



universität
wien

DIPLOMARBEIT

IMMOBILISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON WEIZENKEIMLEKTIN AN SILANISIERTEN GLASOBJEKTTRÄGERN

Zur Erlangung des akademischen Grades

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Izabela Ivošević
Matrikel-Nummer:	9800313
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	A.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Ausgeführt am Department für pharmazeutische Technologie und
Biopharmazie Universität Wien
Wien, am 14.07.2009

DANKESCHÖN

Ich bedanke mich herzlich bei den Professoren,
Herrn Dr. Michael Wirth
und Herrn Dr. Franz Gabor,
sowie bei allen Kollegen des Institutes
für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
insbesondere bei Frau Dr. Mag. Iris Güll
für die großartige Unterstützung während meiner Diplomarbeit.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern,
Božica und Anto Mijačević
Für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums.
Hvala Vam!

INHALTSVERZEICHNIS

1. <u>EINLEITUNG</u>	3
2. <u>ALLGEMEINER TEIL</u>	5
2.1. <u>Adhäsion von Zellen</u>	5
2.1.1. Extrazelluläre Matrix (EM)	5
2.1.2. Basalmembran	7
2.2. Glas und seine Eigenschaften	7
2.3. Biomoleküle	9
2.3.1. Lektine	9
2.3.2. WGA, wheat germ agglutinin, Weizenkeimlektin	10
2.4. Albumine	11
2.4.1. BSA, bovines Serumalbumin	12
2.5. Muzine	12
2.6. Antikörper und Antigene	12
2.7. Immunoassays	13
2.7.1. <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay (ELISA)	15
2.7.1.1. Testprinzipien verschiedener ELISA-Systeme	15
3. <u>MATERIALIEN, GERÄTE UND METHODEN</u>	18
3.1. Materialien	18
3.2. Geräte	19
3.3. Spektroskopische Methoden	19
3.3.1. UV-VIS Spektroskopie	20
3.4. Pufferlösungen	21
3.5. Antikörperlösungen	22
3.6. Substratlösungen	23

4. <u>SPEZIELLER TEIL</u>	24
4.1.Modifizierung von Glasoberflächen	24
4.1.1. Vorbehandlung der Objektträger	24
4.1.2. Funktionalisierung der Glasobjektträger	25
4.1.2.1. Silanisierung mit APTES	25
4.1.2.2. Silanisierung mit GPTS	26
4.2.Kopplung von WGA an die Glasoberfläche	27
4.2.1. Aktivierung der mit APTES modifizierten Glasoberflächen	27
4.2.2. Immobilisierung von Weizenkeimlektin	29
4.3.Nachweis von immobilisiertem WGA mittels ELISA	29
4.3.1. WGA- Immobilisierung auf Mikrotiterplatten	30
4.3.2. Qunantitative Bestimmung von WGA	31
4.3.3. WGA-Quantifizierung auf modifizierten Glasoberflächen	33
4.4.Beurteilung der einzelnen Immobilisierungsparameter durch Quantifizierung von WGA	35
4.4.1. Aktivierung von APTES-modifizierten Glasobjektträgern	36
4.4.2. Inkubationsdauer mit WGA	37
4.4.3. Absättigung modifizierter Glasoberflächen	37
4.4.3.1. Sättigungsreagenz	38
4.4.3.2. Inkubationsdauer mit dem Sättigungsreagenz	40
4.5.Lagerung	41
4.6.Optimierung des ELISA-Testsystems	42
4.6.1. Ermittlung des optimalen Reaktionszeitraumes	42
4.6.2. Ermittlung des linearen Bereiches	44
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBILCK</u>	46
6. <u>ANHANG</u>	50
6.1.Abkürzungsverzeichnis	50
6.2.Literaturverzeichnis	51
6.3.Lebenslauf	54
6.4.Rohrdaten	55

1. EINLEITUNG

Bei der Entwicklung neuer Technologien zur Überprüfung potentieller Arzneimittel hat der Einsatz von Zellkulturen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Gerade im Bereich der Pharmazie basieren sehr viele neue Versuchstechniken auf der Anwendung von Zellkultursystemen. Zellkulturen bieten die Möglichkeit, Tierversuche einzusparen, und sind gleichzeitig günstiger und zeitsparend (1). Darüber hinaus fallen durch die Verwendung menschlicher anstatt tierischer Zellen speziesspezifische Unterschiede weg.

Auf dem Gebiet der pharmazeutischen Technologie bieten adhärente Zelllinien viele faszinierende Möglichkeiten, die pharmazeutischen Eigenschaften einer Substanz rasch und relativ einfach zu bewerten und darüber hinaus neue Strategien zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit zu entwickeln. Das in den letzten Jahren mit Hilfe von Zellkulturen gewonnene Wissen bietet außerdem Vorteile für die Entwicklung neuer Verabreichungsstrategien.

Allerdings muss beim Einsatz von Zellkulturen beachtet werden, dass unterschiedliche Zelllinien individuell zu behandeln sind. Für aussagekräftige Ergebnisse ist daher die Wahl einer geeigneten Zelllinie, die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich Adhärenz, Proliferation und Viabilität, sowie eine verantwortungsbewusste Interpretation der erhaltenen Daten von großer Bedeutung. In manchen Fällen sind spezielle Techniken nötig, um Adhärenz, Proliferation oder Viabilität zu verbessern.

In diesem Bereich sind insbesondere die zur Zellzüchtung verwendeten Wachstumsflächen sehr wichtig. Manche für bestimmte Techniken nötige Materialien stellen nämlich keine adäquaten, d.h. den biologischen Membranen entsprechenden Oberflächen dar. Folglich können sich Zellen nur schlecht oder gar nicht an diesen Oberflächen anheften. In solchen Fällen kann man versuchen, die Wachstumsfläche speziell zu modifizieren, um eine bessere Adhärenz der Zelle zu erzielen. Ein Beispiel hierfür wäre die Beschichtung mit Lektinen.

Lektine sind komplexe Proteine oder Glycoproteine, die mit bestimmten Kohlenhydratstrukturen interagieren und dadurch spezifisch an Zellen bzw.

Zellmembranen binden können. Auf diese Weise werden verschiedene Stoffwechselvorgänge wie z.B. die Zellteilung, das Immunsystem oder die Agglutination von Zellen beeinflusst. Lektine sind ubiquitär, das heißt man findet sie in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen.

Besonders im Pflanzenreich sind Lektine weit verbreitet und hier vor allem in Hülsenfrüchten und Weizenkeimen zu finden. In Weizenkeimen ist das sogenannte Weizenkeimagglutinin (WGA = wheat germ agglutinin) enthalten. Ein WGA-Molekül besitzt vier Zuckerbindungsstellen, von denen aber nur zwei hochaffin sind. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-glucosamin und Sialinsäure, die beide z.B. an der Oberfläche von Epithelzellen vorkommen (2).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden grundlegende Untersuchungen zur Modifizierung von Oberflächen mit Weizenkeimlektin durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine Methode zur Quantifizierung des immobilisierten Lektins entwickelt und speziell für modifizierte Oberflächen adaptiert.

Die entsprechende Modifizierung wurde auf Glasobjektträgern durchgeführt. Glas ist ein Material, das einerseits biokompatibel ist und andererseits eine effiziente Immobilisierung von Biomolekülen erlaubt. Diese Immobilisierung kann auf Glas kovalent erfolgen, da die freien Silanolgruppen eine chemische Derivatisierung der Oberfläche ermöglichen. Derart hergestellte Substrate sollen eine verbesserte Anheftung von Zellen durch Wechselwirkung mit den immobilisierten WGA-Molekülen ermöglichen.

Für die Oberflächenmodifikation wurden zwei unterschiedliche Silanisierungstechniken (3) angewandt, die eine nachfolgende Proteinimmobilisierung auf den Glasobjektträgern zulassen.

Durch Optimierung unterschiedlicher Parameter konnte eine gut reproduzierbare Beschichtung erzielt werden. Darüber hinaus wurde eine Möglichkeit zum Nachweis des immobilisierten Lektins entwickelt. Zur Quantifizierung der kovalent gebundenen WGA-Moleküle wurde ein sensitiver ELISA (4) herangezogen, der speziell an die Anforderungen der hergestellten Oberflächen angepasst und optimiert wurde.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Adhäsion von Zellen

Der Kontakt zur Basalmembran stellt für das Wachstum und die Teilung der Zellen einen wesentlichen Parameter dar. Demnach ist die Substratunterlage für die Anheftung von Zellen in Kultur von entscheidender Bedeutung. Die verwendeten Substratunterlagen fungieren in diesem Fall nämlich als Basalmembran für die Zellen und beeinflussen somit sowohl Anheften als auch Wachstum, Polarisierung, Vermehrung und Differenzierung.

Viele Materialien sind aufgrund ihrer mangelhaften Wechselwirkung mit den Zellen für den Einsatz in Zellkulturen ungeeignet. Eine verbesserte Anheftung der Zellen auf solchen Substraten kann durch Beschichten mit Anheftungsproteinen der extrazellulären Matrix erzielt werden. Jedoch sind Beschichtungen mit Fibronectin, Laminin, Kollagen und dergleichen sehr teuer und werden aus Kostengründen in der Routinezellzüchtung nicht eingesetzt. Beschichtungen mit Gelatine oder fetalem Kälberserum stellen hingegen preiswertere Alternativen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Oberflächenmodifikation von Glasobjektträgern versucht, eine verglichen mit der rein physikalischen Adsorption möglichst erhöhte kovalente Immobilisierung unterschiedlicher Biomoleküle (WGA, Rinderserumalbumin (BSA)) zu erzielen. Dadurch sollte die Anheftung und das Wachstum von Zellen positiv beeinflusst werden.

2.1.1. Extrazelluläre Matrix (EM)

Die extrazelluläre Matrix ist jener Teil des Bindegewebes, der sich zwischen den Zellen im Interzellularraum befindet. Sie stellt die Gesamtheit der Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Plasmamembran der Zellen befinden. Die Komponenten der extrazellulären Matrix werden von den Zellen synthetisiert und sezerniert, aber auch extrazellulär oder nach Endozytose intrazellulär, abgebaut. Zelle und EM beeinflussen einander wechselseitig, wobei diese Interaktion für Zelladhäsion, Zellmigration,

Zellproliferation sowie Auf-, Um- und Abbau von Geweben von großer Bedeutung ist.

Die extrazelluläre Matrix übernimmt also eine sehr aktive und komplexe Rolle. Sie beeinflusst die Entwicklung, Vermehrung und Bewegung der Zellen, aber auch deren Form und Stoffwechsel. Grundsätzlich kann man ihre Komponenten in vier Gruppen einteilen:

- *Glycosaminoglykane*

Glycosaminoglykane bestehen aus langen Polysaccharidketten, die meist an Proteine gebunden sind und somit Proteoglykane darstellen. Hauptsächlich findet man Hyaluronsäure, Chondroitin-, Dermatan-, Heparan- und Keratansulfat. Glycosaminoglykane bilden die mechanische Stütze für das Gewebe, sie können viel Wasser binden und haben Einfluss auf die Selbstassemblierung der Kollagene und damit auf die Zellmigration.

- *Struktur bzw. Faserproteine*

Kollagen ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine im Organismus und verleiht dem Gewebe Zugfestigkeit. Bedeutend sind vor allem die Kollagene vom Typ I bis IV. Elastin ist der Hauptbestandteil der elastischen Fasern. Diese besitzen als außerordentliche Eigenschaft ihre reversible Dehnbarkeit.

- *Matrix-Metalloproteinasen,*

Matrix-Metalloproteinasen kontrollieren den Abbau der EM.

- *Adhäsionsproteine*

Fast alle Zellen besitzen Rezeptoren über die sie mit der EM in Kontakt treten. Für diese Interaktion werden oft Adhäsionsproteine, Adapterproteine oder andere adhäsive Proteine benutzt, die selbst Bestandteile der extrazellulären Matrix sind und als Bindungspartner für die Zelloberflächenrezeptoren fungieren.

Durch diese spezifischen Interaktionen zwischen Zelle und Matrix werden die Signale für Entwicklung, Differenzierung und Reparatur der Zellen gesteuert. Adhäsionsproteine sind z.B. das Fibronectin, Tenascin oder das Laminin. Diese koppeln an die sogenannten Integrine, die auf zelluläre Seite von Bedeutung sind.

2.1.2. Basalmembran

Die Basalmembran stellt eine spezialisierte extrazelluläre Matrix dar, die als stabilisierende Proteinschicht unter den Epithelzellen dazu dient, dass die Zellen dieser Schicht nicht auseinander gleiten. Einerseits besitzt die Basalmembran also Stützfunktion und stellt die Verbindung zwischen Epithelzellen und dem darunter liegenden Gewebe her, andererseits bestimmt sie die Polarität der Zellen, steuert die Ausrichtung des Zytoskeletts von Epithelzellen, beeinflusst die Zellwanderung und Zelldifferenzierung sowie den Stoffwechsel. Darüber hinaus ist die Basalmembran auch für die Gewebsregeneration nach Verletzungen wichtig und fungiert als eine selektive Permeabilitätsbarriere für die Zellmigration.

2.2. Glas und seine Eigenschaften

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden für die Oberflächenmodifizierung Objektträger aus Sodakalkglas verwendet, die für in-vitro diagnostische Anwendung geeignet sind.

Glas ist ein amorpher, nicht-kristalliner Feststoff. Thermodynamisch wird es als gefrorene, unterkühlte Schmelze bezeichnet, d.h. Glas ist ein Feststoff, der so schnell abgekühlt wurde, dass er nicht kristallisieren konnte. Zwar bilden sich bei der Erstarrung der Schmelze Kristallkeime, für den Kristallisationsprozess verbleibt jedoch nicht genügend Zeit.

Der Hauptbestandteil von Normalglas ist Siliziumdioxid (SiO_2). Diese Zusammensetzung weist auch Quarz auf wobei der entscheidende Unterschied in der strukturellen Anordnung des SiO_2 liegt. Nach der Hypothese von Zachariasen, liegen in Glas grundsätzlich dieselben Bindungszustände vor wie in einem Kristall, also bei silikatischen Gläsern in Form von SiO_4 -Tetraedern. Im Quarzkristall existiert jedoch eine Fernanordnung, d.h. eine regelmäßige dreidimensionale Anordnung der Bausteine, wobei das Quarzglas hingegen ausschließlich über eine Nahanordnung in Form der Tetraeder verfügt. Die Tetraeder sind außerdem verzerrt und die Bindungswinkel und Abstände im Glas sind unregelmäßig.



Abb. 1: kristallines SiO_2 im Quarzkristall (links) und amorphes SiO_2 in Quarzglas (rechts).

Technischen Silikatgläsern werden Alkali- und Erdalkalioxide sowie Oxide von Nebengruppenelementen als so genannte Netzwerkwandler zugesetzt, die die Si-O-Si-Brücken an den Tetraedern auftrennen und die Eigenschaften des Glases beeinflussen (5).

Chemisch betrachtet ist amorphes Siliziumoxid reaktionsfähiger als Siliziumoxid in kristallinem Zustand. Es löst sich in alkalischen wässrigen Lösungen und besitzt eine geringe aber messbare Löslichkeit in Wasser (6). Glas kann geringe Mengen Wasser aufnehmen und bildet dabei eine mechanisch wie chemisch recht empfindliche Schicht, in der verschiedene Reaktionen ablaufen können. Das Wasser bricht dabei das Si-O-Si-Netzwerk an der Oberfläche auf, wodurch sich Silanolgruppen bilden können. Bei Raumtemperatur geschieht dies bereits durch Adsorption von Wasser aus der Umgebungsatmosphäre.



Abb. 2: Bildung von 2 Silanolgruppen nach Auflösung der Siloxanbindung.

