

**Reflektometrische Interferenzspektroskopie  
(RIfS) zur Detektion ganzer *Legionella  
pneumophila*-Zellen und Entwicklung  
regenerierbarer funktionaler Oberflächen für  
Anwendungen in der Biosensorik.**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Stefan Merkl**

aus **Frankfurt am Main**

Marburg/Lahn **Jahr 2014**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Michael Keusgen**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Klaus Reuter**

Eingereicht am **11.11.2014**

Tag der mündlichen Prüfung am **09.02.2015**

Hochschulkennziffer: 1180

## Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Keusgen für die freundliche Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Reuter für die Übernahme des Zweitgutachtens, Frau Prof. Dr. Maike Petersen und Herrn Prof. Dr. Carsten Culmsee für die Übernahme der beiden anderen Sitze in der Prüfungskommission.

Danken möchte ich auch allen meinen Arbeitskollegen der AG Keusgen für die für die vielfältigen Hilfestellungen. Überaus dankbar bin ich Dr. Doru Vornicescu dessen Hilfsbereitschaft weit über die wissenschaftliche Zusammenarbeit hinausging und Nina Dassinger, die in vielerlei (wichtiger) Hinsicht zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank gilt auch Frau Claudia Schießl in Vertretung von Analytik Jena, die sich für die Bereitstellung der Biosensoren und Arbeitsmaterialien eingesetzt hat sowie für den technischen Support. Außerdem danke ich der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke e.V.“ (AiF) für die finanzielle Unterstützung.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Miethel und Frau Andrea Hellming bedanken, die mich freundlicherweise mit *Legionella pneumophila*-Zellen und (endlich!) passenden Antikörpern versorgt haben. Frau Hellming danke ich darüber hinaus für die bereitwillige Diskussion bei auftauchenden Fragen.

Außerdem danke ich folgenden Personen für die Zuarbeit, ohne welche die Argumentationskette meiner Arbeit weit weniger geschlossen ausgefallen wäre: Dr. Eyas Dayyoub, Dr. Jens Wallauer und Boris Strehlow.

Natürlich gilt mein herzlichster Dank meiner Frau und meiner Familie, die mich trotz verschlungener Pfade bis an mein Ziel begleitet haben und deren Beitrag nicht genügend gewürdigt werden kann. Wichtige persönliche Unterstützung hab ich auch von meinen Freunden Thomas Weitner, Daniel Beis, Thorsten Sauerwald, Serghei Glinca, Celia Nitardy, Jeremy Valluy, Andy Schaudig und Ursula Wiehl-Lee erfahren. Ganz besonders hat mich in dieser Zeit der Geist des viel zu früh verstorbenen Dr. Li Lee geprägt. Seinem Einfluss verdanke ich überaus viel.

<b>1.EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Biosensoren	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Anwendungen von Biosensoren	3
1.1.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)	4
1.1.3.1 Optische Grundlagen und Prinzipien der RIfS	4
1.1.3.1.1 Änderung der Intensität	6
1.1.3.1.2 Phasenverschiebung und optische Weglängendifferenz	6
1.1.3.1.3 Weiterführende Überlegungen	10
1.1.4 Immobilisierung der Biokomponenten auf Glasoberflächen	11
1.2 Probleme in der Biosensorik	15
1.2.1 Orientierte Antikörper-Immobilisierung	15
1.2.2 Regeneration von Oberflächen	18
1.2.3 Ganzzellbiosensoren	19
1.3 Legionella pneumophila	19
1.3.1 Systematik	20
1.3.2 Lebensbedingungen	20
1.3.3 Pathogenese	22
1.3.4 Legionellose	25
1.3.4.1 Legionärskrankheit	25
1.3.4.2 Pontiac-Fieber	27
1.3.4.3 Nosokomial, ambulant und auf Reisen erworbene Legionärskrankheit	27
1.3.5 Labordiagnostik bei klinischen Proben und Umweltproben	28
1.3.5.1 Immunfluoreszenz-Assays	28
1.3.5.2 Legionella-Antigen-Nachweis im Urin	29
1.3.5.3 Diagnose mittels PCR	30
1.3.5.4 Kulturtechniken	32
1.3.5.5 Zusammenfassung	33
1.3.6 Behandlung	34
1.4 Regenerierbare Oberflächen auf Zucker-Lektin-Basis zur gerichteten Antikörper-Immobilisierung	34
1.4.1 Streptavidin	35
1.4.2 Concanavalin A	36
1.4.3 Mannan und Mannose	39
1.4.4 Prinzip des ConA-SAv/Mannan-Systems	41
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>42</b>

<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>43</b>
3.1 Material	43
3.2 Methoden	49
3.2.1 Oberflächenmodifikationen	49
3.2.1.1 OF-Modifikation mittels 3-Octadecyltrimethoxysilan (OTS-Chips)	49
3.2.1.2 Mannan I: Klassische Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips	50
3.2.1.3 Mannan II: Protokoll zur Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips	52
3.2.1.4 Mannan III: Protokoll zur Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips	54
3.2.1.5 Mannan IV: Mannan-Funktionalisierung von OTS-OF	56
3.2.2 Legionellenkultivierung und -preparation	58
3.2.2.1 Legionella pneumophila-Zellen vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin des UKGM, Gießen (Leg1G)	58
3.2.2.2 Legionella pneumophila-Zellen vom Forschungsinstitut für Medizintechnik und Biotechnologie (FzMB), Bad Langensalza (Leg1P)	58
3.2.3 Nachweis der Antikörperbindung an <i>Legionella</i> in Mikrotiterplatten	59
3.2.4 Arbeiten mit dem BIAffinity®	60
3.2.4.1 Glassubstrate	60
3.2.4.2 Aufbau des BIAffinity®	61
3.2.4.3 Flusszelle (Micro Fluidic Cartridge)	62
3.2.4.4 Optik	63
3.2.4.5 Messstrategien	63
3.2.4.6 Vorbereitung einer Messung mit den BIAffinity®	66
3.2.4.7 Assay-Formate auf dem BIAffinity®	67
3.2.4.7.1 Experimente mit <i>Legionella pneumophila</i>	67
3.2.4.7.2 Experimente mit dem Fusionsprotein auf der Mannanoberfläche	68
3.2.5 Kontaktwinkelanalyse	68
3.2.5.1 Hintergrund	68
3.2.5.2 Verfahren der Auswertung	69
3.2.6 Proteinsynthese	70
3.2.7 SDS-Page	70
3.2.8 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	71
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>72</b>
4.0 Präparation von OTS-funktionalisierten Glaschips	72
4.0.1 Kontaktwinkelanalyse	72
4.1 Legionella pneumophila-Assay (RfS)	74
4.1.1 Antikörper-Immobilisierung auf OTS-Oberfläche (Sandwich-Assay-Format)	75

<b>4.1.1.1 Antikörpertests</b>	<b>75</b>
<b>4.1.1.2 Antikörper-Bindungstest in Mikrotiterplatten</b>	<b>75</b>
<b>4.1.1.3 Blockieren unspezifischer Bindestellen</b>	<b>76</b>
4.1.1.3.1 Test von Blockierungsreagenzien	76
4.1.1.3.2 BSA-Blockierung gegenüber Antikörpern	80
4.1.1.3.3 Blockierung gegenüber ganzen <i>L. pneumophila</i> -Zellen	81
4.1.1.3.4 AK237744-Wechselwirkung mit BSA	83
<b>4.1.1.4 Experimente mit Fängerantikörper AK237744</b>	<b>84</b>
<b>4.1.1.5 Experimente mit dem Fängerantikörper AK237744 mit vorhergehender BSA-Applikation</b>	<b>86</b>
<b>4.1.2 Antikörper-Immobilisierung auf OTS/Protein A-Oberfläche</b>	<b>87</b>
<b>4.1.3 ConA-SAv als Linker zwischen OTS-OF und Legionellen-Antikörpern</b>	<b>91</b>
<b>4.1.3.1 Vorversuche</b>	<b>91</b>
4.1.3.1.1 ConA-Immobilisierung auf OTS-funktionalisierten Glaschips	91
4.1.3.1.2 Streptavidin-Immobilisierung auf OTS funktionalisierten Glaschips	92
<b>4.1.3.2 ConA-SAv-Fusionsprotein-Immobilisierung auf OTS-funktionalisierten Glaschips</b>	<b>93</b>
<b>4.1.3.3 Legionellen-Experimente auf ConA-SAv-belegter OTS-Oberfläche</b>	<b>96</b>
<b>4.1.4 Legionella pneumophila-Immobilisierung auf OTS-Oberfläche (Direct-Assay-Format)</b>	<b>98</b>
<b>4.1.5 Experimente mit Leg1G3- bzw. Leg1E6-Antikörpern und Leg1P-Zellen auf OTS-OF</b>	<b>99</b>
<b>4.1.5.1 Vorversuche</b>	<b>100</b>
<b>4.1.5.2 Experimente mit Leg1G3-Antikörpern als Fänger-/Detektor-Antikörper im „Sandwich-Assay-Format“</b>	<b>101</b>
<b>4.1.5.3 Experimente mit Leg1G3-Antikörper als dAK im Direct-Assay-Format</b>	<b>103</b>
<b>4.1.5.4 Experimente mit Leg1P-Zellen und AK237744-Antikörper sowie Leg1E6</b>	<b>104</b>
4.1.5.4.1 Verwendung von AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK	104
4.1.5.4.2 Verwendung von Leg1E6 als fAK und dAK	105
<b>4.1.5.5 Leg1P-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK</b>	<b>106</b>
<b>4.1.5.6 Leg1P der Charge 4: Experimente mit AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK</b>	<b>109</b>
<b>4.1.5.7 Leg1P-Zellen (Charge 4): Leg1P(4)-Verdünnungsreihe mit Leg1G3 als fAK und Leg1E6 als dAK</b>	<b>110</b>
<b>4.1.5.8 Leg1P-Zellen (Charge 4): Leg1P(4)-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit Leg1E6 als dAK (DAF)</b>	<b>113</b>
<b>4.1.6 Experimente mit Lektinen als Fänger oder Detektor für Legionellen-Zellen</b>	<b>115</b>
<b>4.1.6.1 Lektine als Ersatz für Fängerantikörper</b>	<b>115</b>
4.1.6.1.1 ConA als Fänger von Leg1P(1)-Zellen	115
4.1.6.1.2 Persea-Lektin als Fänger von Leg1P(1)	116
4.1.6.2.1 Persea-Lektin als Ersatz für Detektionsantikörper	117
<b>4.1.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Chips mit immobilisierten Legionellen (SAF)</b>	<b>117</b>
<b>4.1.7.1 Sandwich Assay Format mit Leg1P(4) Zellen und Leg1G3 als fAK</b>	<b>118</b>
<b>4.1.7.2 Sandwich Assay Format mit Leg1P(1) Zellen und AK237744 als fAK</b>	<b>120</b>
<b>4.1.7.3 Vergleich der Zellgrößen von Leg1P(1) und Leg1P(4)</b>	<b>121</b>
<b>4.1.7.4 Direct Assay Format mit Leg1P(1) Zellen</b>	<b>122</b>

