 1:45-48, 10.Jahrgang (2004)
- [20] Pittner F. Immobilized biomolecules in bioanalysis. In: Schalkhamer TGM (ed) *Analytical biotechnology*, Birkhäuser, Basel, p3-5 (2002)
- [21] Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques* (second edition), Elsevier, p215-227 (2008)
- [22] Crosslinking Reagents. Thermo Scientific , Pierce Protein Biology Products. Zu finden unter<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=0203&WT.mc_id=go_Crosslinkers_CL_pf&gclid=CNfQ_Imw2rECFUrP3wod3nsA6w> [zitiert am 8.8.2012]
- [23] Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques* (second edition), Elsevier, p100-101 (2008)
- [24] Gorecki M., Patchornik A. Polymer-bound dihydrolipoic acid: a new insoluble reducing agent for disulfides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 303:36-43 (1973)

12 Stichwort- und Namensverzeichnis

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APTS	3-aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovine Serum Albumin
CLISA	Cluster Linked Immunosorbent Assay
DCC	N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
GBs	Controlled-pore glass beads
GCC	Goldcluster (gold colloid cluster)
HSA	Human Serum Albumin
mc-anti-HSA-AK	Monoklonale-Anti-Human Serum Albumin-Antikörper
mc-anti-β-Galactosidase-AK	monoklonale-Anti-β-Galactosidase-Antikörper
MEO	2-Mercaptoethanol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OPA	o-phthaldialdehyde
PBS	Phosphate-buffered saline
pc-anti-BSA-AK	Polyklonale-Anti-Bovine Serum Albumin-Antikörper
PLGA	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid
RT	Raumtemperatur
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TMB	Tetramethylbenzidin – Substrat
TNBS	2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid

13 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Martina Strobl
Geboren: am 07. 08. 1981 in Wr. Neustadt
Wohnhaft: Bahnstraße 137, 7203 Wiesen

Ausbildung

1987-1991 Volksschule Wiesen
1991-1999 Gymnasium Mattersburg
06/1999 Matura im Gymnasium Mattersburg
10/1999 Beginn des Diplomstudiums Chemie an der Universität Wien
10/2009 Wechsel ins Bachelorstudium Chemie an der Universität Graz
10/2010 Abschluss des Bachelorstudiums Chemie an der Universität Graz
03/2011 Beginn des Masterstudiums Chemie an der Universität Wien

Publikationsliste

Hinterwirth H. H., Strobl M., Al- Dubai H. Analytical methods for detection of small amounts of amino groups on solid surfaces: a survey. Chemical Monthly, 141:291-299 (2010)

Al-Dubai H., Lichtscheidl I., Strobl M., Pittner G., Pittner F. Immunosorbent assay using gold colloid cluster technology for determination of IgEs in patients' sera. Nanotechnology, Science and Applications., 3:91-100 (2010)

Al-Dubai H., Oberhofer G., Kerleta V., Hinterwirth H. H., Strobl M., Gabor F. Cleavage of antibodies using dihydrolipoamide and anchoring of antibody fragments on to biocompatibly coated carriers. Chemical Monthly, 141:485-490 (2010)