Es ist anzunehmen, dass auch nach der Hydroxylierung neben den chemisorbierten OH-Gruppen noch Siloxangruppen auf der SiO_2 -Oberfläche vorhanden sind. Dabei ist die Packungsdichte der OH-Gruppen vom Verteilungszustand des Siliziumdioxids abhängig. Für amorphes SiO_2 mit einer Dichte von $2,2\text{g/cm}^3$ kann eine Oberflächenbedeckung von ca. 5 OH-Gruppen pro nm^2 angenommen werden (7).

2.3. Biomoleküle

Biomoleküle sind organische Substanzen, die in Lebewesen vorkommen und hauptsächlich aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen. Zu den Biomolekülen zählen sowohl kleinere Verbindungen wie Lipide, Hormone, Aminosäuren oder Vitamine, als auch große Moleküle wie Oligo- und Polysaccharide, Peptide oder Proteine. Zu Letzteren zählen auch die Lektine.

2.3.1. Lektine

Lektine sind komplexe Proteine oder Glycoproteide mit der Eigenschaft, bestimmte Mono- bzw. Oligosaccharide zu erkennen und diese spezifisch zu binden. Das Wort Lektin stammt vom lateinischen „legere“, welches „auswählen“ bedeutet. Nachdem man entdeckt hatte, dass Lektine teilweise in der Lage sind Blutzellen einer bestimmten Blutgruppe zu agglutinieren, wurde die Bezeichnung „Agglutinin“ eingeführt (8). Lektine kommen ubiquitär vor, jedoch sind sie häufig pflanzlichen Ursprungs.

Durch ihre Eigenschaft, spezifisch an verschiedene Zuckerstrukturen zu binden, sind Lektine in der Lage, auch spezifisch mit Zellen bzw. Zellmembranen zu interagieren und von dort aus biochemische Reaktionen auszulösen. Sie haben Einfluss auf das Immunsystem und auf verschiedene Stoffwechselvorgänge, wie z. B. die Zellteilung, die ribosomale Proteinbiosynthese oder die Agglutination von Zellen. Jedoch besitzen sie keine enzymatische Aktivität (9).

Im Rahmen einer üblichen Ernährung ist der menschliche Verdauungstrakt regelmäßig Lektinen ausgesetzt. Dabei sind Hülsenfrüchte (1-10g/kg) und Weizenkeime (0,1-0,5g/kg) die wesentlichen Lieferanten. Die tägliche Gesamtaufnahme an Lektinen beim Menschen beträgt durchschnittlich 0-300 mg/Tag bzw. 0-5 mg/kg Körpergewicht (10). Die meisten Lektine bleiben auch nach der Magen-Darm Passage noch vollständig aktiv. Sie werden weder durch Enzyme noch durch Darmbakterien zersetzt und sind somit fähig mit kohlenhydrathaltigen Darmkomponenten zu interagieren. Im Darm bietet sich eine Vielzahl von möglichen Interaktionen, da sowohl die Oberfläche der Epithelzellen als auch die Mucin-Schicht zahlreiche

Zuckerstrukturen beinhalten. Lektine können in geringen Mengen auch in die Blutbahn gelangen und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Immer wieder wird eine Beteiligung von Lektinen an bestimmten Erkrankungen diskutiert. Vermutet wird ein negativer Einfluss bei Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ II, Magen-Darm-Ulcera, Nierenerkrankungen und vor allem rheumatoider Arthritis (11). Diese Hypothesen sind jedoch nicht eindeutig wissenschaftlich untermauert, da keine experimentellen Daten aus Humanstudien vorliegen. Darüber hinaus sprechen auch mehrere Studien von einer protektiven Wirkung von Lektinen. So wurde im Rahmen einer Meta-Analyse belegt, dass das Krebsrisiko bei Personen mit hohem Vollkornverzehr im Vergleich zu jenen mit niedrigem bzw. keinem Verzehr von Vollkorn um etwa 33% verringert war (12). Weiters zeigten mehrere prospektive Studien, wie die Nurses-Health-Study oder die Iowa-Women-Health-Study, dass Vollkornverzehr in Zusammenhang mit einem niedrigeren Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Diabetes mellitus Typ II steht. In der Biotechnologie sind Lektine weit verbreitete Hilfsstoffe. Sie werden zur Isolierung von Glycoproteinen, Polysacchariden, Zellbestandteilen und zur Aufreinigung von rekombinanten Glycoproteinen eingesetzt. Einige Lektine kommen im Rahmen des tumorspezifischen drug targeting zur Anwendung, da sie in der Lage sind die veränderte Membranstruktur von Tumorzellen zu erkennen. Darüber hinaus kann man mit Hilfe von Lektinen bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente charakterisieren, sowie die verschiedenen Phasen des Zellzyklus und somit Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien markieren. Die pharmazeutische Grundlagenforschung macht sich diese Eigenschaften zu Nutze, um die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen. In diesem Zusammenhang kann z. B. Weizenkeimlektin (WGA) als zielerkennende Struktur in drug delivery Systemen eingesetzt werden.

2.3.2. WGA, wheat germ agglutinin, Weizenkeimlektin

Die genauere Untersuchung des Weizenkeimlektins begann im Jahr 1963 als Aub feststellte, dass Weizenlipase Tumorzellen agglutinieren kann. 1973 erfolgte dann erstmals die Reindarstellung von WGA durch konventionelle

sowie Affinitätschromatographische Methoden. WGA ist rein chemisch betrachtet ein dimeres, zuckerfreies Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 17,5 und 24 kDa. Das Protein besteht aus zwei identen Untereinheiten mit je 171 Aminosäuren, von denen jede fünfte Cystein ist. Allerdings liegen im gesamten Molekül keine freien SH-Gruppen vor.

Jedes WGA Molekül hat vier unabhängige Zuckerbindungsstellen, von denen aber nur zwei hochaffin sind. Mittels UV-Differenzspektroskopie und Fluoreszenzquenching wurde festgestellt, daß WGA spezifisch an N-Acetyl-D-Glucosamin bzw. dessen Oligosaccharide, wie z.B. N-Acetylchitotriose, bindet. Außerdem interagiert WGA mit Sialinsäure-Teilstrukturen (13).

WGA wird in vivo nicht durch luminale Hydrolasen abgebaut. Feuchte Hitze kann jedoch das WGA-Molekül größtenteils inaktivieren. Die mit der Nahrung aufgenommenen Mengen an Weizenlektin wirken auf den Menschen nicht toxisch. Derartige Effekte wurden erst bei einem Vielfachen der üblicherweise mit der Nahrung aufgenommenen Menge beobachtet (14). So schädigt WGA in extrem hohen Konzentrationen (500 mg/kg Körpergewicht) im Tierversuch reversibel die Darmwand. Vermutlich aufgrund der relativ geringen Mengen, wurden derartige Schäden beim Menschen trotz regelmäßiger physiologischer Lektinaufnahme nicht beobachtet.

In dieser Arbeit wurde Weizenlektin als Linker zwischen Substratunterlage und Zelloberfläche eingesetzt, um so die Adhäsion von Zellen auf weniger geeigneten Unterlagen zu erhöhen.

2.4. Albumine

Albumine sind globuläre Proteine, die eine molare Masse von etwa 66 kDa aufweisen. Sie sind von elliptischer Gestalt und bestehen aus mehr als 500 Aminosäuren.

Albumine kommen im menschlichen Organismus vor, wo sie vor allem für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks sorgen und als Transportproteine für wasserunlösliche Stoffe im Blut fungieren. Man findet sie aber auch in anderen Säugetieren und deren Produkten wie Milch (Laktalbumin) oder Eiern (Ovalbumin).

2.4.1. BSA, bovines Serumalbumin

BSA wird aus dem Serum von Rindern isoliert und gehört ebenfalls zur Gruppe der Albumine, die den größten Anteil der Serumproteine ausmachen. BSA wird häufig als Blockiersubstanz für immunologische Analysemethoden wie z.B. ELISA oder Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. Gerade in diesem Bereich zeichnet sich BSA durch seine Stabilität und Reaktionsträgheit aus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde BSA als Enzymstabilisator sowie als Blockiersubstanz verwendet.

2.5. Mucine

Mucine sind Glycoproteine, also Makromoleküle bestehend aus einer zentralen Proteinkette und Seitenketten aus Polysacchariden. Sie sind der strukturgebende Bestandteil des Schleims auf der Oberfläche von Schleimhäuten (Mucosa). Die wichtigste Aufgabe der Mucine besteht im Schutz der Schleimhaut vor chemischen, physikalischen oder mechanischen Reizen. Die in den nachfolgenden Versuchen eingesetzten Mikrotiterplatten wurden alle mit Mucin aus dem Schweinemagen (PGM, porcine gastric mucin) beschichtet, um WGA über die in PGM enthaltenen Sialinsäure-Teilstrukturen sowie N-Acetyl-D-Glucosamin spezifisch zu binden.

2.6. Antikörper und Antigene

Antikörper sind Glycoproteine aus der Klasse der Immunglobuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf Fremdstoffe (Antigene) gebildet werden. Jeder Antikörper ist Y-förmig und besteht aus vier Polypeptidketten: zwei identischen schweren Ketten (heavy chains) und zwei identischen leichten Ketten (light chains). Diese sind kovalent über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Es gibt fünf Typen von schweren Ketten, nämlich α -Ketten, γ -Ketten, δ -Ketten, ϵ -Ketten und μ -Ketten. Folglich gibt es auch fünf Klassen von Antikörpern, nämlich IgA, IgG, IgD, IgE und IgM.

Die Antikörperbildung basiert auf der humoralen Immunantwort eines Organismus bei Kontakt mit einem Antigen. Dabei induzieren antigene

Determinanten (Epitope) des körperfremden Stoffes die Antikörpersynthese. Jede dieser Determinanten induziert die Differenzierung spezifischer B-Lymphozyten und die Bildung Antikörper-sezernierender Plasmazellen und damit die Ausschüttung von Antikörpern mit variierender biologischer Aktivität, Spezifität und Affinität. Hierbei handelt es sich nun um ein polyklonales Antiserum.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper beruht auf der Hybridoma-Technik. Dabei werden die antikörperbildenden B-Lymphocyten nach der Immunisierung in der Regel aus der Milz von Mäusen isoliert. Da B-Lymphocyten in vitro nur eine geringe Wachstumskapazität zeigen, werden sie mit Myelomzellen fusioniert. Myelomzellen können zwar keine Antikörper bilden, haben aber die Eigenschaft der „unbegrenzten“ Teilbarkeit und damit des steten Wachstums durch Teilung. Durch Fusion dieser beiden Zelltypen entsteht eine so genannte „Hybridomazelle“, die beide Fähigkeiten, stete Teilung und Antikörpersynthese, in sich vereinigt. Die durch Hybridisierung entstandenen Klone, sind von Natur aus homogen. Das bedeutet, dass jeder Klon nur Immunglobuline mit gleicher molekularer Struktur und antigener Spezifität sezerniert. Die so entstandenen Immunglobuline werden als monoklonale Antikörper bezeichnet (15).

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper vom IgG-Typ verwendet, wobei der Primärantikörper (anti-WGA, developed in goat) monoklonal und der Sekundärantikörper (rabbit-anti-goat) polyklonal war.

2.7. Immunoassays (IA)

Ein Immunoassay ist ein Verfahren, bei dem mittels einer immunologischen Reaktion verschiedenste biologische Moleküle qualitativ und quantitativ erfasst werden können. Das Prinzip einer solchen Reaktion beruht auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, d.h. auf der Fähigkeit der Antikörper spezifisch Antigene zu erkennen und mit ihnen eine Bindung einzugehen, die in eine messbare Größe umgesetzt werden kann. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, entweder das Antigen oder den Antikörper in vitro zu bestimmen.

Üblich sind Testformate mit markierten Komponenten, d.h. je nach Detektionsprinzip werden die eingesetzten Immunreaktanden entsprechend markiert und nachgewiesen. Beispielsweise bei Radioimmunoassays (RIA) mit radioaktiven Isotopen und bei Enzymimmunoassays (EIA) mit Enzymen. Grundsätzlich unterscheidet man dabei zwischen homogenen und heterogenen Immunoassays, wobei die heterogenen Methoden einen Trennschritt von antikörpergebundenem und freiem Material erfordern. Obgleich hier ein zusätzlicher Arbeitsschritt benötigt wird, weist diese Technik wesentliche Vorteile auf, denn sie ermöglicht die Detektion von kleinen und großen Molekülen, die Abtrennung störender Substanzen, den Einsatz größerer Probenvolumina und somit eine Steigerung der Empfindlichkeit. Ferner werden heterogene Immunoassays in kompetitive und nicht-kompetitive Testprinzipien unterteilt.

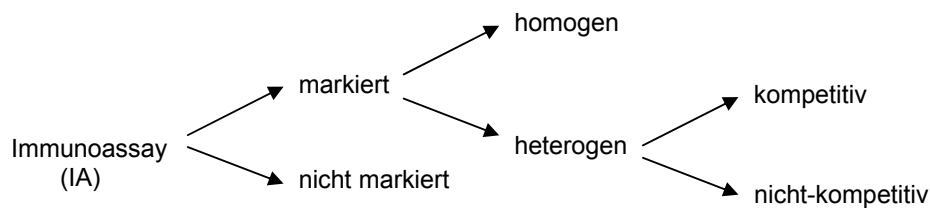


Abb. 3: Einteilung verschiedener Immunoassays.

Bei einem Enzymimmunoassay (EIA) wird das Ausmaß der Antigen-Antikörper-Reaktion durch den Substratumsatz eines Markerenzym (Tracer) über gefärbte Produkte angezeigt. Kompetitive Testprinzipien beruhen dabei auf dem Prinzip der Signalabschwächung, hervorgerufen durch die konkurrenzbedingte Verdrängung des enzymmarkierten Antigens von der Bindungsstelle des Antikörpers durch das zu bestimmende Antigen. Die resultierende Farbintensität ist somit indirekt proportional zur Konzentration dieses Antigens. Bei den nicht-kompetitiven bzw. immunometrischen Verfahren kommt es zu einer Signalverstärkung bei Konzentrationszunahme des zu messenden Antigens. Die Farbintensität ist in diesem Fall der Antigenkonzentration direkt proportional. Demzufolge spricht man auch von einem direkten Immunoassay, da direkt die Bindung an das Antigen und

nicht die Bindung in Konkurrenz zu einer markierten Substanz gemessen wird.

2.7.1. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine spezielle Variante des Enzymimmunoassays. Grundsätzlich ermöglicht dabei die Kombination dreier chemisch-physikalischer Prozesse den immunologischen Nachweis:

1. Spezifische Interaktion von Antigen und Antikörper
2. Adsorption von Antikörper oder Antigen an eine Festphase
3. Enzymatische Nachweisreaktion

Dabei werden mit Hilfe enzymmarkierter Antigene die entsprechenden Antikörper bzw. im umgekehrten Fall die jeweiligen Antigene nachgewiesen.

Ein ELISA ist eine Analysemethode mit sehr hoher Spezifität, die eine Untersuchung einer großen Anzahl von Proben in relativ kurzer Zeit ermöglicht. Außerdem können aufgrund der hohen Affinität zwischen Antikörper und Antigen auch sehr geringe Mengen (ng-pg/ml) nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann auch in Gegenwart vieler ähnlicher Molekülen ein Antigen immer noch ganz selektiv bestimmt werden. Andere Methoden sind hier meist schon limitiert.

Der Testaufbau hängt davon ab, in welcher Menge und in welchem Reinheitsgrad die einzelnen Reaktanden zur Verfügung stehen und welche Sensitivität erreicht werden soll.

Das Testprinzip kann sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv sein.

2.7.1.1. Testprinzipien verschiedener ELISA-Systeme

Nicht-kompetitiver ELISA

Bei diesem Einschritt-Assay werden die Antigene der zu untersuchenden Probe an einer Oberfläche immobilisiert und anschließend der Überschuss „weggewaschen“. Folglich werden zu dem zu bestimmenden Antigen spezifische, enzymmarkierte Antikörper zugegeben. Die an die Antikörper gebundenen Enzyme werden mit einer Substrat-Chromogen Lösung versetzt

wobei es zu einer messbaren Reaktion kommt, deren Signal direkt proportional der Antigenkonzentration in der Probe ist.