<b>4.2 Experimente mit dem rekombinanten Fusionsprotein ConA-SAv auf Mannan-OF</b>	<b>123</b>
<b>4.2.1 Ergebnisse FP-Mannan-Experimente (Rifs)</b>	<b>123</b>
<b>4.2.1.1. Mannan I: Mannan-Funktionalisierung nach Hartmann und Vornholt</b>	<b>123</b>
<b>4.3.1.2 Mannan II: Experimente mit Mannan-OF gemäß modifiziertem Mannan-Protokoll</b>	<b>128</b>
<b>4.3.1.3 Mannan IV: Mannan-Funktionalisierung von OTS-Oberflächen</b>	<b>132</b>
<b>4.3.1.4 Mannan III</b>	<b>136</b>
4.3.1.4.1 Vergleichsuntersuchung	136
4.3.1.4.2 Wiederholte ConA-Immobilisierung	140
4.3.1.4.3 Unterschiedliche ConA-Konzentrationen	141
4.3.1.4.4 Sättigung der Mannan-OF mit ConA	142
4.3.1.4.5 Regeneration der Mannan III-OF mit aMP und TritonX 100	143
<b>4.3.2 Mannan-Funktionalisierung von Mikrotiterplatten</b>	<b>145</b>
<b>4.3.2.1 Experimente mit ConA</b>	<b>145</b>
4.3.2.1.1 Immobilisierung von Mannan auf Polystyrol	145
4.3.2.1.2 Mannan-Immobilisierung auf Polystyrol in verschiedenen Puffern	146
4.3.2.1.3 Konzentration von Mannan	147
4.3.2.1.4 Inkubationszeit von Mannan auf Polystyrol	148
4.3.2.1.5 Konzentration von BSA zum Blockieren	149
4.3.2.1.6 ConA-Verdünnungsreihe	149
4.3.2.1.7 Pufferabhängigkeit der ConA-Immobilisierung	150
4.3.2.1.8 Regenerationsexperimente	152
<b>4.3.2.2 Experimente mit ConA-SAv-FP</b>	<b>154</b>
4.3.2.2.1 Einfluss des Puffers auf ConA-SAv-Immobilisierung	154
4.3.2.2.2 Einfluss des Puffers auf ConA-SAv-Regeneration mit aMP	157
4.3.2.2.3 Kontrollexperimente bezüglich eines Proof of Principle	159
4.3.2.2.4 Proof of Principle unter Verwendung unterschiedlicher Regenerationsmittel	160
4.3.2.2.5 Einfluss des Antikörpers auf die Regeneration	162
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>164</b>
<b>5.0.1 Kontaktwinkelanalyse</b>	<b>164</b>
<b>5.0.2 Zellzahlbestimmung</b>	<b>165</b>
<b>5.1 Versuche zur Detektion von <i>L. pneumophila</i> mit immobilisierten Fängerantikörpern (Sandwich-Assay-Format)</b>	<b>166</b>
<b>5.1.1 Experimente mit fAKs und Leg1G-Zellen</b>	<b>166</b>
<b>5.1.1.1 Antikörpertest</b>	<b>166</b>
<b>5.1.1.2 Blockierung unspezifischer Bindestellen (Rifs)</b>	<b>167</b>
<b>5.1.1.3 BSA-Blockierung gegenüber Antikörpern und Zellen</b>	<b>169</b>
<b>5.1.1.4 AK237744-Wechselwirkung mit BSA</b>	<b>171</b>
<b>5.1.1.5 Experimente mit immobilisierten Antikörpern (hydrophobe Wechselwirkung)</b>	<b>171</b>

5.1.1.6 Antikörper-Immobilisierung auf OTS/Protein A-Oberfläche	175
5.1.1.7 Antikörperimmobilisierung auf OTS/ConA-SAv-Oberfläche	178
5.1.2 Experimente mit fAKs und Leg1G-Zellen	183
5.1.2.1 Vorversuche	183
5.1.2.2 Experimente mit Leg1P und Leg1G3 als fAK und dAK	184
5.1.2.3 Experimente mit AK237744 als fAK und Leg1E6 als dAK für Leg1P-Zellen	185
5.1.2.4 Experimente mit Leg1E6 als fAK und dAK für Leg1P-Zellen	187
5.1.2.5 Leg1P-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK	187
5.1.2.6 Experimente mit Leg1P-Zellen der 4. Charge	189
5.2 Experimente zur Detektion von <i>L. pneumophila</i> -Zellen im Direct-Assay-Format	194
5.3 Experimente mit Lektinen als Fänger oder Detektor für Legionellen-Zellen (Leg1P(1))	195
5.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Chips mit immobilisierten Legionellen	197
5.4.1 Sandwich-Assay-Format mit Leg1P(4) Zellen und Leg1G3 als fAK	197
5.4.2 Direct-Assay-Format mit Leg1P(1) Zellen	201
5.5 Ergebnisse der ConA-SAv-Mannan-Experimente (Rifs)	202
5.5.1 Mannan-Funktionalisierung auf APTES-OF 1	202
5.5.2 Mannan-Funktionalisierung von OTS-Oberflächen	208
5.5.3 Manna-Funktionalisierung auf APTES-OF 2	212
5.5.3.1 Vergleichsuntersuchung	212
5.5.3.2 Wiederholte ConA-Immobilisierung	214
5.5.3.3 Unterschiedliche ConA-Konzentrationen	215
5.5.3.4 Sättigung der Mannan-OF mit ConA	216
5.5.3.5 Regeneration der Mannan III-OF mit aMP und TritonX 100	216
5.6 Mannan-Funktionalisierung von Mikrotiterplatten	217
5.6.1 Immobilisierung von Mannan auf Polystyrol	218
5.6.2 Experimente mit ConA-SAv-FP	220
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>225</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>229</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>242</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>245</b>

# 1. Einführung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Problemen biosensorischer Applikationen. Eines dieser Probleme betrifft die Anwendbarkeit von optischen Biosensoren in Assays zur quantitativen Bestimmung von ganzen Zellen wie z.B. Bakterien. In der Regel sind solche Assays nicht praktikabel, da die meisten Pathogene in weit geringerer Konzentration in einer Matrix vorkommen, als dass sie mit optischen Biosensoren gut nachgewiesen werden könnten. Das Messprinzip des hier verwendeten Biosensors wird mit dem Begriff *reflektometrische Interferenzspektroskopie* bezeichnet. Aus bestimmten Gründen, die auszuführen sein werden, könnte diese Art Biosensor in Ganzzell-Applikationen bessere Ergebnisse liefern. Bisher sind keine Studien bekannt, in denen das RfS-Prinzip auf die Ganzzell-Problematik angewendet worden ist.

Zwei weitere Probleme betreffen die Wiederverwendung der in der Biosensorik verwendeten Bioaffinitätsmodule und die gerichtete Immobilisierung von Biomolekülen auf Trägeroberflächen für Biosensoren. Meist werden Träger für die Bioaffinitätsmodule verwendet, auf denen Biomoleküle mehr oder weniger ohne Kontrolle der Orientierung von deren Bindestellen immobilisiert werden. Die Orientierung derselben ist für einen funktionierenden Assay jedoch kritisch. Außerdem können derartige Bioaffinitätsmodule meist nur einmalig verwendet werden, so dass der Gebrauch unökonomisch und ineffizient ist. Methoden zur Regeneration des Trägers könnten daher zu erheblichen zeitlichen und finanziellen Einsparungen beitragen.

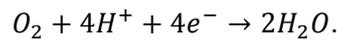
Diese Einführung besteht aus fünf Abschnitten, die auf das Thema der Arbeit hinführen. Im ersten Teil werden zunächst Grundlagen der Biosensorik, speziell der optischen Biosensoren am Beispiel der *reflektometrischen Interferenzspektroskopie*, behandelt. Danach folgt im zweiten Teil ein Überblick über die Möglichkeiten, mittels oberflächenchemischer Verfahren Biomoleküle auf geeigneten Trägern zu immobilisieren. Anschließend werden im dritten Teil die bereits angedeuteten Probleme der Biosensorik vorgestellt. Im vierten Teil wird das Bakterium *Legionella pneumophila* vorgestellt, welches wegen seiner Rolle als gefährliches Pathogen im Ganzzell-Biosensorik-Teil dieser Arbeit als Modell-Bakterium verwendet wurde. Der fünfte Teil stellt einen Lösungsansatz vor, der im Arbeitskreis von Prof. Dr. Keusgen zur Lösung des Regenerationsproblems entwickelt wurde.

## 1.1 Biosensoren

### 1.1.1 Allgemeines

Im Jahr 1962 veröffentlichten Leland C. Clark Jr. und Champ Lyons in den „Annals of the New York Academy of Science“ ihr Papier „Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery“ (Clark & Lyons, 1962), in dem sie das erste Konzept eines Biosensors beschrieben. Ihre Innova-

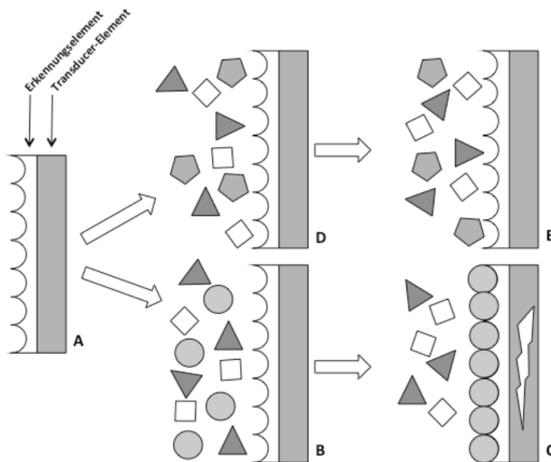
tion nannten sie „Enzymelektrode“, da es sich bei ihrem Biosensor um eine Sauerstoffelektrode handelte, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zu zwei semipermeablen Dialysemembran angeordnet war, in die eine Oxidoreduktase eingebettet wurde. Die Oxidoreduktase katalysiert die Reaktion von Glukose unter Sauerstoffverbrauch zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Die auf -0,7 V polarisierte Sensor-Platinkathode registriert die Abnahme der Sauerstoffkonzentration durch die Reaktion (Wang, 2008):



Auf Basis ihrer Arbeit kam zwölf Jahre später der erste Glukosesensor für die Bestimmung von Glucose im Blut auf den Markt (Hall, 1995, S. 14). Inzwischen haben sich Biosensoren auf vielfältige Weise weiterentwickelt sowohl was ihre Detektionsprinzipien als auch was ihre Einsatzbereiche angeht. Der Begriff Biosensor nimmt heute einen breiten Raum in der Analytik ein und unterliegt einer strengen Definition. Demnach spricht man von einem Biosensor, wenn ein biologisches Erkennungselement (=Bioaffinitätsmodul) und ein Transducer-Element in unmittelbarem räumlichen Kontakt zu einander stehen (Keusgen, 2002). Sie bilden ein abgeschlossenes, integriertes System zur spezifischen Erhebung quantitativer oder halbquantitativer Daten. Wie in Abb. 1.1 dargestellt, steht das biologische Erkennungselement in Kontakt mit einer Umgebung potentiell interessanter Analyten. An der Kontaktfläche zur Umgebung werden Biomoleküle wie Antikörper, Lektine, Enzyme etc. immobilisiert. Die spezifische Bindung der Biomoleküle am Erkennungselement mit potentiell in der Umgebung vorhandenen Analyten führt zu einer Änderung in einem oder mehreren physiko-chemischen Parametern (Brechungsindex, optische Schichtdicke etc.). Diese werden am Transducer zu einem elektrischen Signal umgewandelt. Erfolgt wegen Inkompatibilität des Analyten mit den Biomolekülen auf der Oberfläche keine Bindung, kommt es auch zu keiner Signaltransduktion.