Diese Reaktion kann im umgekehrten Fall zum Antikörpernachweis herangezogen werden: die zu untersuchende Probe wird zur Bindung der Antikörper an die Oberfläche inkubiert und anschließend mit enzymmarkierten spezifischen Antigenen detektiert.

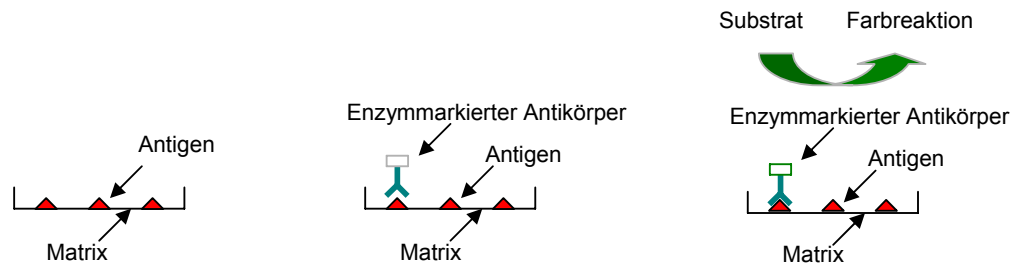


Abb. 4: Schema eines nicht-kompetitiven ELISA.

Kompetitiver ELISA

Das Prinzip des kompetitiven ELISA beruht auf einer Signalabschwächung. Analog dem nicht-kompetitiven ELISA handelt es sich auch bei dieser Methode um einen Einschritt-Assay, wobei der Antikörper zuvor an einer Oberfläche immobilisiert werden muss. Danach wird mit den nachzuweisenden Antigenen aus der Probe sowie mit spezifischen, enzymmarkierten Antigenen inkubiert. In einer „kompetitiven“ Verdrängungsreaktion konkurrieren die enzymmarkierten Antigene mit den Antigenen der Probe um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Der nicht gebundene Anteil der Antigene wird sodann durch Waschen entfernt. Es kommt hier also zu einer Signalabschwächung, wobei das gemessene Signal indirekt proportional der Antigenkonzentration der Probe ist.

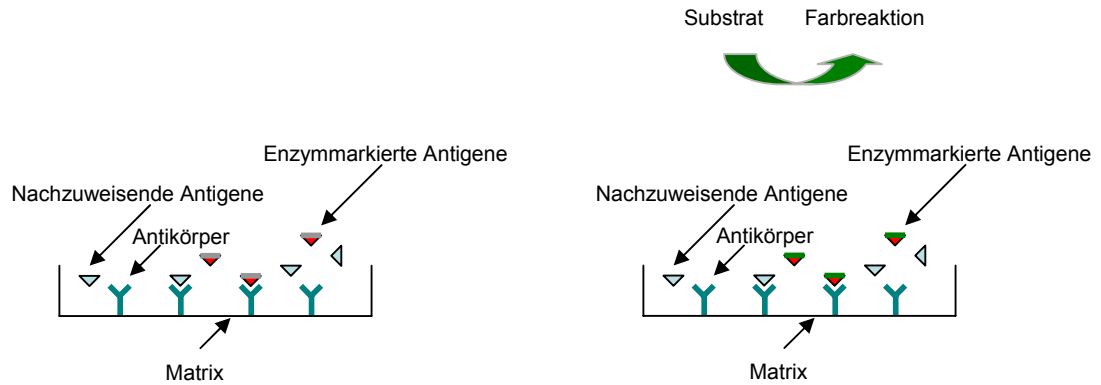


Abb. 5: Schema eines kompetitiven ELISA.

Sandwich-ELISA

Im Unterschied zu den beiden vorher beschriebenen Methoden handelt es sich hier um ein Zweischnitt-Assay. Zu den zuvor fix immobilisierten, spezifischen Antikörpern wird die Probe mit den zu bestimmenden Antigenen zugesetzt. Nach Abtrennen überschüssiger Antigene werden nun spezifische, enzymmarkierte Antikörper zugesetzt. In diesem Fall ist das gemessene Signal wieder direkt proportional der Antigenkonzentration der Probe.

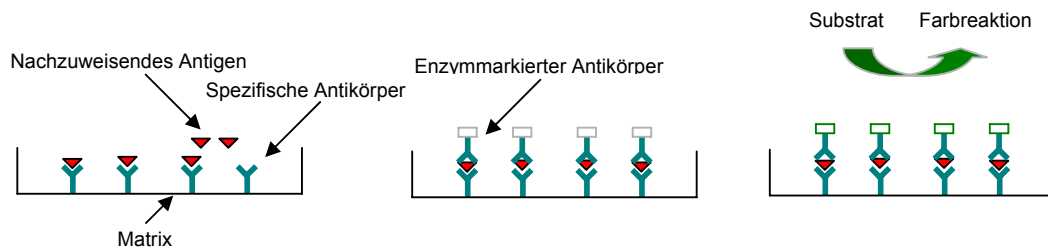


Abb. 6: Schema eines ELISA mit Sandwich-Aufbau.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifizierter Sandwich-ELISA angewandt, um WGA quantitativ nachzuweisen.

3. MATERIALIEN, GERÄTE UND METHODEN

3.1. Materialien

Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten sind speziell für Untersuchungen an Biomolekülen geeignet. Sie werden aus verschiedenen Materialien hergestellt, sind mit unterschiedlichen well-Größen erhältlich und erlauben eine automatische Auswertung. Weiters sind sie leicht handzuhaben und bieten die Möglichkeit eine große Probenanzahl gleichzeitig zu bearbeiten. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden ELISA-Platten mit großer Protein-Bindungskapazität (Greiner, ELISA-plate high protein binding, 96 well, flat-bottomed) verwendet. Ein well, d.h. eine Vertiefung der Mikrotiterplatte, umfasst dabei ein Volumen von ca. 200µl. Das nachzuweisende WGA-Molekül wurde auf solchen Platten über eine Mucinschicht immobilisiert, wobei das entsprechende ELISA-Testsystem in der Literatur beschrieben ist (4).

Flexiperm®-System

Die Immobilisierung von WGA auf Glasobjektträgern wurde mit Hilfe des Flexiperm®-Systems durchgeführt. Flexiperm® ist eine flexible Zellkulturkammer, die in Kombination mit einem Objektträger diesen in einzelne Wachstumsflächen unterteilt. Flexiperm® besteht aus Silikon, ist autoklavierbar und wieder verwendbar. Eine hoch adhäsive Unterseite ermöglicht die Anheftung auf allen glatten Oberflächen ohne Verwendung von Klebstoff. Es ist aber auch genauso leicht wieder abzulösen. Das Volumen eines auf diese Weise entstehenden wells beträgt ebenso ca. 200µl. Vor der Verwendung wurde Flexiperm® ca. eine Stunde lang in destilliertem Wasser gekocht, danach luftgetrocknet und für zwei Stunden in 70%igem Ethanol gelagert. Anschließend wurde Flexiperm® mit 96%igem Alkohol gewaschen und erneut luftgetrocknet.

Eine direkte photometrische Messung ist mit dem Flexiperm®-System nicht möglich, daher wurde der in den wells befindliche Überstand vor der Analyse in entsprechende wells einer Mikrotiterplatte überführt.

Glaströge

Zur Derivatisierung der Oberfläche von Glasobjektträgern wurden spezielle Assistent®-Objektträgerkästen nach Schiefferdecker und Hellendahl eingesetzt.

3.2 Geräte

Trockenschrank

Ein Trockenschrank dient in der Naturwissenschaft zum Trocknen von Chemikalien und Geräten, sowie als Umluftgerät, mit dem die Umgebungsbedingungen hinsichtlich der Temperatur kontrolliert und konstant gehalten werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Inkubation mit WGA bzw. für die Inkubation mit den Antikörpern ein Trockenschrank bei exakt 37°C genutzt.

ELISA-Reader

Ein ELISA-Reader ist ein speziell zur Messung in Mikrotiterplatten entwickeltes Photometer. Die Absorptionswerte von mehreren Proben können dabei innerhalb weniger Sekunden gleichzeitig ermittelt werden.

Alle photometrischen Analysen wurden mit einem Anthos ELISA-Reader 2001, FRESENIUS, Austria, durchgeführt.

3.3. Spektroskopische Methoden

Spektroskopische Analysemethoden nutzen die Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und den Atomen oder Molekülen einer Probe. Das Elektronensystem eines Moleküls hat einen bestimmten Energiezustand. Normalerweise befindet sich das Molekül im stabilsten, energetisch niedrigsten Zustand, dem sogenannten Grundzustand. Durch Zufuhr elektromagnetischer Strahlung geht das Molekül in einen angeregten Zustand über. Nach kurzer Zeit kehrt das System vom höheren Energieniveau wieder in den Grundzustand zurück, wobei die aufgenommene Energie in Form von Wärme oder Strahlung abgegeben wird. Entweder wird das Ausmaß der Energieaufnahme oder Absorption in Form

von Absorptionsspektren gemessen oder, wenn das System über Strahlungsemission in den Grundzustand übergeht, so kann auch die Abgabe dieser Strahlung bestimmt werden, wodurch man Emissionsspektren erhält. Die UV-Vis Spektroskopie gehört zu den absorptionsspektroskopischen Methoden.

3.3.1. UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektroskopie ist ein Verfahren der optischen Spektroskopie, das auf der spezifischen Absorption von ultravioletter oder sichtbarer Strahlung durch sogenannte Chromophore in organischen oder anorganischen Verbindungen beruht. Der Bereich der UV-Spektren erstreckt sich von 190 bis ca. 400nm und jener der Vis-Spektren von ca. 400 bis 800nm. Aufgrund der Gültigkeit des Lambert–Beer'schen Gesetzes kann diese Methode zur quantitativen Bestimmung UV-Vis-aktiver Verbindungen eingesetzt werden. Dabei wird eine verdünnte Lösung einer Substanz mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt. Durch diese Einstrahlung von Licht wird den Elektronen in der Lösung Energie zugeführt, wodurch sie auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Dieser Vorgang wird als Exzitation bezeichnet. Die dabei aufgenommene Energie ist mit der Absorptionsfrequenz bzw. der Absorptionswellenlänge verknüpft. Dieser angeregte Zustand ist jedoch sehr instabil und die Elektronen kehren nach kurzer Zeit auf ihre ursprünglichen Energieniveaus zurück. Bestimmte Elektronen lassen sich dabei nur von bestimmten Wellenlängen anregen. Aus diesem Grund ist es notwendig, vor der Messung die Absorptionsmaxima der Substanzen zu kennen. Hierfür wird die Substanz mit Licht zunehmender Wellenlänge bestrahlt und die absorbierte Energiemenge wird dann in Abhängigkeit von der jeweiligen Wellenlänge in einer Graphik dargestellt. Daraus lässt sich jene Wellenlänge bestimmen, bei der das Absorptionsmaximum der Substanz liegt. Die Lage der jeweiligen Absorptionsmaxima ist von der Struktur der Verbindung abhängig. Die photometrische Analyse sollte dann bei ebendieser Wellenlänge erfolgen.

Für die Bestimmung der Absorption wird die Intensität des Lichtstrahles vor und nach der Probe gemessen, wobei als Maßzahl entweder die Transmission oder die Extinktion angegeben werden kann.

Das Ausmaß der absorbierten Lichtintensität ist nach dem Lambert–Beer’schen Gesetz proportional der Konzentration der Substanz in der Lösung.

Die Konzentrationsbestimmungen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe einer Eichgerade durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgerade werden die Extinktionen von Proben mit unterschiedlichen, aber bekannten Konzentrationen analysiert. Die einzelnen Messpunkte werden dann in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen und somit der Konzentrationsbereich bestimmt, bei dem ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Anhand dieser Eichgerade können dann unbekannte Konzentrationen der Substanz ermittelt werden.

3.4. Pufferlösungen

0,003M PBS Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,2

CaCl_2 -Stammlösung 50,0ml

KCl 0,2g

KH_2PO_4 0,2g

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,1g

NaCl 8,0g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,764g

Aqua dest. ad 1000ml

Die Salze werden in 950ml destilliertem Wasser nacheinander gelöst. Zum Schluss werden 50ml CaCl_2 -Stammlösung zugesetzt.

CaCl_2 -Stammlösung: 2,65g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 1000ml destilliertem Wasser.

0,1M Zitronensäure/Dihydrogenphosphat Puffer, pH 4,0

Es wird zunächst eine 0,1M Natrium-Dihydrogenphosphat-Lösung in destilliertem Wasser hergestellt (15,601g NaH_2PO_4 /1000ml H_2O). Unter Kontrolle des pH-Wertes wird anschließend so lange 0,1M

Zitronensäurelösung (21,04g Zitronensäure/ 1000ml H₂O) zugesetzt, bis ein pH-Wert von 4,0 erreicht ist.

0,5M NaCO₃/NaHCO₃ Puffer pH 9,0

Die entsprechende Menge an NaCO₃ bzw. NaHCO₃ wird in jeweils 1000ml destilliertem Wasser gelöst. Eine der beiden Lösungen wird vorgelegt und mit einer entsprechenden Menge der anderen Lösung versetzt, so dass der pH-Wert des Puffers anschließend bei 9,0 liegt.

3.5. Antikörper-Lösungen

Primärantikörper

Anti-WGA-Antikörper, IgG, entwickelt in der Ziege, monoklonal von Firma Dako.

1:2000 in 0,1% BSA Lösung.

Sekundärantikörper

Anti-goat-Antikörper, IgG, entwickelt im Hasen, markiert mit Peroxidase, polyklonal von Firma Dako.

1:5000 in 0,1% BSA Lösung.

BSA-Lösung

BSA-Lösungen wurden in der vorliegenden Arbeit in Konzentrationen von 0,1% zur Antikörperverschüttung bzw. von 0,01% zur Absättigung der modifizierten Oberflächen verwendet. Die entsprechende Menge an BSA wird dazu in PBS Puffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gelöst.

Glycin-Lösung

Zur Absättigung der modifizierten Oberflächen wurde neben der BSA-Lösung weiters eine 5%ige Glycinlösung verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Glycin in 0,5M NaCO₃/NaHCO₃ Puffer pH 9,0 gelöst.

3.6. Substratlösungen

ABTS, 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)

Das Substrat wird stets frisch, kurz vor Gebrauch unter Lichtschutz zubereitet:

4mg ABTS werden in 10ml 0,1M Zitronensäure-Dihydrogenphosphatpuffer gelöst. Unmittelbar vor dem Einsatz der Substratlösung werden noch 10µl einer 0,3%igen H₂O₂-Lösung zugesetzt.

TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Einsatz der gebrauchsfertigen Lösung.

4. SPEZIELLER TEIL

4.1. Modifizierung von Glasoberflächen

Aufgrund der freien Silanolgruppen sollten Glasobjektträger für eine chemische Derivatisierung ihrer Oberfläche und somit auch für eine kovalente Immobilisierung von Biomolekülen geeignet sein.

Für die Oberflächenmodifizierung wurden Objektträger aus Sodakalkglas, der hydrolytischen Klasse 3 der Norm ISO 8037/1 entsprechend (Firma Marienfeld), verwendet. Es handelt sich hierbei um Objektträger mit geschnittenen Kanten in einer Größe von 76mm x 26mm x 1mm, mit einem 20mm breiten, matten Rand.

4.1.1. Vorbehandlung der Objektträger

Vor der eigentlichen Funktionalisierung müssen die Objektträger vorbehandelt werden, um Verunreinigungen von der Glasoberfläche zu entfernen, da diese die Zugänglichkeit der Silanolgruppen beeinträchtigen können (16). Auf diese Weise sollen Verunreinigungen, wie z.B. adsorbierte Kohlenwasserstoffe aus der Luft, so gut wie möglich entfernt werden. Hierzu hat sich die Anwendung der so genannten „Piranha“-Lösung bewährt. „Piranha“-Lösung besteht aus konzentrierter H_2SO_4 und 30%igem H_2O_2 in einem Mischungsverhältnis von 7:3 (17). Die Behandlung mit Säure hat darüber hinaus den Vorteil, dass vorhandene Alkalimetallionen an der Glasoberfläche gegen Protonen ausgetauscht werden und damit die Anzahl an Silanolgruppen erhöht wird (13). Nach der Behandlung mit „Piranha“-Lösung sollte die Glasoberfläche viele polare und geladene Gruppen aufweisen und somit sehr hydrophil sein. Durch diese Behandlung wird das Glas quasi „veredelt“ und eine Oberfläche geschaffen, die vom Siliziumoxidverhältnis her annähernd der theoretischen Zusammensetzung von Quarzglas entspricht (18).

Praktische Durchführung der Vorbehandlung

Um die Glasobjektträger zu reinigen, werden diese mindestens 2 Stunden lang in „Piranha“-Lösung gelagert. Danach werden sie gründlich mit destilliertem Wasser und anschließend mit 70%igem Ethanol gespült und an der Luft getrocknet.

4.1.2. Funktionalisierung der Glasobjektträger

Ein bekanntes Verfahren zur Funktionalisierung von anorganischen, hydroxylgruppenhaltigen Oberflächen ist die Silanisierung (19, 20). Meist werden dazu Chlor- bzw. Alkoxysilane verwendet. Zur Funktionalisierung der Glasobjektträger wurden in der vorliegenden Diplomarbeit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) bzw. 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTS) verwendet.

4.1.2.1. Silanisierung mit APTES

Die APTES Silanisierung (3) wurde mit kommerziell erhältlichem 3-Aminopropyltriethoxysilan vorgenommen, um Aminogruppen an der Glasoberfläche zu generieren. Dieses Silan-Molekül besitzt eine fix an das Siliziumatom gebundene Aminopropylgruppe und drei Ethoxyreste, die als Abgangsgruppen dienen. Die Silanisierungsreaktion kann entweder in wässriger Lösung oder in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Silanisierung im wässrigem Milieu führt zu stabileren Produkten, eine Silanisierung in organischen Lösungsmitteln hingegen liefert höhere Ausbeuten an Aminogruppen an der Glasoberfläche (15). Im Idealfall entsteht bei der organischen Silanisierung eine gleichmäßige, monomolekulare Polysiloxanschicht. Diese monomolekulare APTES-Schicht enthält ca. ein APTES-Molekül pro nm^2 und damit auch eine Aminogruppe pro nm^2 . Aus diesem Grund wurde die APTES Silanisierung im organischen Milieu durchgeführt.

Praktische Durchführung der Silanisierung mit APTES

Die Silanisierung erfolgt in einem Assistent®-Objektträgerkasten. Dazu werden 100ml einer 10%igen APTES-Lösung in Toluol benötigt, die stets frisch herzustellen ist. Die Silanisierung wird bei 40°C im Trockenschrank über einen Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt. Anschließend werden die Objektträger mit Toluol gewaschen, um nicht gebundenes Silan zu entfernen, und an der Luft getrocknet. Um die Silanschicht einzubrennen, werden die Objektträger anschließend 2 Stunden lang in einem Trockenschrank auf 120°C erhitzt. Durch dieses Einbrennen wird auch das bis dahin nur adsorptiv gebundene Silan mit der Oberfläche und benachbarten APTES-Molekülen unter Ethanol-Freisetzung vernetzt.

4.1.2.2. Silanisierung mit GPTS

Um die Glasoberfläche mit Epoxygruppen auszustatten, wurde das kommerziell erhältliche 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan als Silanisierungsreagens gewählt (3). Dieses Alkyltrimethoxysilan enthält eine fest an das Siliziumatom gebundene Glycidoxypropylgruppe und drei Methoxyreste, die als Abgangsgruppen fungieren. Die Silanisierung mit GPTS kann ebenfalls auf verschiedene Arten ausgeführt werden, wie z.B. in organischen Lösungsmitteln oder im alkoholisch-wässrigen Milieu.

Für die vorliegende Diplomarbeit wurde eine 10%ige Lösung von GPTS in einer Ethanol/Wasser/Diisopropylethylamin (DIPEA)-Mischung verwendet. Durch Zusatz von DIPEA erhält die Lösung einen pH-Wert im alkalischen Bereich, der die Kondensation zwischen Silan- und Silanolgruppen ermöglicht. Das Verhältnis Ethanol/Wasser/DIPEA/GPTS wurde mit 84:5:1:10 gewählt.

Praktische Durchführung der Silanisierung mit GPTS

Die Silanisierung wird in einem Assistent®-Objektträgerkasten mit 100ml einer 10%igen GPTS-Lösung durchgeführt. Die entsprechende GPTS-Lösung wird immer frisch, im Mischungsverhältnis 84:5:1:10 (v/v/v/v; Ethanol/Wasser/DIPEA/GPTS) hergestellt. Die Silanisierung erfolgt bei 75°C im Trockenschrank über einen Zeitraum von 4 Stunden. Nach Ende der

Reaktionszeit werden die Objektträger mit Isopropanol abgespült, um nicht gebundenes Silan zu entfernen, und an der Luft getrocknet. Danach wird die Silanschicht 2 Stunden lang bei 120°C im Trockenschrank eingebrannt.

Eine Aktivierung von mit GPTS modifizierten Glasobjektträgern ist nicht notwendig, da Epoxygruppen eine ausreichende Reaktivität für die Bindung von Proteinen aufweisen.

4.2. Kopplung von WGA an die Glasoberfläche

4.2.1. Aktivierung der mit APTES modifizierten Glasoberflächen

Um eine nachfolgende Kopplung von Proteinen zu ermöglichen, müssen die Aminogruppen an den mit APTES modifizierten Objektträgern zuerst aktiviert werden. Hier scheint ein Dialdehyd die geeignete Wahl zu sein, da es einerseits mit den oberflächengebundenen Aminogruppen reagiert und andererseits durch die danach noch freie Aldehydfunktion in der Lage ist, an Aminogruppen des Proteins zu binden. Gleichzeitig fungiert das Dialdehyd als bewegliches Spacer-Molekül zwischen den Silanmolekülen an der Glasoberfläche und den freien Aminogruppen des Proteins. Eine andere Möglichkeit, die freien Aminogruppen von APTES zu aktivieren, besteht im Einsatz von p-Chloranil.

Aktivierung mit Glutardialdehyd

Für die Aktivierung wurde Glutardialdehyd eingesetzt, wobei in der Literatur hierzu zwei unterschiedliche Methoden beschrieben sind (15). Für die Reaktion mit Aldehyden müssen die Aminogruppen außerdem in nicht protonierter Form vorliegen, weshalb für beide Aktivierungsmethoden ein basischer pH-Wert gewählt wurde.

Methode 1

Pro well eines mit APTES modifizierten Objektträgers (Fexiperm®-System) werden 100µl einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung in 0,1M Hepes/NaOH-Puffer pH 8,5 zugesetzt und 15 Minuten lang bei 50°C im Trockenschrank

inkubiert. Anschließend wird die Aktivierungslösung abgesaugt und die einzelnen wells dreimal mit je 100µl Hepes/NaOH-Puffer pH 8,5 gewaschen.

Methode 2

Für diese Art der Aktivierung wird eine 2,5%ige Glutardialdehydlösung in 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,0 eingesetzt. Die Objektträger werden in diesem Fall 2 Stunden lang bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln aktiviert. Anschließend wird die Glutardialdehydlösung abgesaugt und die wells dreimal mit je 200µl 100mM Hydrogenphosphat/Dihydrogenphosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen.

Für die Aktivierung der APTES-modifizierten Oberflächen wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit Methode 2 gewählt und modifiziert:

Pro well wurden 150µl einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung in 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,0 zugesetzt und 2,5 Stunden lang auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Reaktion wurde die Aktivierungslösung abgesaugt und die einzelnen wells mit je 200µl 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,0 dreimal gewaschen. Für den Waschpuffer wurde pH 9,0 gewählt, weil ein basischer pH Wert eine Grundvoraussetzung für eine kovalente Immobilisierung von Proteinen nach Aktivierung mit Glutardialdehyd darstellt.

Aktivierung mit p-Chloranil

Als Alternative zum Dialdehyd wurde in der vorliegenden Arbeit auch p-Chloranil (Tetrachlor-p-Benzochinon) zur Aktivierung der Aminogruppen verwendet:

Dazu wurden pro well 150µl einer 1%igen p-Chloranil-Lösung in Toluol eingesetzt und 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die p-Chloranil-Lösung abgesaugt und die Objektträger an der Luft getrocknet. Abschließend wurde ebenfalls mit je 200µl 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,0 pro well gewaschen.

4.2.2. Immobilisierung von Weizenkeimlektin

Die aktivierten APTES sowie die GPTS Glasoberflächen sollten in der Lage sein, Proteine wie WGA kovalent zu binden (15).

Für diese Kopplung des Proteins wurden unterschiedliche Konzentrationen an Weizenkeimlektin in PBS Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,2 im Bereich zwischen 0,01% und 0,000025% hergestellt. Davon wurden für die Kopplung jeweils 50µl pro well eingesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die gesamte Bodenfläche der einzelnen wells ausreichend bedeckt ist. Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Um WGA möglichst quantitativ zu immobilisieren, wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt. Diese betrugen einerseits 2 Stunden und andererseits 12 Stunden. Nach dieser Inkubation wurde die Proteinlösung abgesaugt und die einzelnen wells dreimal mit je 200µl 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,0 gewaschen.

Abschließend wurden eventuell noch freie Bindungsstellen an der Oberfläche blockiert, wobei hierfür unterschiedliche Substanzen zum Einsatz kamen: 0,01%ige BSA-Lösung, 5%ige Glycin-Lösung, einerseits einzeln aber auch in Kombination. Zusätzlich wurde auch die Dauer der Absättigung variiert. Sie betrug 2 Stunden bzw. 12 Stunden.

4.3. Nachweis von immobilisiertem WGA mittels ELISA

Um das immobilisierte Protein quantitativ erfassen zu können und darüber hinaus die Verbesserungen der einzelnen Modifizierungsvarianten der Glasoberfläche besser beurteilen zu können, wurde eine geeignete Methode zur Bestimmung des Weizenlektins aus der Literatur eingesetzt (4). Hierbei handelt es sich um ein ELISA-Testsystem im Mikrotiterplatten-Format, dessen Protokoll schrittweise auf Weizenkeimlektin abgestimmt und optimiert wurde. Das WGA-Molekül wird dabei als Antigen an eine entsprechend modifizierte Oberfläche gebunden und dann mittels Sandwich-ELISA erfasst. Der exakte Ablauf dieser Methode und deren Modifikation zur Anpassung des Testsystems an die Glasobjektträger ist in den nachfolgenden Kapiteln (4.3.1. und 4.3.2.) im Detail beschrieben.

4.3.1. WGA-Immobilisierung auf Mikrotiterplatten (4)

Will man eine direkte Plattenbeschichtung durchführen, so erfolgt dies üblicherweise durch unmittelbare Bindung der jeweiligen Targetmoleküle an das Trägermaterial. Wenn aber das Antigen, wie z.B. bei WGA, nur spärlich an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert, sollte eine indirekte Beschichtung über „Brückenmoleküle“ eingesetzt werden.

Beschichtung von 96-well-Mikrotiterplatten

Zur indirekten Beschichtung der ELISA-Platten mit WGA wird zunächst Mucin aus dem Schweinemagen (PGM, porcine gastric mucin) an die Plattenwand gebunden, da es freie Sialinsäure-Strukturen enthält. Im zweiten Schritt wird an dieser Mucinschicht WGA spezifisch immobilisiert. PGM wird in einer Konzentration von 2µg/ml in PBS-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,2 zu je 100µl pro well eingesetzt. Nach Inkubation über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 4°C werden die Platten entleert und luftgetrocknet. Anschließend müssen noch vorhandene, freie Bindungsstellen auf den ELISA-Platten abgesättigt werden, um den Immunreaktanden die Möglichkeit zu nehmen, unspezifisch an die Platte zu binden. Dazu wird ein Protein verwendet, das keine Kreuzreaktivität mit dem Antigen bzw. Antikörper aufweist. Hierfür eignet sich z.B. BSA, das in der vorliegenden Arbeit in Form einer 0,1%igen Lösung zu 100µl pro well eingesetzt wurde. Für die Blockierung werden die Platten 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut getrocknet. Mucin-beschichtete ELISA-Platten sind ca. 1-2 Wochen im Kühlschrank bei 4°C haltbar.

Immobilisierung von WGA auf Mucin-beschichteten ELISA-Platten

Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen wurde in PBS gelöstes WGA im Konzentrationsbereich zwischen 0,005-1µg/ml auf die Platte aufgetragen. Hierzu wird jedes well mit 50µl der jeweiligen WGA-Verdünnung 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Überschüssiges Weizenkeimlektin wird anschließend durch dreifaches Spülen mit PBS-Puffer zu je 100µl pro well entfernt.

4.3.2. Quantitative Bestimmung von WGA (4)

Für die Quantifizierung des Lektins werden die so beschichteten Platten nun mit einem monoklonalen anti-WGA-Antikörpers eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Dieser Primärantikörper wird in einem Verhältnis von 1:2000 in 0,1% BSA-Lösung in PBS verdünnt und zu je 50µl pro well verwendet. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wird durch dreifaches Spülen mit PBS-Puffer entfernt.

Ein mit Peroxidase markierter Sekundärantikörper wird zunächst 1:5000 in 0,1% BSA-Lösung in PBS verdünnt und die einzelnen zuvor mit Primärantikörper behandelten wells mit je 50µl 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers, wobei die Menge an gebundenem Sekundärantikörper und damit die Menge an Enzym proportional zur Menge an gebundenem Primärantikörper ist. Überschüssiges, nicht gebundenes Antikörper-Enzym-Konjugat wird durch drei weitere Waschschrte mit PBS-Puffer entfernt.

Das so an die Mikrotiterplatte gebundene Enzym wird nun mit einem Färbereagenz umgesetzt, wobei erneut die Intensität der entstehenden Farbe dem gebundenen Enzym und somit dem gebundenen Antigen (WGA) proportional ist. Dazu wird das peroxidaseempfindliche Substrat ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic-acid]diammonium salt, siehe Punkt 3.6.) zu je 100µl pro well zugesetzt. Wasserstoffperoxid wird der Substratlösung dabei erst unmittelbar vor Verwendung zugesetzt, um die Spaltung des Farbstoffes ABTS durch die Peroxidase zu ermöglichen.

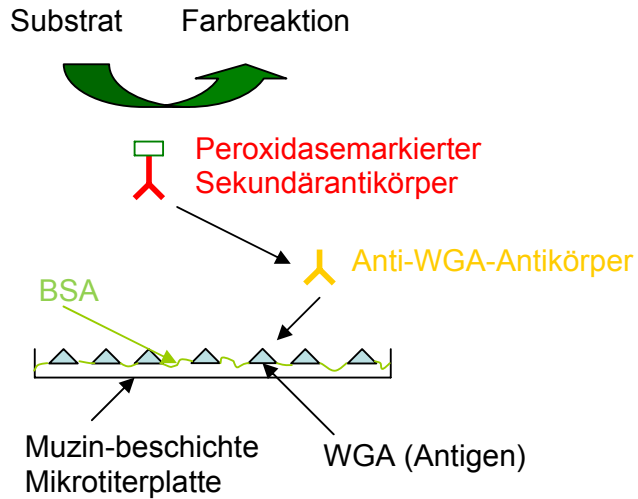


Abb. 7: Versuchsaufbau des WGA-ELISA.

Für diesen Substratumsatz werden die Mikrotiterplatten 20 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert, wobei die Peroxidase die Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Wasserstoffperoxid katalysiert. Diese Reduktionsäquivalente werden von ABTS bereitgestellt, das dabei in die grün gefärbte, oxidierte Form übergeht. Nach Ablauf der 20 Minuten kann diese Reaktion durch Senken des pH-Wertes mittels 1N H_2SO_4 gestoppt werden.