Von einem Biosensor wird erwartet, dass er hohe Spezifität gegenüber potentiellen Analyten besitzt und im gewünschten Konzentrationsbereich brauchbare Daten aufnimmt (Sensitivität). Es wird hohe Stabilität während des Betriebs (Temperatur, pH, etc.) gefordert sowie eine kurze Ansprechzeit (Sethi, 1994). Außerdem soll er reversibel sein, d.h., mehrere Messungen zulassen. Außerdem sollte das Signal-Rausch-Verhältnis groß sein, die Ansprechzeit kurz, die Detektionsgrenzen niedrig und die Kosten gering. Ferner sollte der Biosensor auch zur Analyse von Realproben einsetzbar sein (Gauglitz, 2004). Sethi unterteilt Biosensoren in vier Klassen und bezieht sich dabei auf die unterschiedlichen Transducer-Systeme. Die erste Gruppe umfasst alle Sensoren auf Basis von elektrochemischen Prozessen. Dazu zählen Verfahren zur Messung von Veränderungen in der Konduktivität oder Impedanz sowie amperometrische (z.B. Enzymelektroden) und potentiometrische (z.B. Field Effect Transistors, Ion-Selective Electrodes) Methoden. Eine zweite Gruppe bilden Transducer-Systeme, die auf dem

piezoelektrischen Effekt basieren und Massenänderungen am Erkennungselement in elektrische Signale umwandeln (z.B. Quarz Crystal Microbalance (QCM)). In die dritte Gruppe gehören alle optischen Biosensoren (z.B. Surface Plasmon Resonance (SPR), Reflectometric Interferenz Spektroskopie (RIFS)) und in die vierte Biosensoren, die auf kalorimetrischem Wege Signale erfassen (Sethi, 1994).



**Abb. 1.1: Prinzip eines Biosensors.** A - Biosensor aus einem biologischen Erkennungselement und einem Transducer-Element. B – Das biologische Erkennungs-Element kommt in Kontakt mit einer Umgebung, welche zum Erkennungselement kompatible Analyten enthält. C – Das Erkennungselement bindet den kompatiblen Analyten. Es kommt zu einer Signaltransduktion. D - Das Erkennungs-Element kommt in Kontakt mit einer Umgebung, welche zum Erkennungselement inkompatible Analyten enthält. E – Der inkompatible Analyt kann nicht gebunden werden. Es kommt zu keiner Signaltransduktion.

### 1.1.2 Anwendungen von Biosensoren

Biosensoren finden Anwendung in vielen Bereichen. In der klinischen Diagnostik werden sie häufig eingesetzt, um langwierige Analyseverfahren zu ersetzen. So ist der Einsatz von Biosensoren in der Parameterkontrolle von Patienten, deren biochemische Parameter sich schnell und häufig ändern, etabliert (D`Orazio, 2003). Zum Beispiel werden Glukosesensoren eingesetzt, um den Blutzuckerspiegel bei Diabetes mellitus-Patienten zu kontrollieren (Fogh-Andersen & D`Orazio, 1998). Ein weiteres Einsatzgebiet für Biosensoren ist die Prozesskontrolle. Brooks et al. beschrieben eine Dimethylferrocen-vermittelte Enzymelektrode für Glukose zur Online-Kontrolle von Fermentationsprozessen (Brooks et al., 1987/88). Auch in der Überwachung von Umweltparametern finden Biosensoren Anwendung. Z.B. kann mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIFS) die Verschmutzung von Wasser durch organische Substanzen festgestellt werden (Yan et al., 1995). Avramescu et al. beschreiben amperometrische Biosensoren auf Basis von Graphitelektroden, bei denen Tyrosinase, NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenase und Acetylcholinesterase als Biokomponente verwendet wurden, zur Analyse von Umweltparametern und zur Nahrungsmittelkontrolle (Avramescu et al., 2002). Biosensoren können auch bei der Detektion von pathogenen Bakterien in Nahrungsmitteln eingesetzt werden (Ivnitski et al., 1999; Mazumdar et al., 2007). Auch Serotypisierungen von Bakterien mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ist für Salmonellen gezeigt worden (Mazumdar et al., 2010).

In der Forschung sind Biosensoren ebenfalls von großer Bedeutung. Bioaffinitätsstudien (BIA) spielen gerade in der postgenomischen Zeit eine große Rolle, da es nun darum geht das Proteom zu entschlüsseln und die vielfältigen Interaktionswege von Proteinen zu kartieren (McDonnell, 2001). Bio-

## 1 | EINFÜHRUNG

sensoren eignen sich besonders gut, um Interaktionen nachzuweisen und ihre kinetischen Parameter zu bestimmen. Myzka et al. untersuchten z.B. die Interaktion des humanen T-Zellen-Rezeptors CD4 und einem monoclonalen anti-CD4-Antikörper mittels SPR und bestimmten die kinetischen Parameter (Myzka et al., 1997). Domagala et al. untersuchten die Interaktion von EGF (epidermal growth factor) und der löslichen, extrazellulären Domäne des Rezeptors sEGFR u.a. mittels SPR (Domagala et al., 2000). Auch bei der Suche nach neuen Wirkstoffen sind Biosensoren im Kontext der „target identification“, des „ligand fishing“ etc. hilfreich (Cooper, 2002). Eine Methode zur Suche nach interessanten Lektinen wurde mit Hilfe der Spektralphaseninterferenz für spezielle Zuckeroberflächen gezeigt (Hartmann et al., 2006).

### 1.1.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)

Die RIFS ist eine Methode zur biologischen Interaktionsanalyse (BIA), die in optischen Biosensoren Anwendung findet. Die BIA findet hier ohne die chemische Modifizierung des Analyten durch Markierungen bzw. Labels statt. Das stellt einen Vorteil gegenüber Methoden wie dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dar (Gaits, 2003). Problematisch ist bei solchen Methoden die Modifizierung der Zielstruktur mit Markern/Labels, da die Modifizierung selbst zu einer Funktionsveränderung oder sogar zu einem Funktionsverlust führen kann. Bei der RIFS dagegen wird ein Interaktionspartner auf einer Oberfläche immobilisiert, während der andere ohne jegliche Veränderung bleibt. Bei der Verwendung des Lichts kommen bei der RIFS ganz andere Prinzipien zum tragen, die im folgenden ausgeführt werden sollen

#### 1.1.3.1 Optische Grundlagen und Prinzipien der RIFS

Als Licht wird im engeren Sinne der sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums bezeichnet (Wellenlängen  $\lambda$  von 380 nm bis 750 nm). Licht, welches sich in einem Medium bewegt (z.B. Luft oder Glas), wird von den Atomen im Medium absorbiert und direkt wieder mit der gleichen Frequenz in alle Richtungen emittiert. Dabei gehen von den Atomen Elementarwellen aus, deren Einhüllende die Wellenfront darstellt. In homogenen Medien breitet es sich geradlinig aus. Tritt eine Inhomogenität auf, wird es von seiner Bahn abgelenkt. Der Übergang von Licht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes stellt eine solche Inhomogenität dar. Ein Teil des Lichts wird reflektiert, ein anderer Teil wird transmittiert. Dabei gilt, dass der Einfallswinkel und der Ausfallwinkel des reflektierten Strahls gleich groß sind und sich die beiden Strahlen in einer Ebene befinden. Außerdem gilt das Snellius'sche Brechungsgesetz:

$$n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta \quad (1)$$

Es besagt, dass der transmittierte Teil des Lichts im Glas seine Ausbreitungsrichtung ändert. Trifft ein Lichtstrahl  $\mathbf{S}_e$  aus einem Medium mit der Brechzahl  $n_1$  kommend auf eine Grenzfläche  $G$ , wird ein Teil des Lichts unter dem Einfallswinkel  $\alpha$  zur Normalen  $\mathbf{N}$  der Grenzfläche reflektiert. Ein weiterer Teil des Lichts wird gebrochen und in einem anderen Medium mit einer Brechzahl  $n_2$  (mit  $n_1 \neq n_2$ ) unter dem Brechungswinkel  $\beta$  zur Normalen transmittiert. Trifft der Lichtstrahl senkrecht auf die Grenzfläche, betragen sowohl der Einfallswinkel als auch der Brechungswinkel  $0^\circ$ . Wird der Einfallswinkel vergrößert, nehmen auch die Winkel des reflektierten Strahls und des gebrochenen Strahls zu. Schließlich wird ein kritischer Winkel  $\alpha_K$  erreicht, bei dem der Brechungswinkel  $90^\circ$  beträgt. Für  $\alpha_K$  gilt dann gemäß Gleichung 1 mit  $\sin \alpha_1=1$ :

$$\sin \alpha_K = \frac{n_2}{n_1} \quad (2)$$

Bei der RfS werden wiederholte Reflexionen und Transmissionen von Licht an verschiedenen Grenzflächen genutzt, um Aufschluss über die optische Schichtdicke zu erhalten. Während eines biologischen Interaktionsexperimentes wird in jedem Schritt eine weitere Schicht an Biomolekülen aufgetragen. Dabei entsteht auch eine weitere Grenzfläche an der das Licht von einem Medium einer bestimmten Brechzahl in ein Medium einer anderen Brechzahl übergehen muss.

Im Lauf eines RfS-Experiments kommt es zu wiederholten Reflexions- und Transmissionsvorgängen. Die jeweils an unterschiedlichen Grenzflächen reflektierten Strahlen überlagern einander und interferieren gemäß dem Superpositionsprinzip (Gauglitz, 2004). Konstruktive und destruktive Interferenz hängen dabei vom Einfallswinkel des eingestrahnten Lichts, der Wellenlänge und der optischen Dichte der Schicht ab. Letztere ist das Produkt aus absoluter Schichtdicke und Brechungsindex. Der Brechungsindex ist eine optische Materialeigenschaft. Er ist eine dimensionslose, frequenz- und wellenlängenabhängige Größe, die über das Verhältnis der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c_{\text{Vakuum}}$  zur Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c_{\text{Medium}}$  des Lichts in einem Medium  $M$  definiert ist:

$$n = \frac{c_0}{c_M} \quad (3)$$

Für die optische Schichtdicke  $\delta$  gilt folgende Formel:

$$\delta = \mathbf{nd} \quad (4)$$

Bei Änderungen in einer Schicht oder an einer Schicht verändern sich auch die Eigenschaften, welche den Durchgang des Lichts durch diese Schichten beeinflussen. Lagern sich aufgrund von Bioaffinitäten auf einer bereits existierenden Schicht eine weitere Schicht an, so besitzt diese eine absolute Dicke und meist einen anderen Brechungsindex als der von zuvor aufgelagerten Schichten von Biomolekülen. Zusammen machen beide die optische Schichtdicke (OSD) aus.

## 1 | EINFÜHRUNG

Es gibt zwei Größen, die das Licht betreffen und die sich im Laufe eines Experiments ändern:

1. Die Intensität sowohl des reflektierten als auch des transmittierten Lichts nimmt bei jedem Grenzflächenübergang ab.
2. Es kommt aufgrund von verschiedenen optischen Weglängen zu Phasenverschiebungen zwischen den an verschiedenen Grenzflächen reflektierten Lichtstrahlen, welche die optische Schichtdicke reflektieren .

Im Folgenden wird auf die Intensitätsänderungen und die Phasenänderungen eingegangen.

### 1.1.3.1.1 Änderung der Intensität

Die Intensität ist eine Energiegröße, da sie der Beschreibung eines Energieflusses dient, d.h., einer Leistung, die durch eine Fläche hindurchläuft, bezogen auf diese Fläche.