Die Bestimmung der Extinktion erfolgt anschließend bei 405nm in einem ELISA-Reader. Die Konzentration des Antigens kann danach über eine Eichgerade ermittelt werden. Abb. 8 zeigt die für die Bestimmung von WGA über ELISA verwendete Eichgerade und gibt auch die eingesetzte Geradengleichung an.

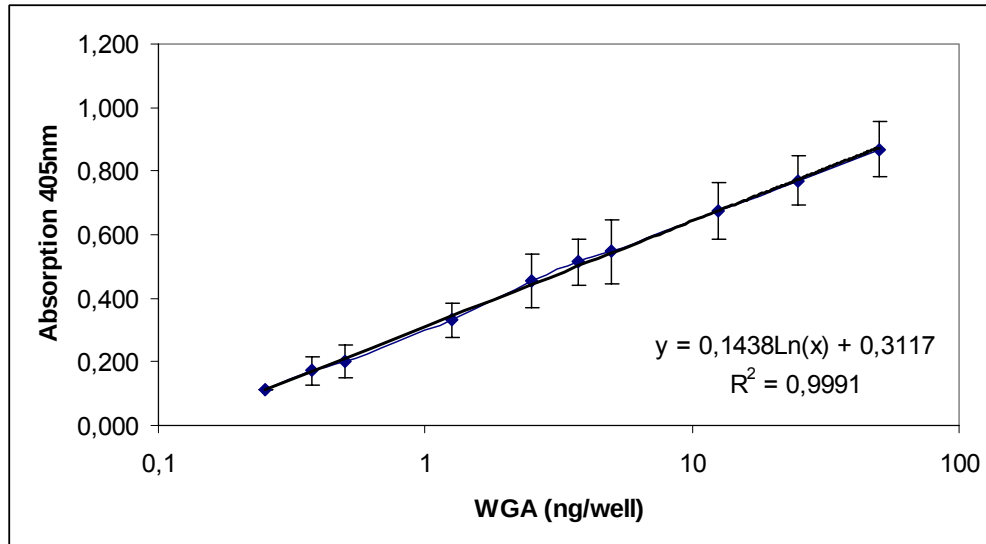


Abb. 8: Eichgerade des WGA ELISA.

4.3.3. WGA-Quantifizierung auf modifizierten Glasoberflächen

Um zu überprüfen, ob das oben beschriebene Testsystem auch für die Quantifizierung von auf modifizierten Objektträgern immobilisiertem WGA geeignet ist, wurden zunächst Untersuchungen ohne WGA-Immobilisierung durchgeführt. Auf diese Weise sollte eine eventuelle Reaktivität des anti-WGA-Antikörpers mit den APTES- bzw. den GPTS-funktionalisierten Oberflächen festgestellt werden. Hierfür wurden die Objektträger analog zu Kapitel 4.1. beschichtet. Aminoschichten wurden anschließend sowohl in aktivierter Form als auch ohne Aktivierung mit Glutardialdehyd verwendet. Darüber hinaus wurden Amino- und Epoxyschichten entweder mit 0,01%iger BSA-Lösung in PBS Puffer pH 7,2 oder mit 5%iger Glycin-Lösung in Carbonat-Puffer pH 9 abgesättigt. Auf diesen unterschiedlich modifizierten Objektträgern wurde schließlich der in Kapitel 4.3.2. beschriebene ELISA durchgeführt. Die Messwerte dieser Versuchsreihe sind in Form der Absorption bei 405nm in Tabelle 1 zusammengefasst.

Art der Beschichtung		Absorption 405nm
Glasobjektträger	nicht modifiziert	0,237 $\pm$ 0,013
APTES	nicht aktiviert	0,231 $\pm$ 0,006
	GDA + BSA	0,389 $\pm$ 0,041
	GDA + Glycin	0,314 $\pm$ 0,064
GPTS	nicht abgesättigt	0,246 $\pm$ 0,009
	BSA	0,155 $\pm$ 0,033
	Glycin	0,214 $\pm$ 0,023

Tab. 1: Absorptionswerte des WGA-ELISA an unterschiedlich modifizierten Glasobjektträgeroberflächen ohne immobilisiertes Weizenkeimlektin.

An den Ergebnissen von Tabelle 1 ist zu erkennen, dass in manchen Fällen eine gewisse Wechselwirkung des Antikörpers mit der funktionalisierten Oberfläche vorhanden ist. Zwischen nichtmodifizierten Objektträgern und nicht aktivierten APTES- bzw. den GPTS-funktionalisierten Objektträgern lässt sich allerdings kein signifikanter Unterschied feststellen. Nach Absättigung der Epoxy-Oberflächen mit BSA oder Glycin lagen die Messwerte sogar unter dem Referenzwert. Aktivierung und anschließende Absättigung der APTES-modifizierten Oberflächen führte allerdings zu einer Erhöhung der gemessenen Absorption von rund 35% im Fall von Glycin und rund 70% im Fall von BSA verglichen mit den nichtmodifizierten Objektträgern. Vergleicht man diese Resultate nun mit jenen der GPTS-modifizierten Oberflächen, so lässt sich ableiten, dass vermutlich eine gewisse Wechselwirkung zwischen Antikörper und Glutardialdehyd erfolgt. Aus diesem Grund wurde p-Chloranil als alternatives Aktivierungsreagenz untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse von aktivierten Aminoschichten wurden jedenfalls diese erhöhten Negativkontrollwerte in der Berechnung berücksichtigt.

4.4. Beurteilung der einzelnen Immobilisierungsparameter durch Quantifizierung von WGA

Das ELISA-Testsystem zur Quantifizierung von WGA wurde herangezogen, um die einzelnen Parameter der Immobilisierung des Lektins auf silanisierten Glasoberflächen beurteilen und optimieren zu können.

Nachfolgend wird auf die jeweiligen Schritte des Immobilisierungsprozesses, die variiert wurden, näher eingegangen. Soweit nicht anders angegeben wurde generell folgende Vorgangsweise gewählt:

Funktionalisierung der Glasobjektträger

Die Glasobjektträger wurden vor der WGA-Kopplung, wie unter Punkt 4.2.2. angegeben, mit APTES oder GPTS funktionalisiert. Die mit APTES modifizierten Oberflächen wurden für die folgende Immobilisierung des Lektins mit Glutardialdehyd aktiviert.

Immobilisierung von WGA

Pro well wurden 50µl WGA-Lösung unterschiedlicher Konzentration (100µg/ml, 1µg/ml, 0,5µg/ml PBS) eingesetzt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die WGA-Lösung abgesaugt und die wells 3x mit je 200µl 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9 gewaschen.

Absättigung der mit WGA modifizierten Objektträger

Jedes well wurde danach mit 50µl einer 0,01%iger BSA-Lösung in PBS bei Raumtemperatur 12 Stunden lang inkubiert. Nach Absaugen der Blockier-Lösung wurden die wells mit je 200µl 0,5M Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer pH 9 gewaschen.

WGA-Quantifizierung mittels ELISA

Vor dem Aufbringen des Primärantikörpers wurden die einzelnen wells mit je 200µl/well PBS gewaschen. Anschließend wurde pro well eine Stunde lang mit 50 µl des anti-WGA-Antikörpers (Primärantikörper 1:2000 in 0,1% BSA - Lösung) bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200µl PBS

wurde ebenfalls eine Stunde lang bei 37°C mit 50 µl Rabbit-anti-goat-Sekundärantikörper (1:5000 in 0,1% BSA-Lösung) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten, wurde die Substratlösung aufgebracht, wobei die Reaktionsdauer 20 Minuten im Dunklen betrug. Zur photometrischen Analyse bei 405 nm im Elisa-Reader wurden jeweils 100 µl pro well des Überstandes aus dem Fexiperm®-System in eine 96-well Mikrotiterplatte übergeführt.

4.4.1. Aktivierung von APTES-modifizierten Glasobjektträgern

Zur Aktivierung von APTES wurde neben Glutardialdehyd auch p-Chloranil herangezogen. Nach erfolgter Aktivierung (siehe Punkt 4.2.2.1.) wurde Weizenkeimlektin an die modifizierten Objektträger gekoppelt und dieses mittels ELISA quantifiziert.

	Aktivierungsreagenz	
WGA (µg/ml)	p-Chloranil	Glutardialdehyd
100	0,415 ± 0,007	0,394 ± 0,002
1	0,284 ± 0,001	0,273 ± 0,001
0,5	0,212 ± 0,012	0,207 ± 0,028

Tab. 2: Menge an immobilisiertem WGA auf unterschiedlich aktivierten Aminoschichten.

Aus Tabelle 2 lässt sich ableiten, dass der Einfluss des für die mit APTES modifizierten Oberflächen verwendeten Aktivierungsreagenz auf die Immobilisierung und den Nachweis von WGA vergleichsweise gering ist. Da bei einer Aktivierung mit p-Chloranil aber doch geringfügig mehr Weizenkeimlektin gebunden werden kann und darüber hinaus die Negativkontrolle etwas geringer ist, wird p-Chloranil als Aktivierungsreagenz für APTES empfohlen.

4.4.2. Inkubationsdauer mit WGA

Um die optimalen Rahmenbedingungen für die Immobilisierung von Weizenkeimlektin zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten untersucht. Zum einen wurden die modifizierten Objektträger über Nacht, also mindestens 12 Stunden lang, und zum anderen nur zwei Stunden lang mit WGA inkubiert. Diese Untersuchungen wurden nur auf Aminoschichten durchgeführt.

	Inkubationsdauer mit WGA	
WGA (µg/ml)	2 Stunden	über Nacht
100	0,566 ± 0,035	0,293 ± 0,021
1	0,436 ± 0,012	0,217 ± 0,064
0,5	0,329 ± 0,020	0,172 ± 0,054

Tab. 3: Einfluss der Inkubationsdauer auf die WGA Immobilisierung.

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wird bei einer Inkubationszeit von lediglich zwei Stunden deutlich mehr Lektin immobilisiert als bei Kopplung über Nacht, wobei bereits bei vergleichsweise geringen Mengen an eingesetztem Weizenkeimlektin (z. B. 0,5µg/ml) enorme Unterschiede im ELISA festgestellt werden können. Inkubiert man über Nacht, werden unabhängig von der eingesetzten Lektin-Menge rund 50% weniger WGA immobilisiert als bei einer kurzen Inkubationszeit. Daher wurde für alle nachfolgenden Versuche ausschließlich eine Inkubationsdauer von zwei Stunden gewählt.

4.4.3. Absättigung der mit WGA modifizierter Glasoberflächen

Nach der Immobilisierung von Weizenkeimlektin auf aktivierten APTES- oder GPTS-modifizierten Glasoberflächen ist eine Absättigung der eventuell noch vorhandenen, reaktiven Aldehyd- bzw. Epoxyfunktionen nötig. Zum Absättigen reaktiver Oberflächen werden zumeist kleine Moleküle wie Glycin

oder Ethanolamin verwendet. Außerdem können Proteine wie z.B. BSA dafür herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine geeignete Absättigung noch vorhandener, reaktiver Gruppen zu erzielen, wobei darauf zu achten war, möglichst wenige Störfaktoren für die nachfolgende Quantifizierung des Lektins mittels ELISA zu induzieren.

4.4.3.1. Sättigungsreagenz

Die lektinmodifizierten Glasoberflächen wurden einerseits mit einer 0,01%igen BSA-Lösung in PBS-Puffer und andererseits mit einer 5%igen Glycin-Lösung in Carbonat-Puffer 12 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Darüber hinaus wurden beide Sättigungsreagenzien auch in Kombination nacheinander angewandt. Als Vergleich dienten nicht abgesättigte Objektträger.

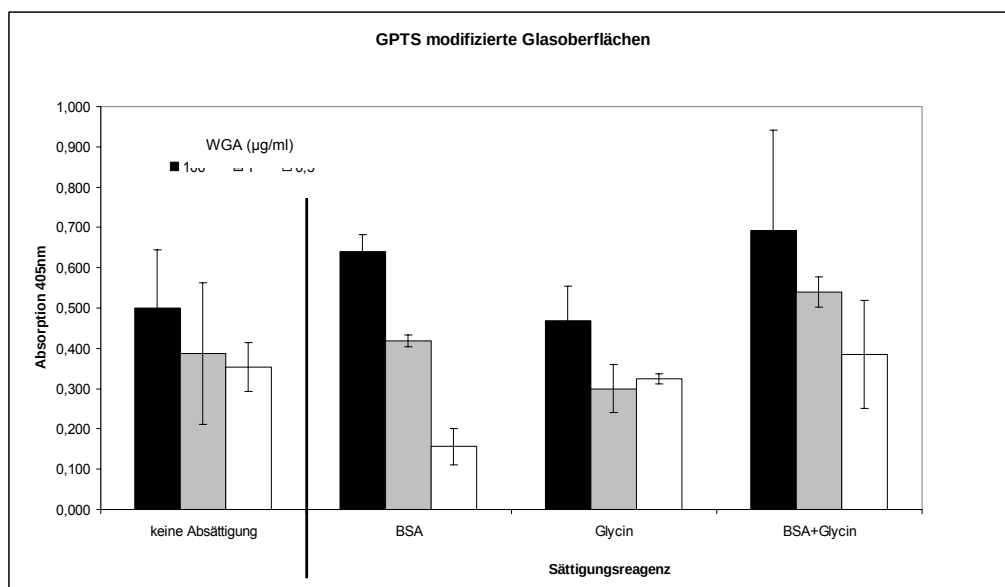


Abb. 9: Untersuchung unterschiedlicher Absättigungsvarianten für GPTS-modifizierte Glasoberflächen.

Ein Vergleich unterschiedlicher Sättigungsreagenzien für etwaige noch vorhandene, reaktive Epoxyfunktionen ist in Abbildung 9 dargestellt. Betrachtet man die überlappenden Standardabweichungen, so lässt sich auf

nicht abgesättigten Oberflächen kein eindeutiger Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen an WGA feststellen, weshalb die Notwendigkeit für eine geeignete Absättigung deutlich wird. Von den drei ausgetesteten Sättigungsvarianten stellte sich im Fall der mit GPTS funktionalisierten Oberflächen BSA als am besten geeignet heraus. Verwendet man eine 0,01%ige BSA-Lösung, so ist eine deutliche Abstufung der drei eingesetzten WGA Konzentrationen zu erkennen. Bei Absättigung mit Glycin war das Ergebnis vergleichbar mit jenen Oberflächen, die nicht abgesättigt wurden. Eine Kombination von BSA und Glycin führte interessanterweise ebenfalls zu relativ hohen Standardabweichungen. Daher kann für Glasoberflächen mit Epoxyfunktionen zur Immobilisierung von Proteinen lediglich BSA als Sättigungsreagenz empfohlen werden.

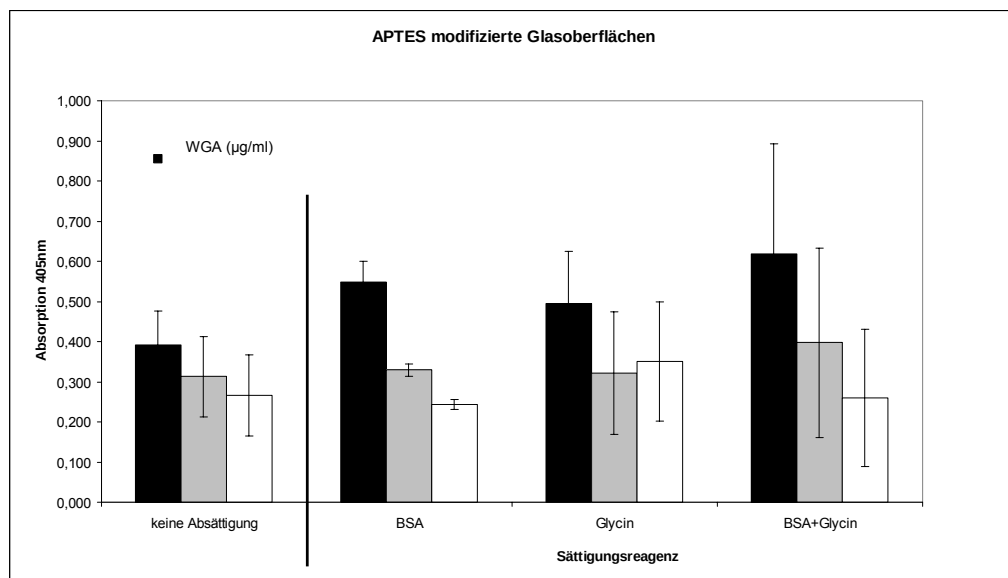


Abb. 10: Untersuchung unterschiedlicher Absättigungsvarianten für aktivierte Amino-Oberflächen.