Mit  $I_e$  als der Intensität des einfallenden Lichts lassen sich die folgende Formeln für die Intensität des reflektierten Lichts  $I_r$  und des gebrochenen bzw. transmittierten  $I_t$  Lichts angeben:

$$I_r = \left( \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 I_e \quad (5)$$

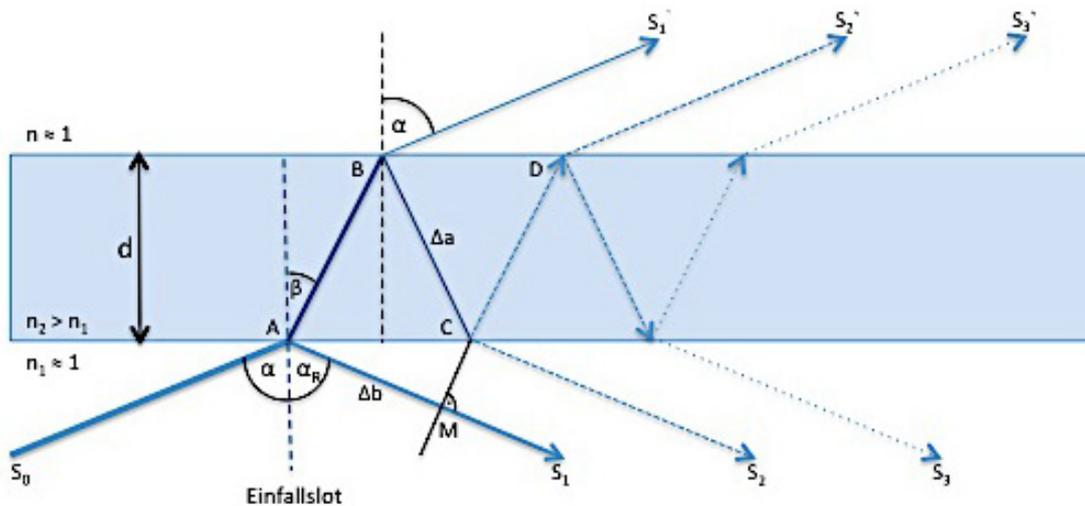
für die Intensität  $I_r$  des reflektierten Lichts und:

$$I_t = \left( \frac{2n_1}{n_1 + n_2} \right)^2 I_e \quad (6)$$

für die Intensität  $I_t$  des transmittierten Lichts. Für einen Übergang von Licht aus Luft zu Glas ergibt sich mit den Brechungsindizes  $n_1 \approx 1$  (Luft) und  $n_2 \approx 1,5$  (Glas), dass lediglich 4 % der Energie reflektiert werden (Tipler, 1994).

### 1.1.3.1.2 Phasenverschiebung und optische Weglängendifferenz

Neben der Änderung in der Intensität kommt es zu Verschiebungen in der Phase der Wellen. Ein Strahl  $S_0$  monochromatischen Lichts der Wellenlänge  $\lambda$  trifft unter dem Einfallswinkel  $\alpha$  (zur Grenzflächennormalen  $\mathbf{N}$ ) auf eine dünne Schicht mit der Dicke  $d$  ( $d = \text{konstant}$ ) (Abb. 1.2). Die dünne Schicht ist von Luft der Brechzahl  $n_1 \approx 1$  umgeben und hat selbst die Brechzahl  $n_0 > n_{\text{Luft}} \approx 1$ . Der Strahl wird im Punkt A an der Oberfläche am optisch dichteren Medium unter dem Winkel  $\alpha$  teilweise reflektiert und teilweise transmittiert.



**Abb. 1.2: Interferenz an dünnen Schichten.** Die Abbildung zeigt eine dünne Schicht (blau), auf welche der Lichtstrahl  $S_0$  in Punkt A einfällt.  $S_0$  wird teilweise gebrochen und setzt sich auf der Strecke AB fort und teilweise reflektiert ( $S_1$ ). In Punkt B wird er wiederum teilweise gebrochen und setzt sich als Strahl  $S_1'$  fort und teilweise reflektiert ( $\Delta a$ ). Auf diese Weise pflanzt sich der Strahl weiter fort. Weitere Erklärungen siehe Text.

Durch den Kontakt mit einem optisch dichteren Medium kommt es bei der Reflexion zu einem Phasensprung um den Betrag  $\pi$ . Die Phase des reflektierten Strahls  $S_1$  ist demnach gegenüber  $S_0$  um  $\pi$  verschoben. Der andere Teil des Strahls  $S_0$  wird an der Oberfläche im Winkel  $\beta$  zur Normalen  $\mathbf{N}$  hin gebrochen und dringt in das dichtere Medium ein. Dabei kommt es auch zu einem Phasensprung um den Betrag  $\pi$ . Der Strahl läuft durch das Medium bis er wieder auf eine Grenzfläche trifft, an der er im Punkt B wieder teilweise reflektiert und teilweise gebrochen wird. Der reflektierte Strahl läuft durch das Medium zum Punkt C. Der gebrochene Strahl tritt am Punkt B als Strahl  $S_1'$  im Winkel  $\alpha$  zur Normalen aus dem optisch dichteren Medium wieder aus, diesmal ohne Phasensprung, da der Übergang nun zu einem optisch weniger dichten Medium erfolgt. Der reflektierte Strahl wird wiederum in Punkt C teilweise gebrochen (und verlässt das optisch dichtere Medium als Strahl  $S_2$  ohne Phasensprung unter dem Winkel  $\alpha$ ) und teilweise reflektiert usw. Für die Transmissionen gilt das Snelliusche Brechungsgesetz, wonach  $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta$  gilt und für die Reflexion  $\alpha = \alpha_R$  (mit  $\alpha =$  Einfallswinkel;  $\alpha_R =$  Reflexionswinkel). Die Strahlen  $S_1, S_2, S_3$  usw. und die Strahlen  $S_1', S_2', S_3'$  usw. interferieren und erzeugen ein beobachtbares Interferenzmuster.

Bei derartigen Reflexionen kommt es zu einer Phasendifferenz  $\Delta\Phi$  zwischen den Strahlen  $S_1$  und  $S_2$ . Die Phasendifferenz ergibt sich aus dem optischen Weglängenunterschied zwischen den optischen Weglängen  $\Delta_a$  und  $\Delta_b$ . Für reflektierte Strahlen  $S_1, S_2, S_3 \dots$  gelten folgende Überlegungen.

Die optische Weglänge  $\Delta b$  ergibt sich unter Berücksichtigung des Phasensprungs um  $\pi$  zu:

$$\Delta b = n_1 \overline{AM} - \frac{\lambda}{2} \quad (7)$$

## 1 | EINFÜHRUNG

mit  $n_1 \approx 1$ :

$$\Delta b = \overline{AM} - \frac{\lambda}{2} \quad (8)$$

Mit Hilfe des Dreiecks ACM berechnet sich die Strecke AM wie folgt:

$$\cos(90^\circ - \alpha_R) = \sin \alpha_R = \frac{\overline{AM}}{\overline{AC}} \quad (9)$$

Mit Hilfe des Dreiecks ABC ergibt sich die Strecke AC zu:

$$\tan \beta = \frac{\overline{AC}}{2d} \quad (10)$$

Durch Umstellen der Gleichung (9) zu  $\overline{AM} = \sin \alpha_R \overline{AC}$  ergibt sich unter Verwendung der Gleichung (10) und Einsetzen in Gleichung (8):

$$\Delta b = 2d \sin \alpha_R \tan \beta - \frac{\lambda}{2} \quad (11)$$

Substituiert man  $\tan \beta_T$  mit der Umrechnungsformel:

$$\tan \beta_T = \frac{\sin \beta}{\sqrt{1 - \sin \beta \sin \beta}} \quad (12)$$

und  $\sin \beta$  durch die aus dem Brechungsgesetz folgenden Beziehung der Winkel  $\alpha$  und  $\beta$  :

$$\sin \beta_T = \frac{1}{n_0} \sin \alpha_R \quad (13)$$

so erhält man den Ausdruck:

$$\Delta b = \frac{2d(\sin \alpha_R)^2}{\sqrt{n_0^2 - (\sin \alpha_R)^2}} - \frac{\lambda}{2} \quad (14)$$

Die Bestimmung der optischen Weglänge  $\Delta a$  von Strahl a geht von der Beziehung aus:

$$\Delta a = 2n_0 \overline{AB} \quad (15)$$

Das Dreieck ABC liefert den folgenden Ausdruck:

$$\sin \beta = \frac{\overline{AC}}{2\overline{AB}} \quad (16)$$

Aus Gleichung (10) lässt sich die Formel für die Strecke AC entnehmen zu:

$$\overline{AC} = \tan \beta \times 2d \quad (17)$$

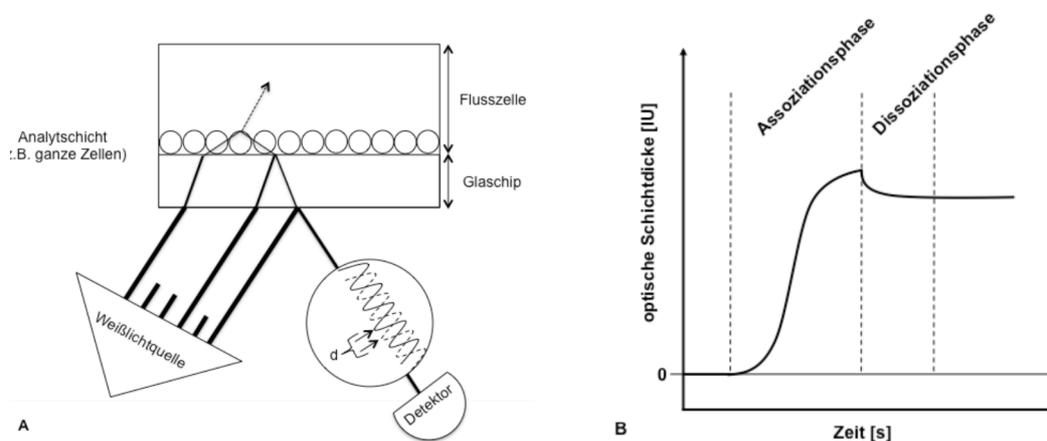
Mit Hilfe dieser Umrechnung und den Beziehungen (12) und (13) ergibt sich:

$$\Delta a = \frac{2n_0^2 d}{\sqrt{n_0^2 - \sin^2 \alpha}} \quad (18)$$

Die optische Weglängendifferenz  $\Delta_{ab}$  beträgt dann:

$$a_{ab} = \Delta_a - \Delta_b = 2d\sqrt{n_0^2 - (\sin \alpha_R)^2} + \frac{\lambda}{2} \quad (19)$$

Bei Sichtwinkeln  $\alpha_s$  für die gilt  $\Delta\alpha_s = \frac{\lambda}{2}(2s + 1)$  mit  $s = 1, 2, 3, \dots, n$  wird ein Intensitätsminimum beobachtet, da es an Beobachtungspunkten unter diesen Winkeln durch die Phasenverschiebung zu destruktiver Interferenz kommt.



**Abb. 1.3: Prinzip der RIFS.** A) Eine Weißlichtquelle strahlt Licht von unten auf den Glaschip auf dem bereits eine Schicht eines Analyten immobilisiert worden ist. An jeder Grenzfläche wird der Strahl teilweise gebrochen und teilweise reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern einander. Durch die unterschiedlich langen Wege, die der Lichtstrahl wegen der optischen Eigenschaften zurücklegt, kommt es zu einer Phasenverschiebung  $d$  der einzelnen Teilstrahlen. Das führt zu Interferenzmustern, die vom Detektor registriert werden. Bei Auflagerung weiterer Schichten ändern sich die Interferenzmuster, was sich in einer Änderung des Signals äußert. B) Solange keine Assoziation stattfindet, wird eine Basislinie aufgezeichnet. Mit der Assoziation einer Biokomponente verändern sich die Interferenzmuster aufgrund von Änderungen in den optischen Eigenschaften der sich neu etablierenden Schicht. Die Bindungskurve zeigt eine für die Assoziationsphase typische Gestalt. Nach Beendigung der Injektion setzt der Pufferstrom ein, wodurch lose gebundene Komponenten wieder dissoziieren. Die Kurve nimmt den für die Dissoziationsphase typischen Verlauf. Nach Beendigung der Dissoziationsphase geht die Kurve in eine „steady-state“-Phase über (entspricht der Situation in A, wenn sich die neue Schicht vollständig etabliert hat).

## 1 | EINFÜHRUNG

Benutzt man statt monochromatischem Licht Weißlicht, so kann es unter einem Winkel  $\alpha$ , für den die obige Bedingung für destruktive Interferenz erfüllt ist, zur Auslöschung einer bestimmten Wellenlänge kommen, so dass man unter dem entsprechenden Sichtwinkel  $\alpha_s$  die Komplementärfarbe beobachten kann.

Ähnliches gilt auch für die transmittierten Strahlen  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ... mit dem Unterschied, dass es beim Übergang vom optisch dichteren zum optisch weniger dichten Medium (in diesem Beispiel Luft) zu keinem Phasensprung kommt. Das resultierende Interferenzmuster ist abhängig von der Wellenlänge, der optischen Schichtdicke, dem Einfallswinkel des Lichts und dem Brechungsindex des umgebenden Interaktionsmediums (Proll et al., 2009). Gemessen wird die optische Schichtdicke, während die anderen Variablen konstant gehalten werden. Sie wird aus dem sich ändernden Interferenzmuster abgeleitet. Das Messprinzip ist in der Abb. 1.3 zusammengefasst dargestellt.

### 1.1.3.1.3 Weiterführende Überlegungen

Die RlFS basiert auf Weißlicht, welches an transparenten, dünnen Schichten teilweise gebrochen und teilweise reflektiert wird. Die an den aufeinanderfolgenden Schichten reflektierten Strahlen interferieren und erzeugen ein Interferenzmuster, welches von einem Spektrometer aufgenommen wird. Voraussetzung für das Interferieren ist, dass die Kohärenzlänge des Lichts kleiner ist, als die optische Schichtdicke. Im Falle von Weißlicht werden in einem Zeitintervall  $\tau$  von einer Lichtquelle sehr viele unterschiedliche Wellenzüge ausgestrahlt, deren einzelne Phasen statistisch verteilt sind. Wenn das Zeitintervall  $\tau$  verstrichen ist, sendet die Lichtquelle ein Strahlenbündel aus, welches zum vorherigen in keiner Beziehung steht. Das heißt, dass nach Ablauf von  $\tau$  sich das Verhältnis der Phasen zueinander völlig verändert hat. Bei kohärentem Licht dagegen bleibt die Phasendifferenz konstant. Während eines Intervalls  $\tau$  ist das Licht demnach kohärent, so dass  $\tau$  als Kohärenzzeit angegeben werden kann. Die Kohärenzlänge  $l_k$  ergibt sich als Produkt der Lichtgeschwindigkeit  $c$  und Kohärenzzeit  $\tau$ . Sie gibt die räumliche Ausdehnung des Wellenzugs an. Licht, welches in  $\tau$  ausgesendet wurde und im Raum den Weg  $l_k$  zurücklegt, heißt demnach kohärent, weil die Phasendifferenzen der einzelnen Wellen untereinander konstant bleiben. Die Phasendifferenz verändert sich auch ständig, wenn Licht unterschiedlicher Frequenz interferiert, so dass auch in diesem Fall keine stabile Interferenz zu beobachten ist. Da die RlFS eine reflektometrische Methode ist, wird dieses Kohärenzproblem elegant gelöst. Das Licht, welches im Intervall  $\tau$  ausgesendet wird, wird an den Grenzflächen reflektiert. Das, was hier zur Interferenz gebracht wird, sind also Wellen, welche bei Emission in einer festen Phasenbeziehung zueinander stehen. Dies ändert sich auch nicht, wenn sie innerhalb von  $\tau$  an den Grenzflächen reflektiert werden. Die Teilwellen, welche nach unterschiedlich häufigem Grenzflächenkontakt am Ende miteinander interferieren sind zwar in der Phase verschoben, jedoch nur, weil die einzelnen

Teilstrahlen des kohärenten Lichtbündels unterschiedlich lange Strecken zurücklegen mussten. Allein aus diesem Grund weisen sie einen Gangunterschied auf. Licht, das an dünnen Schichten reflektiert wird, ist also kohärent. Die Kohärenz ist dadurch gegeben, dass die interferierenden Wellen aus demselben Wellenbündel stammen. Dadurch können theoretisch Schichten von einer halben Kohärenzlänge vermessen werden (die andere Hälfte gehört dem Rückweg der zuletzt reflektierten Strahlen). Das jedoch wird durch die Höhendimension der Flusszelle der verwendeten RIFS-Plattform (hier: BIAffinty®, Analytik Jena) erheblich eingeschränkt. Der mögliche Messbereich ist demnach prinzipiell durch die Höhe der Kanäle der Flusszelle begrenzt. Hier besteht ein großer Unterschied zur Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR), bei welcher der Messbereich auf das sogenannte evaneszente Feld beschränkt ist, welches lediglich einige 100 nm in den Raum über der Oberfläche (OF) hinausreicht.

#### 1.1.4 Immobilisierung der Biokomponenten auf Glasoberflächen

Aus der Definition des Biosensors (Kapitel 1.1.1) geht hervor, dass biologische Komponenten wie Antikörper, Antigene, Lektine, Rezeptoren etc. an das Transducer-Element fixiert werden müssen. Die Immobilisation stellt einen kritischen Schritt dar, der folgenden Anforderungen gerecht werden muss (Keusgen, 2002):

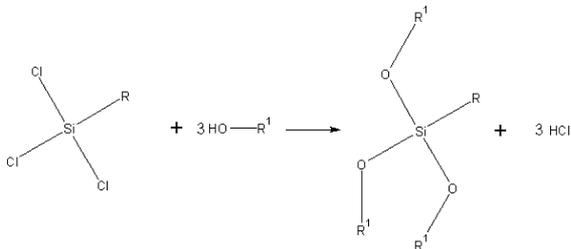
1. Biomoleküle müssen eine stabile und reproduzierbare Schicht bilden.
2. Sie dürfen bei der Immobilisierung nicht zerstört werden.
3. Die Enzym- bzw. Bindungsaktivität der Biomoleküle darf durch die Immobilisierung nicht stark beeinträchtigt werden.
4. Die Substratspezifität darf sich nicht ändern.

Sämtliche chemischen Modifikationen bzw. Immobilisierungen mit Biomolekülen erfordern eine sehr gute Reinigung der OF. Zu gängigen Reinigungsmethoden zählen die Anwendung von Gemischen aus Methanol:HCl (1:1), NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1:5), HCl:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (1:1:5), 10%ige KOH in Isopropanol, NaOH und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3:2) (=Piranhalösung) (Crass et al., 1999). Außerdem werden NaOH und Aceton zur Grundreinigung verwendet. Piranha-Lösung ist ein sehr oft verwendetes Reagenz. Es handelt sich um ein extrem starkes Oxidationsmittel, das dazu dient, organische Kontaminationen von der OF zu entfernen. Außerdem erzeugt es auf der OF von Glas Silanolgruppen, indem es Siloxan-Bindungen aufbricht (Seu et al., 2007). Eine vollständig hydroxylierte Silica-OF besitzt unabhängig vom verwendeten Material 5±1 OH-Gruppen pro nm<sup>2</sup> (Vigne-Maeder & Sautet, 1997).

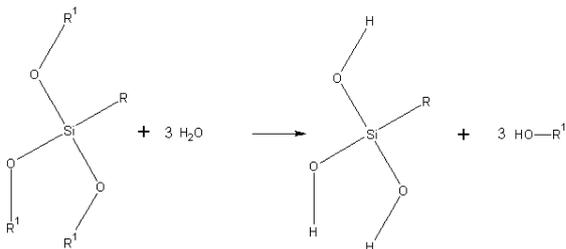
In manchen Fällen erlaubt eine saubere Transducer-OF eine direkte Immobilisierung von Biomolekülen durch Physisorption wie es Wolny et al. für den Fall Streptavidin (SAv) auf Gold zeigten (Wolny et

## 1 | EINFÜHRUNG

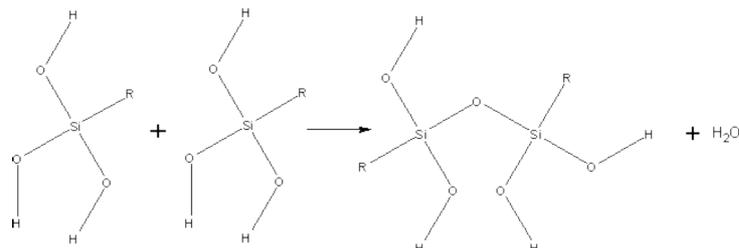
al., 2009). Auf diese Weise wird auch in gängigen ELISA-Methoden verfahren. Antikörper können einfach auf Grund der hydrophoben Interaktion zwischen Antikörpern und dem Mikrotiterplattenmaterial (Polystyrol) immobilisiert werden (Qian et al., 2000). In den meisten Fällen ist es jedoch notwendig die Interaktionsoberfläche am Transducer chemisch vorzubehandeln, um die biologische(n) Komponente(n) auf ihm zu immobilisieren. Zur chemischen Modifikation von Glasoberflächen finden besonders siliziumorganische Verbindungen mit einer dualen Reaktivität (Matinlinna et al. 2004) Verwendung. Mit ihrer Hilfe kann man an die nicht-organische Glas-Komponente einen Übergang zu organischen Komponenten etablieren. Der organische Rest kann verschiedenste funktionelle Gruppen tragen, um weitere organische Reaktionspartner zu binden. Siliziumorganische Verbindungen leiten sich vom Monosilan ( $\text{SiH}_4$ ) ab. Wenn ein bis drei Wasserstoffe durch Halogene wie z.B. Chlor substituiert sind, spricht man von Mono-, Di- oder Trihalogensilanen. Ist das vierte Wasserstoffatom durch einen organischen Rest substituiert, bezeichnet man die Verbindungen als Siliciumorganische Verbindungen. Um siliziumorganische Verbindungen für die Oberflächenchemie nutzen zu können, sind hydrolysierbare Gruppen am Siliziumatom notwendig (Osterholtz, 1992). Zu diesem Zweck werden Mono-, Di- oder Trichlorsilane mit einem organischen Rest verwendet oder man macht sie zum Ausgangspunkt für weitere Derivatisierungen. Von solchen Verbindungen werden wiederum die Alkoxysilane abgeleitet. Das sind Silane mit einem Alkylrest R am Siliziumatom und 1-3 hydrolysierbaren organischen Resten  $\text{R}^1$ :



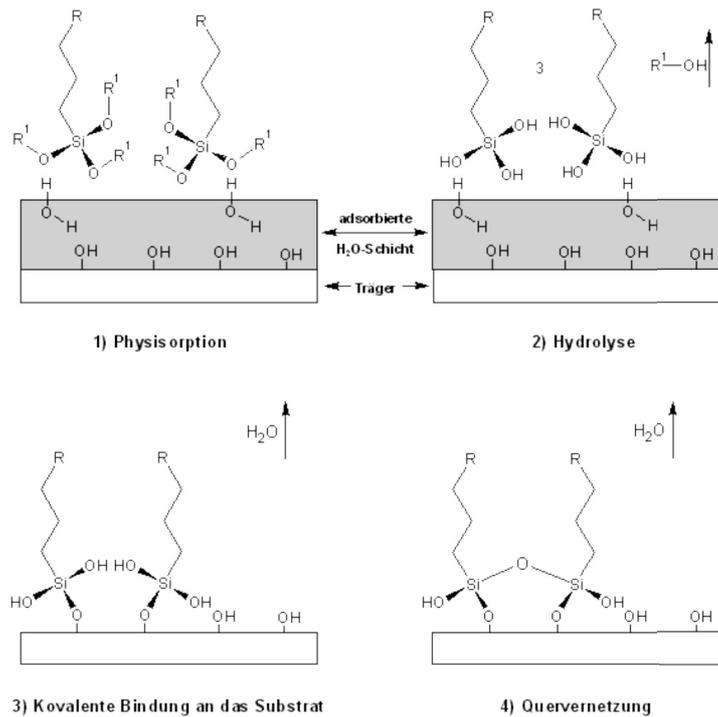
Mit Wasser hydrolysieren Trialkoxysilane zu Silantriolen:



Durch Kondensation können Silantrirole polymerisieren:



Am freien Terminus des Rests R kann eine große Bandbreite an funktionellen Gruppen sitzen wie Amino- oder Epoxygruppen. Auf diese Weise wird die Möglichkeit zu weiteren chemischen Modifikationen eröffnet. Die Deposition von Alkylchlor- oder Alkylalkoxysilanen auf aktivierten (d.h., z.B. mit Piranha-Lösung behandelte OF) Glasoberflächen ist stark abhängig von den Reaktionsbedingungen. Die Temperatur, die Art der siliziumorganischen Verbindung (Mono-, Di-, Trialkoxy und funktionelle Gruppen am organischen Rest), deren Konzentration, die Inkubationszeit, das zur Silanisierung verwendete Lösungsmittel und etwaige Katalysatoren und Aushärteprozesse gelten als kritisch.