Auf Glasoberflächen mit reaktiven Aldehydfunktionen konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, führte der Einsatz einer Kombination von BSA und Glycin auch in diesem Fall zu sehr hohen Standardabweichungen. Eine alleinige Anwendung von Glycin zur Absättigung war vergleichbar mit nicht abgesättigten Oberflächen. In beiden

Fällen waren keine eindeutigen Absorptionsunterschiede für die einzelnen WGA Konzentrationen festzustellen. Für BSA hingegen konnten adäquate Messwerte bestimmt werden. Daher ist auch im Fall von aktivierten Amino-Oberflächen eine Absättigung mit BSA empfehlenswert.

4.4.3.2. Inkubationsdauer mit dem Sättigungsreagenz

Die Dauer der Absättigung wurde zunächst mit 12 Stunden festgelegt. Da sich bei einer langen Inkubationszeit aber eventuell auch unspezifische Reaktionen ergeben, wurde auch der Einfluss einer verkürzten Absättigungsdauer von nur zwei Stunden im Vergleich zu 12 Stunden untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit APTES modifizierte Glasoberflächen nach der WGA-Kopplung mit je 50µl 0,01% BSA-Lösung pro well unterschiedlich lange inkubiert.

	Inkubationsdauer mit BSA	
WGA (µg/ml)	2 Stunden	12 Stunden
100	0,572 ± 0,034	0,451 ± 0,020
1	0,429 ± 0,017	0,370 ± 0,020
0,5	0,354 ± 0,063	0,311 ± 0,035

Tab. 4: Einfluss der Absättigungsdauer bei mit APTS modifizierten WGA-gekoppelten Oberflächen.

Die Ergebnisse aus Tabelle 4 zeigen zwar nur vergleichsweise geringfügige Unterschiede einer Absättigung von zwei Stunden im Vergleich zu einer Inkubation mit BSA über 12 Stunden. Dennoch liegen die für WGA ermittelten Absorptionswerte bei kürzerer Absättigung etwas höher. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Absättigungsdauer von zwei Stunden ausreichend ist, um unspezifische Reaktionen mit eventuell noch freien Aldehydfunktionen zu verhindern.

4.5. Lagerung

Nach entsprechender Silanisierung können modifizierte Glasobjektträger unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen gelagert werden (3). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch eine Lagerung von bereits mit Protein gekoppelten, abgesättigten Oberflächen möglich ist.

Nach Immobilisierung von WGA und Absättigen der Oberflächen mit 0,01%iger BSA-Lösung für 2 Stunden, wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C gelagert. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Lagerungsarten angewandt. Zum einen wurden die einzelnen wells vor der Lagerung mit je 150µl PBS-Puffer gespült und dann der Puffer abgesaugt. Zum anderen wurde pro well 150µl PBS-Puffer zugesetzt und die Proteinschichten in Puffer gelagert.

WGA (µg/ml)	APTES		GPTS	
	in Puffer	ohne Puffer	in Puffer	ohne Puffer
100	0,459 ± 0,174	0,554 ± 0,014	0,666 ± 0,025	0,416 ± 0,009
1	0,373 ± 0,157	0,412 ± 0,004	0,510 ± 0,002	0,208 ± 0,028
0,5	0,379 ± 0,135	0,321 ± 0,006	0,342 ± 0,003	0,211 ± 0,016

Tab. 5: Einfluss der Lagerungsbedingungen auf Amino- und Epoxy-Oberflächen mit bereits immobilisiertem WGA.

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass die Lagerung von kovalent gekoppeltem Protein auf APTES-modifizierten Oberflächen ohne Puffer, also an der Luft, erfolgen sollte. Lagert man diese Schichten nämlich in PBS-Puffer, konnte aufgrund stark erhöhter Standardabweichungen zwischen den unterschiedlichen Mengen an immobilisiertem WGA mittels ELISA nicht mehr eindeutig differiert werden. Nach Lagerung ohne Puffer konnten die unterschiedlichen Mengen an Weizenkeimlektin hingegen erfasst werden. Darüber hinaus waren diese Ergebnisse durchaus vergleichbar mit vorangegangenen Versuchen, die mit frisch beschichteten Glasobjektträgern durchgeführt wurden. Ob die Lagerung eines auf aktivierten Aminoschichten

immobilisierten Proteins in einem alternativen Puffer möglich wäre, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Interessant ist auch die Tatsache, dass für Proteinschichten auf Epoxyoberflächen die zweite Lagerungsart, nämlich jene in PBS-Puffer, zu verlässlicheren Ergebnissen führte. Denkbar wäre hier, dass es im Falle der mit GPTS funktionalisierten Oberflächen zu unspezifischen Reaktionen an der Luft kommt, weshalb eine Lagerung in PBS-Puffer eher zu empfehlen wäre.

4.6. Optimierung des ELISA-Testsystems

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde der unter Punkt 4.3. beschriebene ELISA zur Quantifizierung von WGA verwendet, um den Einfluss verschiedener Faktoren im Rahmen der Immobilisierung von WGA auf modifizierten Glasoberflächen abzuschätzen. Die Quantifizierung von WGA auf silanisierten Glasobjektträgern mit diesem ELISA-Verfahren gestaltete sich zunächst eher schwierig, da größere Mengen an Lektin nicht mehr im linearen Bereich des Testsystems lagen. Darüber hinaus erwies sich die Negativkontrolle auf den silanisierten Glasoberflächen mitunter als wesentlich höher als im Vorfeld ermittelt und war deshalb nicht vergleichbar mit jener auf Mikrotiterplatten.

Daher wurde im Zuge dieser Arbeit versucht das ELISA-Testsystem für silanierte Glasoberflächen zu optimieren und mit einem alternativen Substrat, nämlich TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), auch sensitiver zu machen.

4.6.1. Ermittlung des optimalen Reaktionszeitraumes

TMB ist als gebrauchsfertige Lösung im Handel erhältlich und muss somit nicht immer frisch zubereitet werden. Auch eine Zugabe von Wasserstoffperoxid ist in diesem Fall nicht notwendig. Allerdings lässt sich die enzymatische Reaktion im Vergleich zu jener von ABTS weder mit 1N H_2SO_4 noch mit 1N HCl stoppen. Somit muss direkt nach Ablauf der gewünschten Reaktionszeit sofort die Absorption bestimmt werden. Aus

diesem Grund war es nötig, die optimale Reaktionsdauer im Vorfeld zu ermitteln.

Zu diesem Zweck wurde WGA in unterschiedlicher Konzentration (0,001–1 µg/ml) auf Mucin-beschichteten ELISA-Platten immobilisiert und anschließend mittels der unter Punkt 4.3.2. angegebenen ELISA Methode erfasst, mit dem Unterschied, dass an Stelle von ABTS/H₂O₂ die gebrauchsfertige TMB-Lösung als Substrat eingesetzt wurde. Analog zu ABTS/H₂O₂ wurden pro well je 100 µl TMB-Lösung verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 2, 7, 13, 15, 18 bzw. 20 Minuten unter Lichtschutz wurde die Absorption bei 405nm ermittelt (Abbildung 11).

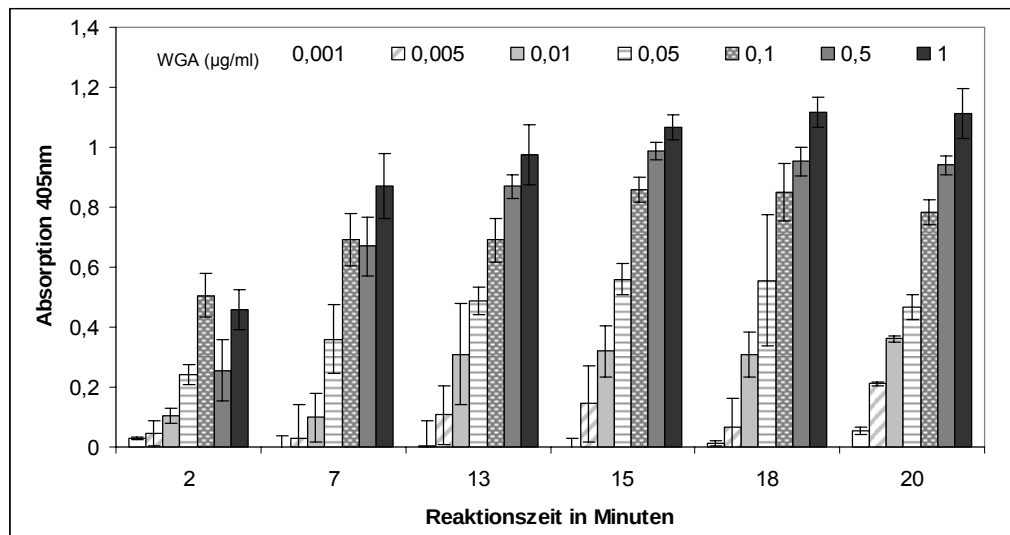


Abb. 11: Ermittlung der optimalen Reaktionszeit für den WGA-ELISA mit TMB als Substrat.

Wie in der graphischen Darstellung ersichtlich, beträgt die optimale Inkubationsdauer für die Umsetzung von TMB 20 Minuten. Nach dieser Reaktionszeit sind deutliche Unterschiede für die einzelnen Konzentrationen an Weizenkeimlektin zu erkennen. Bei kürzeren Reaktionszeiten kommt es zum Teil zu überlappenden Werten, wodurch exakte Aussagen schwierig sind. Somit wurde der Zeitrahmen für die enzymatische Umsetzung von TMB mit 20 Minuten festgelegt.

4.6.2. Ermittlung des linearen Bereiches

Um den linearen Bereich der Eichgerade zur quantitativen Ermittlung der Lektinkonzentration zu bestimmen, wurde WGA in unterschiedlicher Konzentration (0,0025–1 µg/ml) auf Mucin-beschichtete ELISA Platten aufgebracht. Die gebundene Menge an Weizenkeimlektin wurde anschließend mittels des zuvor beschriebenen (Punkt 4.6.1.), optimierten ELISA erfasst, wobei die 20-minütige Umsetzungsreaktion von TMB bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz erfolgte.

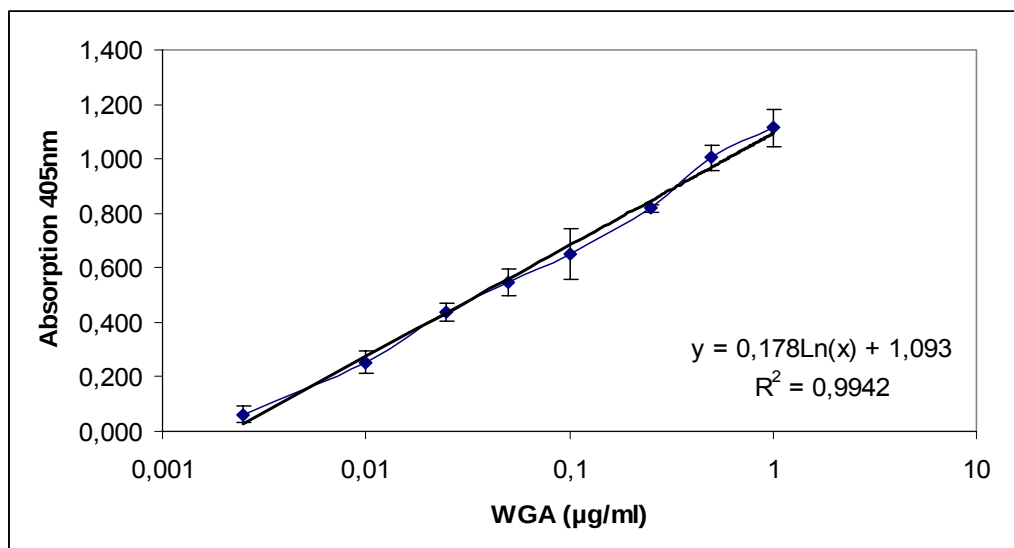


Abb. 12: Eichgerade WGA-ELISA mit dem Substrat TMB.

Nach logarithmischer Skalierung der x-Achse konnte für die ermittelte Eichgerade mit TMB im linearen Bereich ein Regressionskoeffizient von 0,178 und ein Korrelationskoeffizient von 0,9942 ermittelt werden. Das zeigt, dass die Enzymreaktion mit TMB als Substrat ein intensiveres Signal liefert und der ELISA dadurch empfindlicher wird.

Abschließend muss allerdings festgehalten werden, dass diese ersten Optimierungsschritte auf ELISA-Platten durchgeführt wurden und somit nur erste Ergebnisse zur Adaptierung des ELISA für silanisierte Glasoberflächen liefern. Eine weitere Anpassung des Testsystems an die funktionalisierten

Oberflächen sowie die Ermittlung des linearen Bereiches auf modifizierten Glasobjektträgern muss allerdings nachfolgenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Möglichkeit zur Modifizierung von Glasobjektträgern unter Anwendung von zwei Silanisierungstechniken näher untersucht, auf deren Oberfläche anschließend eine kovalente Proteinimmobilisierung möglich sein sollte. Diese Glasobjektträger sollten in weiterer Folge eine geeignete Wachstumsfläche für Zellkulturen darstellen, wobei durch die Modifizierung ihrer Oberfläche mit immobilisierten Proteinen eine gezieltere Anheftung von Zellen ermöglicht werden sollte.

Die Silanisierung wurde an Glasobjektträgern aus Sodakalkglas der hydrolytischen Klasse 3 vorgenommen. Vor der tatsächlichen Funktionalisierung ihrer Oberfläche wurden die Objektträger mit Piranha-Lösung vorgereinigt, um ihre Oberfläche zu veredeln. Hierbei werden die Objektträger in gewisser Weise hydrophilisiert und eventuelle Verunreinigungen entfernt.

Die eigentliche Modifizierung der Glasoberflächen erfolgte anschließend auf zwei unterschiedliche Arten (3). Zum einen wurden mit Hilfe von 3-Aminopropyl-trietoxysilan (APTES) Aminogruppen auf der Glasoberfläche generiert. Zum anderen wurde 3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan (GPTS) verwendet, um die Glasoberfläche mit Epoxygruppen auszustatten. Danach wurde ein Targetprotein, nämlich Weizenkeimlektin, auf der funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert. Das Ausmaß der Proteinimmobilisierung wurde nach erfolgter Kopplung mittels ELISA (4) erfasst.