**Abb. 1.4: Modell der OF-Funktionalisierung mit Alkylalkoxysilanen nach Brzoska et al. (1994).** Erklärungen siehe Text.

Außerdem spielt das auf der OF adsorbierte und das im Lösungsmittel enthaltene Wasser eine große Rolle (White & Tripp, 2000; Tripp & Hair, 1995, McGovern, 1994). Idealerweise reagieren siliziumorganische Verbindungen an der OF so, dass sie einen dichtgepackten lückenlosen Monolayer bilden, der kovalent mit dem OF-Silizium verbunden ist. Die ideale Situation wäre die in Abb. 1.4 demonstrierte (Modell nach Brzoska et al., 1994, modifiziert).

In Schritt 1 physisorbiert die siliziumorganische Verbindung aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen auf einem Wasserfilm (1), welcher fest an die OF gebunden ist. In Schritt 2 kommt es zur Hydrolyse, so dass drei R<sup>1</sup>-OH-Reste pro siliziumorganischer Verbindung frei werden (2). Schließlich kommt es zur Reaktion der siliziumorganischen Verbindung mit den OF-Silanolen (4) und zur Poly-

## 1 | EINFÜHRUNG

merisation (5), so dass ein zweidimensionales Netzwerk entsteht, das kovalent an die OF gebunden ist. Weite Verwendung finden mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) (Hartmann et al., 2006; Jang & Liu, 2009), Octadecyltrimethoxysilan (OTS) und 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) (Wong et al. 2005; Proll et al., 2009) funktionalisierte Glasoberflächen (Abb. 1.5). OTS wird häufig eingesetzt, um Glasoberflächen zu hydrophobisieren.

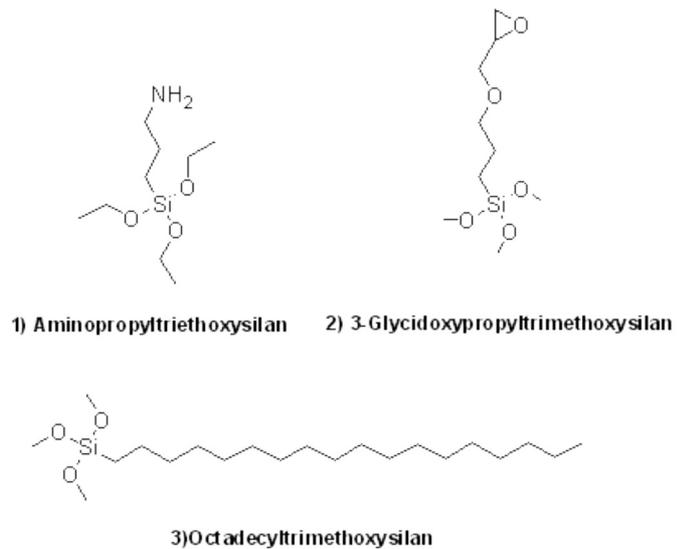


Abb. 1.5: Häufig verwendete Silane.

APTES und GOPTS bieten aufgrund der Exposition von funktionellen Gruppen auf der OF, eine große Bandbreite an Möglichkeiten, Polymere zu immobilisieren. Letzteres ist zum Beispiel für den Fall der Funktionalisierung mit Aminodextran (Tünnemann et al., 2001), IAP (=poly[(1-methyl-vinyl isocyanate)-alt(maleic anhydride)]) (Beyer et al., 1996) oder Mannan (Hartmann et al., 2006) beschrieben worden. Durch die Funktionalisierung mit Polymeren können unspezifische Wechselwirkungen von Biomolekülen mit der Siliziumoberfläche reduziert werden (Zhang et al., 1998). Solche Polymere sind häufig noch mit funktionellen Gruppen wie Amino- oder Carboxygruppen ausgestattet. Als Basis eignet sich Dextran, welches mit Aminogruppen ausgestattet als Aminodextran (Akkoyun & Bilitewski, 2002) Verwendung findet. Aminodextrane können auf der OF dreidimensionale Hydrogele bilden (Proll et al., 2009). Das gilt auch für Polyethylenglykole (PEG), welche z.B. in Form von Diamino- oder Diacaryxypolyethylenglycol verwendet werden. Sie bilden auf der OF zweidimensionale, bürstenartige Monolayer. Im Allgemeinen sind bei dieser zweidimensionalen Struktur weniger funktionelle Gruppen als bei der dreidimensionalen zu erwarten. Jedoch gilt die zweidimensionale Struktur als eine, die definiertere Oberflächen bildet (Proll et al., 2009).

Oberflächen, die auf diese oder ähnliche Weise Amino- oder auch Carboxyfunktionalitäten erhalten, eignen sich auch, um Biomoleküle über elektrostatische Wechselwirkungen zu immobilisieren, da diese Gruppen bei adäquaten pH-Werten geladen sind. Der Nachteil ist, dass dieser Art immobilisierter Biomoleküle bei Änderungen des pH-Werts, der Ionenstärke oder der Temperatur leicht wieder desorbieren (Kim & Kang, 2008). Sowohl Oberflächen, deren Grundchemie auf Biopolymeren beruht als auch Oberflächen mit APTES- oder GOPTS-Monolayer werden eingesetzt, um in weiteren chemischen Schritten Liganden auf der OF kovalent zu fixieren. Carboxygruppen von Proteinen können mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) zu Aktivester-Zwischenprodukten umgesetzt werden. Mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) oder dem besser wasserlöslichen sulfo-NHS (N-

Hydroxysulfosuccinimid) bilden sie ein (sulfo)-NHS-aktiviertes Intermediat. Solcher Art aktivierte Biomoleküle binden kovalent an Aminogruppen von APTES-Oberflächen. Mit NHS-Biotin kann man APTES-OF in Biotin-OF transformieren.

Aminofunktionen von APTES-Oberflächen können aber auch durch Behandlung mit Bernsteinsäureanhydrid (IUPAC: Oxolan-2,5-dion) oder Glutarsäureanhydrid (IUPAC: Dihydro-2H-pyran-2,6(3H)-dion) zu Oberflächen mit Carboxyfunktionen transformiert werden. Behandlung mit EDC oder N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in Verbindung mit NHS oder sulfo-NHS führt zu (sulfo)-NHS-aktivierten OF-Carboxylgruppen, an die Biomoleküle mit  $\epsilon$ -Aminogruppe (primäre Amine in Seitenketten von Aminosäuren) binden können. Es gibt noch viele andere Immobilisierungsstrategien, die sich z.B. Schiff'sche Basen oder die Wechselwirkung von Proteinen mit poly-Histidin-Tag und  $Ni^{2+}$ - oder  $Co^{2+}$ -Ionen zu Nutze machen.

## 1.2 Probleme in der Biosensorik

In dieser Arbeit werden drei Probleme der Biosensorik berührt. Auch wenn es als Vorteil von Biosensoren gilt, dass die Interaktionspartner nicht mit fluoreszierenden Molekülen oder radioaktiven Substanzen markiert werden müssen (markierungsfreie Interaktionsstudien), so hat doch die Notwendigkeit der Immobilisierung eines Interaktionspartners Schattenseiten. Für alle Anwendungen ist es von entscheidender Bedeutung, dass die immobilisierte Komponente möglichst schonend und gerichtet immobilisiert werden kann. Wie sich im folgenden zeigt, ist dies nicht immer gegeben (Kapitel 1.2.1).

Ein weiteres Problem betrifft die Tatsache, dass die meisten OF sich nur zum einmaligen Gebrauch eignen, was unter Umständen teuer sein kann. Schließlich bieten sich Biosensoren auf allen Feldern an, in dem es um schnelle und zuverlässige Detektion von z.B. pathogenen Bakterien geht. Bakterien, als ganze Zellen, sind jedoch wesentlich größer als Biomoleküle und Verhalten sich sowohl in Küvetten- als auch Mikrofluidik-Systemen anders als vergleichsweise kleine Biomoleküle (Kapitel 1.2.2).

### 1.2.1 Orientierte Antikörper-Immobilisierung

In vielen Bioaffinitätsstudien und auf Bioaffinität gründenden Assays zum Nachweis bestimmter Analyten spielen Antikörper eine besondere Rolle. Antikörper sind Immunglobuline mit Zuckerseitenketten, die in Vertebraten die humorale Immunabwehr vermitteln. Sie dienen der Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden (antigenen) Substanzen zum Zweck der Eliminierung der Letzteren. Sie können exorbitant viele unterschiedliche Spezifitäten entwickeln. Von den Ig-Klassen A, M, D, E und G spielt die G-Klasse in der Biotechnologie und Analytik die größte Rolle. IgG-Antikörper sind durch Immunisierung von Tieren (Maus, Ratte, Kaninchen etc.) oder in Gewebekulturen herstellbar.

## 1 | EINFÜHRUNG

Ein am besten gereinigtes Antigen (AG) wird zu diesem Zweck einem Organismus subkutan, intramuskulär, intravenös etc. injiziert. Meist ist dem Antigen noch ein Adjuvans hinzugefügt. Dabei handelt es sich oft um ein nichtabbaubares Mineralöl, welches eine Depotwirkung bezüglich des AG besitzt. Außerdem wird oft abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis* zugesetzt, um die Immunantwort zu verstärken (Rehm, 2006). Der Organismus reagiert darauf mit der Produktion von Antikörpern. Im Blut können sich nach einiger Zeit und wiederholten AG-Injektionen mehrere Tausend AK vor allem der Klasse IgG finden. Obwohl ein antigenes Protein meist mehr als drei Antigen determinanten besitzt, ist jeder AK gegen nur eine AG-Determinante gerichtet, da jeder an der Immunantwort beteiligter B-Lymphozyt einen leicht verschiedenen AK gegen eine bestimmte AG-Determinante produziert. Pro Antigen determinante können 10-1000 AK gebildet werden. Wegen der großen Zahl von Antikörpern spricht man von polyklonalen AK, da sie von unterschiedlichen Plasmazellen produziert werden, die genetisch verschieden sind (Lottspeich et al., 1998). Aus dem Blut wird Blutserum gewonnen. Man spricht auch von Antiserum. Da sich auch AK im Serum befinden, die nicht gegen das gewünschte Antigen gerichtet sind und auch viele andere Proteine, werden die gewünschten AK häufig über Affinitätschromatographie gereinigt. Zum Einsatz kommen dann etwa mit AG beschichtete Säulen.