Die Kopplung von WGA auf mit APTES modifizierten Objektträgern war erst nach Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd möglich. Alternativ dazu wurde als Aktivierungsreagenz p-Chloranil eingesetzt. Ein Vergleich der beiden für die Immobilisierung von WGA eingesetzten crosslinker zeigte deutlich, dass die Aktivierung keinen maßgeblichen Einfluss auf die Immobilisierung des Proteins und den späteren quantitativen Nachweis hat. Allerdings konnte durch Aktivierung mit p-Chloranil geringfügig mehr Weizenkeimlektin an die Amino-Oberfläche gebunden werden. Darüber hinaus lag die Negativkontrolle für die ELISA-Quantifizierung in diesem Fall

bei niedrigeren Werten. Infolgedessen kann p-Chloranil für die Aktivierung der APTES-Aminogruppen empfohlen werden. Aufgrund der ausreichenden Aktivität der Epoxygruppen für eine Kopplung von Proteinen war eine Aktivierung der mit GPTS modifizierten Glasobjektträger nicht notwendig. Im nächsten Schritt wurde die Immobilisierung von Weizenkeimlektin auf den funktionalisierten Glasoberflächen optimiert. Dazu wurden zunächst die optimale Inkubationsdauer mit WGA festgelegt. Hierbei wurde festgestellt, dass eine relativ kurze Inkubationsdauer von zwei Stunden vollkommen ausreichend ist, weil dabei sogar größere Mengen Lektin an die Oberfläche gebunden werden als bei einer Kopplung des Proteins über einen Zeitraum von 12 Stunden. Dies könnte auf vermehrten unspezifischen Reaktionen beruhen, wodurch letztlich nur eine geringere Menge WGA nachgewiesen werden kann. Die Inkubationsdauer für die Proteinimmobilisierung aller folgenden Untersuchungen wurde daher auf zwei Stunden festgelegt.

Um nach der WGA-Kopplung eventuell noch vorhandene, freie Aldehyd- bzw. Epoxyfunktionen abzusättigen, wurden mehrere Sättigungsvarianten untersucht. Durch eine adäquate Absättigung solcher noch reaktiver, funktioneller Gruppen lässt sich ein negativer Einfluss dieser auf die spätere Quantifizierung bzw. auf Zellen, die sich auf diesen Oberflächen anheften sollen, weitgehend vermeiden. Folglich wurden die APTES- bzw. GPTS-modifizierten Oberflächen nach erfolgter Proteinkopplung auf drei unterschiedliche Arten abgesättigt. Dazu wurden eine 0,01%igen BSA-Lösung, eine 5%igen Glycin-Lösung, sowie eine Kombination beider Sättigungsreagenzien hintereinander eingesetzt.

Sowohl für Amino- als auch für Epoxy-Oberflächen stellte sich eine Absättigung mit 0,01%iger BSA-Lösung als Methode der Wahl heraus, da ausschließlich bei Verwendung von BSA eine ungestörte und verlässliche Quantifizierung von immobilisiertem Weizenkeimlektin möglich war. Die beiden anderen Varianten resultierten in hohen Standardabweichungen, sodass eine exakte Erfassung des kovalent gebundenen Lektins in diesem Fall nicht möglich war. Ein Vergleich der Absättigungsdauer von zwei Stunden gegenüber einer von 12 Stunden ergab, dass 2 Stunden völlig ausreichen, um noch freie, reaktive Bindungsstellen abzusättigen.

Nach Optimierung der Proteinimmobilisierung wurde untersucht, ob eine Lagerung der bereits mit Protein ausgestatteten und abgesättigten Amino- bzw. Epoxy-Oberflächen möglich ist. Dazu wurden die modifizierten Oberflächen bei 4°C entweder an Luft oder in PBS-Puffer über einen Zeitraum von 12 Stunden gelagert. Während für die Lagerung von kovalent gekoppeltem WGA auf Aminoschichten ohne Puffer, also an Luft, deutlich bessere Ergebnisse erzielt wurden, war es bei den Epoxyschichten genau umgekehrt. Worauf dieses Resultat zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt werden. Generell lässt sich allerdings festhalten, dass eine Lagerung der Schichten möglich ist, wobei für APTES-modifizierte Objektträger eine Lagerung an der Luft und für GPTS-modifizierte Objektträger eine Lagerung in PBS-Puffer zu empfehlen ist.

Da die Quantifizierung von kovalent gebundenem Weizenkeimlektin auf funktionalisierten Glasobjektträgern nur eingeschränkt möglich war, wurden abschließend erste Schritte zur Optimierung des WGA-ELISA (4) durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde alternativ zu ABTS das Substrat TMB eingesetzt. Die optimale Reaktionsdauer zur Umsetzung von TMB wurde mit 20 Minuten festgelegt. Darüber hinaus konnte in einem Bereich zwischen 0,0025-1 µg/ml WGA für die Eichgerade ein linearer Verlauf ermittelt werden. Nach logarithmischer Skalierung der x-Achse ergab sich für diese Eichgerade ein Regressionskoeffizient von 0,178 und ein Korrelationskoeffizient von 0,9942. Außerdem lässt sich, verglichen mit ABTS, feststellen, dass die Enzymreaktion mit TMB ein intensiveres Signal liefert und dadurch der ELISA empfindlicher wird.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass der ELISA für kovalent an Amino- oder Epoxyschichten gekoppeltes Weizenkeimlektin noch weiter adaptiert werden muss, vor allem hinsichtlich einer Senkung der Werte der Negativkontrollen in einen zufriedenstellenden Bereich. Weiters muss die Linearität dieser Quantifizierungsmethode auch auf den modifizierten Glasobjektträgern überprüft werden. Danach sollten derart modifizierte Oberflächen als Wachstumsunterlage für Zellen eingesetzt werden können, wobei der Einfluss der Oberfläche auf Zelladhäsion und Zellproliferation in

Abhängigkeit der Modifikation der Oberfläche auch quantitativ exakt bestimmt werden könnte.

6. ANHANG

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic-acid)diammonium salt
APTES	3-Aminopropyl-trietoxysilan
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
DIPEA	Diisopropylethylamin
ELISA	Enzyme-Linked Immunsorbent Assay
EM	Extrazelluläre Matrix
GDA	Glutardialdehyd
GPTS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
IA	Immunoassay
LW	Leerwert
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered saline
PGM	porcine gastric mucin; Mucin aus dem Schweinemagen
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
WGA	Wheat Germ Agglutinin, Weizenkeimlektin

6.2. Literaturverzeichnis

- (1) Tavelin S, Grasjo J, Taipalensuu J, Ocklind G, Artursson P. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. Methods Mol Biol 2002; 188: 233-272.
- (2) Wirth, M., Gerhardt, K., Wurm, C. and Gabor, F., 2002. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. J.Contr.Rel. 79, 183-191.
- (3) Komorova B., Immobilisierung und Zellbiologische Charakterisierung von Biomolekülen an Glasobjektträgern. Diplomarbeit Universität Wien, Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, 2006.
- (4) Güll I., Gabor F., Wirth M., 2007. Development of a sensible and reliable ELISA for quantification of wheat germ agglutinin. J. Immunol. Methods. 318 (1-2): 20-29.
- (5) Scholze H., 1985. J. Non-Crys. Solids 73, 669.
- (6) Scholze H., 1998. Glas. Natur, Struktur und Eigenschaften, 3. Auflage 306.
- (7) Franzka S., 1999. II. Dissertation, Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur Reibung von Silizium- und Al₂O₃-Einkristalloberflächen im Kontakt mit Silizium; Universität Karlsruhe, Institut für Werkstoffkunde.
- (8) Boyd, W.C. and Slapeigh, E., 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science 119, 419.
- (9) Voet, D., Voet, J. G., 2000. Biochemistry, Wiley Intl. Edition, Wiley.

- (10) Watzl, B., Neudecker, C., Hansch, G.M., Rechkemmer, G. and Pool-Zobel, B.L., 2001. Dietary wheat germ agglutinin modulates ovalbumin-induced immune responses in Brown Norway rats. *British Journal of Nutrition*. 85(4), 483- 90
- (11) Cordain, L. et al., 2000. Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition*. 83, 207- 217.
- (12) Jacobs, D.R. Jr., Marquart, I., Slavin, J. and Kushi, L.H., 1998. Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta- analysis. *Nutr. Cancer* 30(2), 85- 96.
- (13) Wirth, M., Gerhardt, K., Wurm, C. and Gabor, F., 2002. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J.Contr.Rel.* 79, 183-191.
- (14) Gabor, F., Wirth, M., 2003. Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives. *STP Pharma* 13, 3- 16.
- (15) Schalkhammer T.G.M. (Editor), 2002. *Analytical Biotechnology*, Birkhäuser Verlag.
- (16) Shirai K., Yoshida Y., Nakayama Y., Fujitani M., Shintani H., Wakasa K., Okazaki M., Snauwaert J., van Meerbeek B., 2000. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomate.)* 53, 204.
- (17) Cras J.J., Rowe-Taitt C.A., Nivens D.A., Ligler F.S., 1999. *Biosens. Bioelectr.* 14, 683
- (18) Böing J., 2003. Dissertation, Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität; Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch- Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- (19) Weetall H.H., 1969. *Science* 166, 615.

- (20) Plueddemann E.P., 1980. Chemistry of silane coupling agents. D.E. Leyden: Silylated surfaces, Gordon and Breach, New York.

6.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Izabela Ivošević, geb. Mijačević
Geburtsdatum	03.03.1978
Geburtsort	Kakanj, Bosnien und Herzegowina
Staatsbürgerschaft	Kroatien
Religionsbekenntnis	Römisch-katholisch

Familienverhältnisse

Eltern	Bozica Mijacevic, 22.12.1957 Anto Mijacevic, 28.11.1954
Familienstand	Verheiratet

Schulbildung

1984-1991	Grundschule „Ilija Lukic“ in Kakanj, Bosnien und Herzegowina
1991-1993	Hauptschule: Schweglerstrasse 2-4, 1150 Wien
1993-1998	BORG 3, Landstraßer Hauptstraße 70, 1030 Wien
1998-dato	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
10.12.2003	Abschluss der 1. Diplomprüfung
WS 2005, SS 2006	Praktische Arbeit zur vorliegenden Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien

Studienbegleitende Tätigkeiten

Geringfügige Beschäftigung im Einzelhandel,
Sprechstundenhilfe in der Arztpraxis,
Tutorin in den Übungen „Industrielle Arzneimittelherstellung“ WS 2006 bis
WS 2007

6.4. Rohdaten

Zusammenfassung der Einzelergebnisse

Einzelergebnisse zu Tabelle 1

Glasobjektträger	MW/Stabw
0,234	0,237
0,238	0,013
0,227	
0,228	
0,260	
APTES	MW/Stabw
0,228	0,231
0,241	0,006
0,224	
0,231	
0,229	
APTES/BSA	MW/Stabw
0,347	0,389
0,350	0,041
0,425	
0,385	
0,436	
APTES/Glycin	MW/Stabw
0,244	0,314
0,301	0,064
0,311	
0,297	
0,419	
GPTS	MW/Stabw
0,250	0,246
0,238	0,009
0,260	
0,246	
0,238	
GPTS/BSA	MW/Stabw
0,113	0,155
0,196	0,033
0,130	
0,166	
0,171	
GPTS/Glycin	MW/Stabw
0,191	0,214
0,233	0,023
0,209	
0,194	
0,242	

Einzelergebnisse zu Tabelle 2

p-Chloranil	Versuch1	MW/Stabw	Versuch2	MW/Stabw
Leerwerte	0,529 0,528 0,577 0,531 0,553 0,518 0,539	0,539 0,020	0,440 0,381 0,358	0,393 0,042
	LW abgezogen		LW abgezogen	
WGA 100µg/ml	0,953 1,001 0,974 0,900 0,916	0,414 0,462 0,435 0,361 0,377	0,789 0,836	0,396 0,443 0,420 0,033
1µg/ml	0,841 0,851 0,814 0,796 0,842 0,789	0,302 0,312 0,275 0,257 0,303 0,250	0,506 0,847 0,681	0,113 0,454 0,288 0,285 0,171
0,5µg/ml	0,705 0,751 0,726 0,734 0,778 0,773 0,735	0,166 0,212 0,187 0,195 0,239 0,234 0,196	0,613 0,614	0,220 0,221 0,221 0,001

GDA	Versuch1	MW/Stabw		Versuch2	MW/Stabw	
Leerwerte	0,432 0,433 0,432	0,432 0,001		0,329 0,393 0,397 0,445	0,391 0,048	
WGA		LW abgezogen			LW abgezogen	
100µg/ml	0,846 0,797 0,839	0,414 0,365 0,407	0,395 0,027	0,786 0,790 0,723 0,835	0,395 0,399 0,332 0,444	0,393 0,046
1µg/ml	0,508 0,500 0,822 0,816 0,880	0,076 0,068 0,390 0,384 0,448	0,273 0,185	0,610 0,688 0,697	0,219 0,297 0,306	0,274 0,048
0,5µg/ml	0,528 0,697 0,487 0,769	0,096 0,265 0,055 0,337	0,188 0,135	0,635 0,601	0,244 0,210	0,227 0,024

Einzelergebnisse zu Tabelle 3

	WGA 2h	MW/Stabw	WGA 12h	MW/Stabw
Leerwerte	0,537 0,536 0,540	0,538 0,002	0,442 0,485 0,425 0,436	0,447 0,026
WGA 100µg/ml	LW abgezogen		LW abgezogen	
	1,145 1,148 1,086 1,074 1,097 1,071	0,607 0,610 0,548 0,536 0,559 0,533	0,771 0,717 0,726 0,748 0,738	0,324 0,270 0,279 0,301 0,291
1µ/ml	0,987 0,970 0,965	0,449 0,432 0,427	0,697 0,653 0,594 0,619 0,756	0,250 0,206 0,147 0,172 0,309
0,5µg/ml	0,882 0,843 0,884 0,857	0,344 0,305 0,34 0,319	0,585 0,563 0,701 0,607 0,639	0,138 0,116 0,254 0,160 0,192

Einzelergebnisse zu Tabelle 4

	BSA 2h	MW/Stabw	BSA 12h	MW/Stabw
Leerwerte	0,537 0,546 0,530	0,538 0,008	0,544 0,564 0,512	0,540 0,026
WGA	LW abgezogen		LW abgezogen	
100µg/ml	1,145 1,148 1,086 1,074 1,097 1,071	0,538 0,541 0,479 0,467 0,490 0,464	0,997 0,968 1,007	0,997 0,968 1,007
1µg/ml	0,945 0,987 0,970 0,965	0,407 0,449 0,432 0,427	0,890 0,930 0,910	0,890 0,930 0,910
0,5µg/ml	0,832 0,843 0,934 0,957	0,225 0,236 0,327 0,350	0,875 0,826	0,875 0,826

Einzelerggebnisse zu Tabelle 5

Amino						
Versuch 1						
	mit PBS			ohne PBS		
	MW/Stabw			MW/Stabw		
Leerwerte	0,610	0,498		0,511	0,499	
	0,619	0,142		0,474	0,022	
	0,437			0,512		
	0,327					
WGA 100µg/ml	LW abgezogen			LW abgezogen		
	1,192	0,694	0,660	1,070	0,571	0,560
	1,167	0,669	0,030	1,035	0,536	0,017
	1,158	0,660		1,049	0,550	
	1,164	0,666		1,068	0,569	
	1,110	0,612		1,074	0,575	
1µg/ml	1,178	0,680	0,544	0,885	0,386	0,408
	1,263	0,765	0,228	0,961	0,462	0,054
	1,295	0,797		0,962	0,463	
	0,902	0,404		0,835	0,336	
	0,831	0,333		0,891	0,392	
	0,786	0,288				
0,5µg/ml	1,017	0,519	0,530	0,855	0,356	0,324
	0,996	0,498	0,049	0,781	0,282	0,038
	0,991	0,493		0,855	0,356	
	0,986	0,488		0,802	0,303	
	1,098	0,600				
	1,080	0,582				

Amino						
Versuch 2						
	mit PBS	MW/Stabw		ohne PBS	MW/Stabw	
Leerwerte	0,404 0,444 0,527 0,450	0,456 0,051		0,329 0,393 0,306 0,397	0,356 0,046	
WGA 100µg/ml	LW abgezogen			LW abgezogen		
	0,784	0,328	0,356	0,835	0,479	0,564
	0,829	0,373	0,098	0,995	0,639	0,080
	0,786	0,330		0,930	0,574	
	0,653	0,197				
	0,931	0,475				
1µg/ml	0,893	0,437				
	0,753	0,297	0,339	0,795	0,439	0,411
	0,759	0,303	0,041	0,610	0,254	0,091
	0,783	0,327		0,788	0,432	
	0,838	0,382		0,845	0,489	
	0,851	0,395		0,797	0,441	
0,5µg/ml	0,787	0,331				
	0,868	0,412	0,338	0,669	0,313	0,315
	0,778	0,322	0,039	0,635	0,279	0,028
	0,757	0,301		0,701	0,345	
	0,778	0,322		0,681	0,325	
	0,805	0,349				
	0,779	0,323				