Monoklonale AK, also Antikörper, die von nur einer Plasmazellen (letztes Stadium der Differenzierung der B-Zellreihe) stammen, können ebenfalls gewonnen werden. Entartung von Plasmazellen und damit einhergehende ungehemmte Proliferation führt zur Bildung eines bestimmten AK-Typs in hohen Konzentrationen (Plasmozytom). Dieses Verhaltens bedient man sich in der Hybridom-Technik. Dabei werden aus der Milz des immunisierten Organismus B-Zellen gewonnen. Gleichzeitig werden Krebszellen, am besten entartete Plasmazellen, in Zellkulturen hergestellt. Diesen fehlt die Fähigkeit zur Apoptose. Werden einzelne B-Zellen nach der Immunisierung mit diesen Krebszellen fusioniert, entstehen Hybridzellen, die stark proliferieren. Antikörper, welche auf diese Weise gewonnen werden, heißen monoklonal, da sie alle vom selben Klon stammen (Lottspeich, 1998).

Antikörper des Typs IgG bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (Abb. 1.6). Die zwei leichten Ketten setzen sich zusammen aus einer variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten Domäne ( $C_L$ ). Die schweren Ketten besitzen dagegen eine variable ( $V_H$ ) und drei konstante Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Die beiden schweren Ketten sind über Disulfidbrücken am Übergang (der „hinge region“) von den  $C_{H1}$ - zu den  $C_{H2}$ -Domänen miteinander kovalent verbunden. Außerdem ist je eine leichte Kette über die  $C_L$ -Domäne mit der  $C_{H1}$ -Domäne von je einer schweren Kette via Disulfidbrücke verknüpft. Die Antigenbindestellen werden gemeinsam von den N-terminalen  $V_L$ - und  $V_H$ -Domänen gebildet. Dort finden sich die „complementarity determining regions“ (CDRs), welche die AG-AK-Bindung ermöglichen. Die Domänen  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  bilden zusammen das Fc-Fragment (fragment, crystallizable). Dieses trägt in der  $C_{H2}$ -Domäne je eine Kohlenhydratkette, über die Proteine des Komplementsystems bin-

den können. Die Domäne C<sub>H</sub>3 enthält eine Bindestelle für Fc-Rezeptoren. Die V<sub>H</sub>- und C<sub>H</sub>1-Domäne bilden zusammen die Fab-Region.

Aufgrund ihrer Spezifität finden Antikörper mannigfaltige Anwendungen in der Analytik. Sie werden entweder als Fänger- oder Detektionsantikörper eingesetzt. Ein Fängerantikörper (fAK) ist meist ein polyklonaler Antikörper, der auf einer OF immobilisiert wird. Er dient dem Extrahieren eines Antigens aus einer Probe undefinierter Zusammensetzung. Ein Detektionsantikörper ist meistens monoklonal und dient der Verifizierung oder Falsifizierung des eingefangenen Antigens. Der enorme Vorteil optischer Biosensoren besteht in der Möglichkeit von markierungsfreien Interaktionsanalysen, d.h., dass die Interaktionspartner keine Markierungen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe nötig haben. Jedoch muss ein Reaktionspartner auf der Oberfläche immobilisiert werden. Das ist meistens ein Antikörper. Jede Immobilisierung impliziert jedoch die Gefahr eines partiellen bis absoluten Funktionsverlusts. So ist z.B. bekannt, dass im Falle von ELISAs bei Immobilisierung von polyklonalen Antikörpern aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen nur 5-10% der Antikörper ihre Funktion erhalten. Bei monoklonalen Antikörpern bleiben weniger als 3% bindungsfähig. D.h., mindestens 90% der Antikörper degenerieren bei dieser Art der Immobilisierung. Das wirft die Frage auf, ob nicht auch die verbleibenden funktionsfähigen Antikörper durch strukturelle Veränderungen bei der Immobilisierung in ihrer Affinität und Spezifität beeinträchtigt sind (Butler et al., 1992). Auch die kovalente Immobilisierung führt häufig zu Ausfällen der Aktivität von Antikörpern. Kovalente Immobilisierung kann u.a. über die Amino- sowie Carboxygruppen in den Aminosäureseitenketten von Antikörpern erfolgen. Diese Gruppen sind aber statistisch verteilt und nicht auf einen Teil des Antikörpers beschränkt, der für die AG-Bindung keine Rolle spielte. Somit ist die Orientierung des Antikörpers auf der Oberfläche bei herkömmlichen Verfahren nicht zu kontrollieren. Häufig werden Aminogruppen in zu immobilisierenden Antikörpern durch die Oberflächenchemie anvisiert. Gerade Aminogruppen spielen jedoch an den Antigeninteraktionsstellen im Antikörper (in der variablen Domäne des Fab-Teils (Abb. 1.6) eine wichtige Rolle (Lochspeich, 1998). Findet die kovalente Bindung in dieser Region statt, kann es zum Funktionsverlust oder zur sterischen Hinderung für die AK-AG-Bindung kommen. Um diese Probleme zu umgehen, wurden unter anderem Protein A und Protein G zur Immobilisierung verwendet. Protein A ist ein Protein von 42 kDa Molekulargewicht, das aus der Zellwand des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt. Es besitzt die Fähigkeit, an den Fc-Teil von humanen Immunglobulinen der Subklassen G1 und G2 und an G2a, G2b und G3 der Maus mit hoher Affinität zu binden. Es besteht aus fünf Untereinheiten mit jeweils einer eigenen Bindestelle. Die Gleichgewichtskonstante der Bindung von Antikörpern an Protein A beträgt  $2,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (Saha et al., 2003). Protein G findet sich auf der Oberfläche von Bakterienzellen der Gattung *Streptococcus*. Es gibt Varianten des Proteins mit Molekulargewichten zwischen 58-65 kDa. Am C-Terminus befinden sich zwei bis drei Binde-domänen für den Fc-Teil von humanen IgGs. Am N-Terminus existiert noch eine Albuminbindestelle,

## 1 | EINFÜHRUNG

die allerdings aus Protein G, welches für biotechnologische Zwecke eingesetzt wird, rekombinant entfernt wurde (Sjöbring et al., 1991). Die Gleichgewichtskonstante der Bindung zwischen Antikörpern und Protein G beträgt  $1,13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  (Saha et al., 2003). Eine weitere Methode zur orientierten Immobilisierung von Antikörpern ist die Nutzung des Biotin-(Strept-)Avidin-Systems (siehe Kapitel 1.4.1).

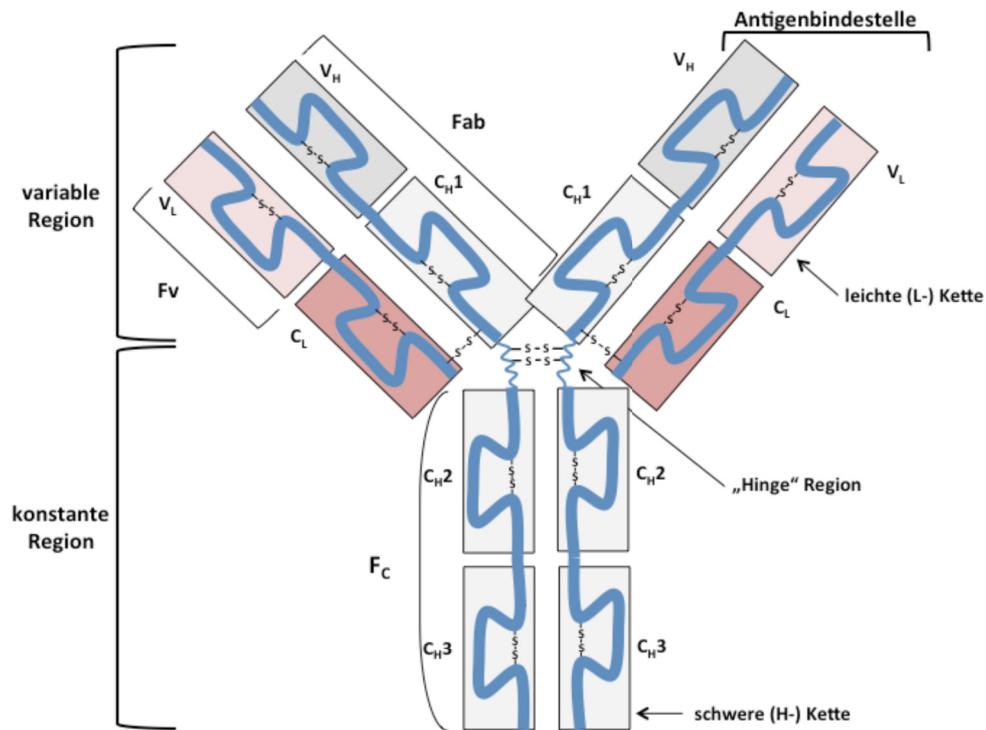


Abb. 1.6: Antikörper-Schema. Erläuterungen siehe Text.

Diese kleine Auswahl an verschiedenen AK-Immobilisierungsmethoden soll verdeutlichen, welcher Forschungsaufwand betrieben wird, um die Zahl der intakten und sterisch erreichbaren Paratope (AG-Bindestellen von Antikörpern) zu erhöhen.

### 1.2.2 Regeneration von Oberflächen

Ein weiteres Problem der Biosensorik ist, dass einmal verwendete OF häufig nicht wieder verwendet werden können. Das liegt an der Kopplung der biologischen Komponenten an die Chip-OF, die oft irreversible ist oder nur durch Maßnahmen aufgehoben werden kann, welche die biologischen Komponenten beeinträchtigt bzw. die OF in einen Zustand versetzt, in der keine weiteren Immobilisierungen mehr möglich sind. Abhängig vom gewählten System kann der Einsatz von immer neuen Chips sehr teuer werden.

### 1.2.3 Ganzzellbiosensoren

Schließlich ist eine besondere Herausforderung der Biosensorik ihre Anwendung in Assays zum Nachweis ganzer Zellen. Ivnitzky et al. stellten die Möglichkeiten der Anwendung von Oberflächenplasmonresonanz (SPR) auf diesem Feld in einem Übersichtsartikel dar. Sie stellten fest, dass die Detektionsgrenze von  $10^5$  CFC/ml im Falle von ganzen Zellen bisher nicht unterschritten werden konnte (Ivnitzky et al., 2000). Besonders in Biosensoren mit Mikrofluidik ist eine Detektion von ganzen Zellen aufgrund ihrer Eigenbewegung sehr schwierig. Anläufe in der Nutzung von optischen Biosensoren auf diesem Gebiet wurden für *Salmonella* (Mazumdar et al., 2010), *Listeria monocytogenes* (Leonard et al., 2004), *E. coli* (Fratamico et al., 1998) etc. unternommen. Sie spielen in der Lebensmittelkontrolle als häufig auftretende Keime mit hohem, pathogenem Potential eine große Rolle. Auch *Legionella pneumophila* ist ein außerordentlich wichtiges Pathogen. Da dieses Bakterium sehr anspruchsvoll ist, ist ein schneller, sicherer und sensitiver Nachweis sehr schwierig. Aufgrund der Brisanz von *L. pneumophila*-Kontaminationen sind daher entsprechende Nachweisverfahren sowohl hygienisch als auch ökonomisch sehr interessant. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit *L. pneumophila* als Modelorganismus gewählt.