Amino							
Versuch 3							
	mit PBS	MW/Stabw	ohne PBS	MW/Stabw			
Leerwerte	0,353 0,381 0,381 0,562 0,584	0,452 0,111	0,432 0,433 0,432	0,432 0,001			
WGA 100µg/ml	LW abgezogen		LW abgezogen				
	0,767 0,836 0,767 0,89 0,889 0,733	0,315 0,384 0,315 0,438 0,437 0,281	0,361 0,068	0,946 0,897 0,839 0,590 0,541 0,483	0,538 0,054		
	1µg/ml	0,706 0,798 0,767 0,676 0,511 0,673	0,254 0,346 0,315 0,224 0,059 0,221	0,236 0,100	0,722 0,716 0,880 0,366 0,360 0,524	0,416 0,093	
		0,5µg/ml	0,753 0,770 0,793 0,704 0,600 0,710	0,301 0,318 0,341 0,252 0,148 0,258	0,269 0,069	0,694 0,669 0,338 0,313	0,325 0,018

Epoxy						
Versuch 1						
	mit PBS	MW/Stabw		ohne PBS	MW/Stabw	
Leerwerte	0,322	0,310		0,537	0,418	
	0,331	0,037		0,478	0,099	
	0,330			0,494		
	0,255			0,366		
				0,344		
				0,287		
WGA		LW			LW	
		abgezogen	MW/Stabw		abgezogen	MW/Stabw
100µg/ml	0,969	0,660	0,648	0,798	0,380	0,422
	0,944	0,635	0,013	0,804	0,386	0,072
	0,960	0,651		0,835	0,417	
				0,959	0,541	
				0,886	0,468	
				0,757	0,339	
1µg/ml	0,894	0,585	0,508	0,609	0,191	0,188
	0,754	0,445	0,071	0,622	0,204	0,124
	0,803	0,494		0,713	0,295	
				0,733	0,315	
				0,569	0,151	
				0,389	-0,029	
0,5µg/ml	0,718	0,409	0,344	0,505	0,087	0,200
	0,667	0,358	0,072	0,697	0,279	0,087
	0,576	0,267		0,707	0,289	
				0,576	0,158	
				0,542	0,124	
				0,678	0,260	

Epoxy					
Versuch 2					
	mit PBS	MW/Stabw		ohne PBS	MW/Stabw
Leerwerte	0,316	0,347		0,534	0,511
	0,261	0,097		0,506	0,021
	0,242			0,494	
	0,472				
	0,455				
	0,334				
WGA 100µg/ml	LW abgezogen			LW abgezogen	
	1,073	0,726	0,684	0,968	0,457 0,410
	1,069	0,722	0,050	0,946	0,435 0,063
	1,013	0,666		0,849	0,338
	0,968	0,621			
1µg/ml	0,842	0,495	0,511	0,736	0,225 0,228
	0,830	0,483	0,026	0,751	0,240 0,010
	0,885	0,538		0,731	0,220
	0,873	0,526			
0,5µg/ml	0,770	0,423	0,340	0,711	0,200 0,222
	0,677	0,330	0,079	0,725	0,214 0,028
	0,613	0,266		0,765	0,254

Einzelergebnisse zu Abbildung 9

nicht abgesättigt		WGA (µg/ml)								
LW		100			1			0,5		
0,326	0,320	0,909	0,589	0,499	0,729	0,409	0,387	0,671	0,351	0,353
0,327	0,052	0,826	0,506	0,146	0,854	0,534	0,176	0,632	0,312	0,060
0,326		0,886	0,566		0,784	0,464		0,739	0,419	
0,246		0,948	0,628		0,661	0,341		0,657	0,337	
0,387		1,010	0,690		0,432	0,112		0,740	0,420	
0,368		0,987	0,667		0,758	0,438		0,687	0,367	
0,238		0,598	0,278		0,497	0,177		0,725	0,405	
0,366		0,654	0,334		0,459	0,139		0,679	0,359	
0,295		0,897	0,577		0,957	0,637		0,664	0,344	
		0,618	0,298		0,879	0,559		0,536	0,216	
		0,688	0,368		0,767	0,447				
		0,808	0,488							
abgesättigt mit BSA 0,01%		WGA (µg/ml)								
LW		100			1			0,5		
0,113	0,168	0,832	0,664	0,641	0,582	0,414	0,418	0,259	0,091	0,156
0,196	0,031	0,841	0,673	0,040	0,618	0,450	0,185	0,280	0,112	0,065
0,130		0,768	0,600		0,276	0,108		0,393	0,225	
0,166		0,842	0,674		0,734	0,566		0,367	0,199	
0,171		0,762	0,594		0,720	0,552				
0,192										
0,192										
0,187										

abgesättigt mit Glycin			WGA (µg/ml)								
LW		100			1			0,5			
0,191	0,220	0,635	0,415	0,468	0,463	0,243	0,300	0,541	0,321	0,324	
0,233	0,019	0,659	0,439	0,088	0,469	0,249	0,060	0,547	0,327	0,013	
0,209		0,628	0,408		0,509	0,289		0,558	0,338		
0,194		0,602	0,382		0,511	0,291		0,528	0,308		
0,242		0,656	0,436		0,478	0,258					
0,222		0,550	0,330		0,606	0,386					
0,216		0,783	0,563		0,601	0,381					
0,234		0,728	0,508								
0,236		0,830	0,610								
		0,793	0,573								
		0,699	0,479								
abgesättigt mit BSA 0,01%, Glycin 5%			WGA (µg/ml)								
LW		100			1			0,5			
0,380	0,391	1,194	0,804	0,547	0,951	0,561	0,540	0,763	0,373	0,385	
0,386	0,010	1,099	0,709	0,257	0,940	0,550	0,037	0,729	0,339	0,134	
0,392		1,152	0,762		0,876	0,486		0,963	0,573		
0,404					0,955	0,565		0,648	0,258		

Einzelergebnisse zu Abbildung 10

nicht abgesättigt		WGA								
LW		100			1			0,5		
0,533	0,513	1,051	0,538	0,392	0,801	0,288	0,313	0,797	0,284	0,265
0,462	0,072	0,973	0,460	0,084	0,757	0,244	0,100	0,790	0,277	0,101
0,599		0,984	0,471		0,904	0,391		0,703	0,190	
0,405		0,790	0,277		0,591	0,078		0,682	0,169	
0,580		0,812	0,299		0,881	0,368		0,673	0,160	
0,380		0,788	0,275		0,882	0,369		0,658	0,145	
0,541		0,945	0,432		0,821	0,308		0,914	0,401	
0,500		0,909	0,396		0,752	0,239		0,734	0,221	
0,454		0,897	0,384		0,770	0,257		0,797	0,284	
0,564		0,867	0,354		0,875	0,362		0,842	0,329	
0,559		0,865	0,352		0,938	0,425		0,751	0,238	
0,575		0,974	0,461		0,941	0,428		0,990	0,477	
abgesättigt mit BSA 0,01%		WGA								
LW		100			1			0,5		
0,504	0,487	1,082	0,595	0,548	0,697	0,210	0,329	0,682	0,195	0,243
0,350	0,087	1,047	0,560	0,051	0,653	0,166	0,118	0,701	0,214	0,093
0,442		1,034	0,547		0,756	0,269		0,607	0,120	
0,485		1,095	0,608		0,886	0,399		0,639	0,152	
0,425		0,965	0,478		1,010	0,523		0,754	0,267	
0,436		0,986	0,499		0,890	0,403		0,745	0,258	
0,597					0,772	0,285		0,876	0,389	
0,347					0,866	0,379		0,837	0,350	
0,548										
0,572										
0,580										
0,557										

abgesättigt mit Glycin			WGA							
LW		100			1			0,5		
0,244	0,352	0,744	0,392	0,494	0,496	0,144	0,321	0,506	0,154	0,351
0,301	0,071	0,681	0,329	0,130	0,520	0,168	0,153	0,625	0,273	0,149
0,311		0,697	0,345		0,653	0,301		0,571	0,219	
0,297		0,778	0,426		0,543	0,191		0,617	0,265	
0,419		0,730	0,378		0,624	0,272		0,518	0,166	
0,432		0,766	0,414		0,574	0,222		0,586	0,234	
0,395		1,049	0,697		0,886	0,534		0,885	0,533	
0,414		0,976	0,624		0,575	0,223		0,754	0,402	
		1,008	0,656		0,890	0,538		0,745	0,393	
		0,960	0,608		0,772	0,420		0,910	0,558	
		0,905	0,553		0,866	0,514		0,876	0,524	
		0,859	0,507					0,837	0,485	
abgesättigt mit BSA 0,01%, Glycin 5%			WGA							
LW		100			1			0,5		
0,946	0,908	1,748	0,840	0,580	1,106	0,198	0,397	1,008	0,100	0,259
0,931	0,050	1,472	0,564	0,276	1,442	0,534	0,235	1,051	0,143	0,171
0,834		1,623	0,715		0,998	0,090		1,021	0,113	
0,922		1,560	0,652		1,477	0,569		1,176	0,268	
		1,276	0,368		1,504	0,596		1,384	0,476	
		1,100	0,192					1,365	0,457	

Einzelergebnisse zu Abbildung 11

	20 min	MW/Stabw	18 min	MW/Stabw	15 min	MW/Stabw
Leerwerte	0,457	0,469	0,471	0,441	0,435	0,435
	0,481	0,017	0,417	0,029	0,444	0,046
	0,469		0,400		0,444	
	0,475		0,444		0,470	
	0,493		0,445		0,438	
	0,477		0,465		0,423	
	0,454		0,417		0,365	
	0,438		0,426		0,519	
	0,476		0,486		0,377	

	13 min	MW/Stabw	7 min	MW/Stabw	2 min	MW/Stabw
Leerwerte	0,398	0,388	0,284	0,259	0,131	0,109
	0,396	0,053	0,276	0,025	0,085	0,022
	0,410		0,230		0,109	
	0,478		0,259		0,105	
	0,377		0,255		0,130	
	0,413		0,240		0,077	
	0,303		0,276		0,089	
	0,406		0,294		0,133	
	0,312		0,220		0,125	

WGA (µg/ml)	20 min			18 min			15 min		
		LW abgezogen	MW/Stabw						
1	1,580	1,111	1,113	1,534	1,093	1,116	1,476	1,041	1,066
	1,535	1,066	0,082	1,505	1,064	0,051	1,506	1,071	0,041
	1,698	1,229		1,625	1,184		1,556	1,121	
	1,515	1,046		1,563	1,122		1,464	1,029	
0,5	1,388	0,919	0,940	1,428	0,987	0,953	1,400	0,965	0,986
	1,430	0,961	0,030	1,360	0,919	0,048	1,441	1,006	0,029
0,1	1,297	0,828	0,784	1,306	0,865	0,849	1,295	0,860	0,859
	1,200	0,731	0,042	1,245	0,804	0,096	1,347	0,912	0,042
	1,275	0,806		1,194	0,753		1,244	0,809	
	1,240	0,771		1,417	0,976		1,288	0,853	
0,05	0,906	0,437	0,466	1,151	0,710	0,555	0,957	0,522	0,560
	0,963	0,494	0,040	0,841	0,400	0,219	1,032	0,597	0,053
0,01	0,838	0,369	0,361	0,804	0,363	0,309	0,815	0,380	0,319
	0,822	0,353	0,011	0,697	0,256	0,076	0,693	0,258	0,086
0,005	0,685	0,216	0,211	0,618	0,177	0,067	0,725	0,290	0,144
	0,675	0,206	0,007	0,472	0,031	0,096	0,503	0,068	0,126
				0,436	-0,005		0,509	0,074	
0,001	0,515	0,046	0,055	0,464	0,023	0,014	0,441	0,006	-0,007
	0,533	0,064	0,013	0,448	0,007	0,008	0,397	-0,038	0,027
				0,454	0,013		0,447	0,012	

WGA (µg/ml)	13 min			7 min			2 min		
		LW abgezogen	MW/Stabw						
1	1,229	0,841	0,975	1,078	0,819	0,871	0,563	0,454	0,459
	1,404	1,016	0,099	1,006	0,747	0,108	0,474	0,365	0,068
	1,463	1,075		1,244	0,985		0,619	0,510	
	1,358	0,970		1,194	0,935		0,616	0,507	
0,5	1,286	0,898	0,869	0,999	0,740	0,669	0,436	0,327	0,256
	1,228	0,840	0,041	0,858	0,599	0,100	0,294	0,185	0,100
0,1	1,012	0,624	0,690	1,073	0,814	0,692	0,672	0,563	0,506
	1,184	0,796	0,074	0,955	0,696	0,087	0,569	0,460	0,073
	1,054	0,666		0,893	0,634		0,537	0,428	
	1,062	0,674		0,883	0,624		0,682	0,573	
0,05	0,910	0,522	0,488	0,700	0,441	0,360	0,326	0,217	0,241
	0,843	0,455	0,047	0,539	0,280	0,114	0,374	0,265	0,034
0,01	0,819	0,431	0,310	0,415	0,156	0,098	0,233	0,124	0,105
	0,578	0,190	0,170	0,300	0,041	0,081	0,196	0,087	0,026
0,005	0,596	0,208	0,107	0,420	0,161	0,028	0,187	0,078	0,046
	0,403	0,015	0,097	0,211	-0,048	0,115	0,109	0,000	0,041
	0,486	0,098		0,231	-0,028		0,171	0,062	
0,001	0,486	0,098	0,392	0,252	-0,007	0,246	0,135	0,026	0,138
	0,320	-0,068	0,085	0,207	-0,052	0,036	0,136	0,027	0,004
	0,369	-0,019		0,279	0,020		0,143	0,034	

Einzelergebnisse zu Abbildung 12

Leerwerte	WGA		
		LW abgezogen	MW/Stabw
0,155 0,160	1µg/ml	1,381	1,381
0,164 0,011		1,350	1,350
0,159		1,271	1,271
0,160		1,183	1,183
0,146		1,361	1,361
0,178		1,300	1,300
0,163		1,393	1,393
0,141		1,230	1,230
0,178		1,327	1,327
0,164		1,182	1,182
0,164		1,204	1,204
0,165		1,190	1,190
0,153		1,231	1,231
0,150		1,273	1,273
0,156		1,241	1,241
0,153		1,316	1,316
0,146		1,236	1,236
0,155		1,263	1,263
0,156	0,5µg/ml	1,150	1,150
0,179		1,235	1,235
0,152		1,138	1,138
0,172		1,134	1,134
0,174	0,25µg/ml	0,969	0,969
0,155		0,989	0,989
	0,1µg/ml	0,771	0,771
		0,876	0,876
		0,639	0,639
		0,879	0,879
		0,864	0,864
		0,833	0,833
	0,05µg/ml	0,656	0,656
		0,708	0,708
		0,758	0,758

WGA			
		LW abgezogen	MW/Stabw
0,025µ/ml	0,617	0,617	0,597
	0,630	0,630	0,033
	0,584	0,584	
	0,557	0,557	
0,01µg/ml	0,497	0,497	0,414
	0,358	0,358	0,043
	0,450	0,450	
	0,365	0,365	
	0,340	0,340	
	0,423	0,423	
	0,440	0,440	
	0,428	0,428	
	0,439	0,439	
	0,483	0,483	
	0,413	0,413	
	0,420	0,420	
	0,402	0,402	
	0,391	0,391	
	0,387	0,387	
	0,386	0,386	
0,0025µ/ml	0,245	0,245	0,223
	0,200	0,200	0,032