### 1.3 *Legionella pneumophila*

Die erste dokumentierte Begegnung von Menschen und Legionellen geschah im Jahr 1976 während eines Kongresses der American Legion im Bellevue-Stratford Hotel in Philadelphia. Von insgesamt 10000 Kongress-Teilnehmern erkrankten 221 Menschen an einer geheimnisvollen Lungenentzündung. Insgesamt starben 34 Menschen. Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta sandten mit 20 Epidemiologen die bis dato größte Schar an „medical detectives“ in den USA nach Philadelphia, um den Fall zu untersuchen. Noch im Winter 1976 hielt man es für ausgeschlossen, dass Bakterien für die Erkrankungen verantwortlich sein könnten. Vermutlich, hieß es, sei der Fall nicht aufzuklären. Letztlich ist des Rätsels Lösung dem angekratzten Stolz eines CDC-Wissenschaftlers zu verdanken, der auf einer Weihnachtsfeier heftig für die Unfähigkeit seiner Behörde, den Fall zu lösen, kritisiert worden war. Dadurch angespornt identifizierte er schließlich im Januar 1977 den Auslöser. Die Infektion mit dem Bakterium, das fortan *Legionella* heißen sollte, wurde in ihrer schweren Verlaufsform als Legionärskrankheit (Legionellose) bezeichnet. Zunächst zeigt der Betroffene grippeähnliche Symptome und entwickelt später eine ernsthafte Pneumonie. Die andere Verlaufsform wurde mit dem Namen Pontiac-Fieber bezeichnet und verläuft mit Grippe-symptomen ohne Pneumonie recht mild.

Die Arten der Gattung *Legionella* sind gramnegative, stäbchenförmige Bakterien von 1,5  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$  Länge und einem Durchmesser von 0,3  $\mu\text{m}$  bis 0,9  $\mu\text{m}$ . In Kulturmedien können sie bis zu 50  $\mu\text{m}$  lange Filamente bilden. Ihre Zellwand ist reich an verzweigten Fettsäuren. Sporen und Kapseln bilden sie

## 1 | EINFÜHRUNG

nicht. Legionellen metabolisieren keine Kohlenhydrate und sind nicht durch z.B. Katalase-, Oxidase- oder Gelatinase-Tests zu identifizieren. (Lück & Helbig, 2006).

### 1.3.1 Systematik

*Legionella* ist eine Gattung innerhalb der Klasse der Gammaproteobacteria in der Ordnung Legionellales GARRITY ET AL. 2005. Die Gammaproteobacteria sind nach den Firmicutes mit 250 Gattungen die größte Klasse der Bakterien. In ihr stehen wichtige Spezies wie *Escherichia coli*, die Pathogene *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Coxiella* und *Francisella*. Die Klasse ist basierend auf einem einzigen Merkmal, der 16S rRNA definiert (Garrity et al., 2004). Wegen der Unsicherheiten, welche die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers bei Bakterien mit sich bringen, werden in anderen Ansätzen Proteinfamilien herangezogen, von denen man glaubt, sie würden die vertikale Abstammung besser repräsentieren (Williams et al., 2010). Die Ordnung der Legionellales erscheint unter beiden Arbeitshypothesen im Stammbaum an basaler Stelle. Sie besteht aus zwei Familien, den Legionellaceae und den Coxiellaceae. In die letztere Familie werden die Gattungen *Coxiella* und *Rickettsiella* eingeordnet, wobei die Richtigkeit der Einordnung von *Rickettsiella* umstritten ist. Die Familie der Legionellaceae wird manchmal aufgrund von phenotypischen sowie physiologischen (Kohlenhydrat- und Fettsäuren-Komposition) Eigenschaften in die drei Gattungen *Legionella*, *Fluoribacter* und *Tatlockia* unterteilt. Diese Auffassung wird durch DNA-Hybridisierungsexperimente gestützt (Garrity et al. 1980). Die Unterteilung kann aber durch Stammbaumanalysen basierend auf der 16S rRNA-Sequenz nicht nachvollzogen werden, so dass *Fluoribacter bozemanee* meist als *Legionella bozemanii* und *Tatlockia micdadei* als *Legionella micdadei* aufgefasst werden (Fry et al., 1991). Der phylogenetisch nächste Verwandte der Legionellaceae ist *Coxiella burnettii*.

Im Jahr 2002 waren 48 verschiedene Arten und 70 Stämme innerhalb der Gattung *Legionella* bekannt. Allein *L. pneumophila* besteht aus 15 Serogruppen. Daneben gibt es noch eine Reihe von Organismen, welche nicht auf dem üblichen Legionellen-Nährmedien kultiviert werden können. Man kann sie nur durch Kokultivierung mit ihren Protozoenwirten anziehen. Sie werden mit dem Terminus *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs) bezeichnet, da sie sich auch aus Sputum von Menschen isolieren ließen, die an Legionellose erkrankt waren (Marrie et al., 2001).

### 1.3.2 Lebensbedingungen

Legionellen leben in Wasser, in welchem sie sich durch eine oder mehrere Geißeln bewegen können. Gute Bedingungen finden sie in Süßwasser bei Temperaturen von 25-42°C. Die optimale Temperatur für ihr Wachstum beträgt 35°C. In natürlichen Habitaten können sie Temperaturen von 5-70°C überstehen. Die hohe Hitzeresistenz steht im Zusammenhang mit der zellulären Fettsäure-

Zusammensetzung, die derjenigen von thermophilen Bakterien ähnlich ist. Der pH-Wert darf zwischen pH 5,5 und pH 8,1 liegen, die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zwischen 0,3 ppm und 9,6 ppm (Fliermans et al., 1981) Erst seitdem der Mensch im 20. Jahrhundert begonnen hat, starken Einfluss auf seine Umwelt auszuüben, konnten Legionellen als Krankheitserreger in Erscheinung treten. Zur modernen Bequemlichkeit des Menschen gehörte auch die flächendeckende Verfügbarkeit von Warmwasser. Unter diesen Bedingungen konnten sich Legionellen einerseits verstärkt teilen und andererseits wurde das Gleichgewicht zwischen Legionellen und anderen Organismen im Wasser zu Gunsten der Legionellen verschoben. Unter natürlichen Bedingungen stellen Legionellen kaum eine Gefahr dar (Fields et al., 2002). Sie sind überall anzutreffen, wo o.g. Bedingungen gegeben sind, sei es in natürlichen oder von Menschen geschaffenen Habitaten. Zu den letzteren zählen vor allem Schwimmbäder, Whirlpools, Klimaanlage, Duschköpfe, Wasserhähne, Wasserkocher und Rohrschleifen in Wasser-Installationen, in denen der Fluss stagniert, Warmwassererzeugungs- und Verteilungsanlagen etc. (Hoge & Breiman 1991). Legionellen können in 40 % der Süßwasserquellen nachgewiesen werden. Durch Polymerasekettenreaktionen (PCR)-Nachweis steigt diese Zahl auf 80% an (Fields et al., 2002). Eine Besonderheit ist *L. longbeachea*, die in bis zu 73 % der in Australien verwendeten Blumenerde gefunden wird (Steele et al., 1990).

Unter natürlichen Bedingungen kommen Legionellen in drei Lebensformen vor: als Endoparasiten, planktonisch in Süßwasser und assoziiert mit Biofilmen. Als Endoparasiten leben sie in Protozoen, die in aquatischen oder feuchten Böden vorkommen. Darunter fallen 20 Amöbenarten wie *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmannella vermiformis*, zwei weitere Protozoen mit Cilien und ein Schleimpilz (Carratalà & Garcia-Vidal, 2010). Als Endoparasiten können sie sich reproduzieren, nicht jedoch in ihrer freilebenden Form, da unter diesen Umständen ihre anspruchsvollen Nahrungsbedingungen nicht erfüllt sind. Als Nichtparasiten sind Legionellen häufig biofilmassoziiert. Unter Biofilmen versteht man nach Costerton eine multizelluläre Gemeinschaft von pro- oder eukaryotischen Zellen, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet ist. Die Matrix wird dabei zum Teil durch Material gebildet, welches die beteiligten Zellen selbst bilden und sezernieren (Costerton, 2007; Ricucci & Siqueira, 2010). Innerhalb der Matrix gibt es Kanäle, in denen Nährstoffe frei zirkulieren können (Costerton et al., 1987). Das Leben in einem Biofilm bietet einige Vorteile. Biofilme sind Habitate, in denen Bakterien überleben können, wenn die planktonische Lebensform chancenlos ist. Es herrscht eine hohe metabolische Diversität, so dass die Nahrungsbedürfnisse der beteiligten Organismen erfüllt sind. Außerdem bieten Biofilme Schutz gegen Konkurrenten und sogar gegen antibiotische Substanzen (Ricucci & Siqueira, 2010). Der Großteil freilebender Legionellen lebt biofilmassoziiert (Rogers et al., 1994). Wie aus Studien mit definierten Biofilmen aus Biofilmreaktoren hervorgeht, können sich Legionellen unter diesen Bedingungen wahrscheinlich nicht reproduzieren (Murga et al., 2001). In Abwe-

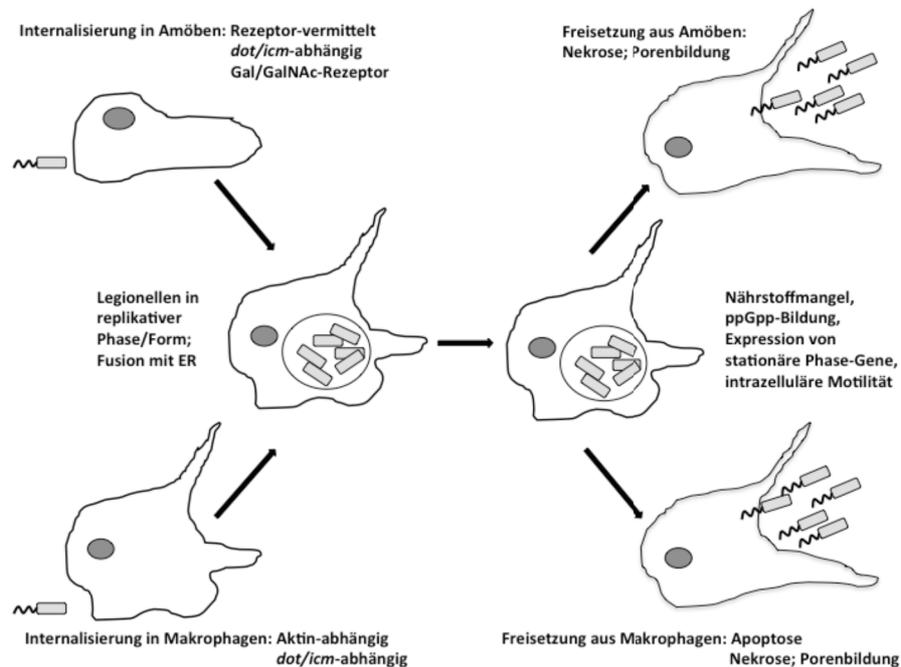
senheit von Protozoen ist Reproduktion nur unter Kulturbedingungen möglich, wenn alle Nahrungsbedürfnisse erfüllt sind (Fields, 1996; Rowbotham, 1980).

### 1.3.3 Pathogenese

Legionellen decken ihren Nährstoffbedarf ausschließlich über Aminosäuren. Essentiell sind Arginin, Cystein, Isoleucin, Leucine, Threonin, Valin, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. Manche Stämme benötigen zusätzlich Serin und Prolin. Serin und Threonin sind dabei die alleinigen Lieferanten für Kohlenstoff und für den Energiestoffwechsel (George et al., 1980). Solange der Nachschub dieser Aminosäuren gewährleistet ist, findet bakterielle Replikation statt. Verarmt die Wirtszelle an Nährstoffen, wird zunächst Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp) gebildet, der als intrazellulärer second-messenger wirkt. Daraufhin verlässt das Bakterium die exponentielle Wachstumsphase und geht in die stationäre Phase über (Hammer & Swanson, 1999). Vermutlich werden außerdem bakterielle Virulenzfaktoren exprimiert. Die Legionellen erlangen dann die Fähigkeit zur Bewegung, hohe osmotische Resistenz, Zytotoxizität gegenüber der Wirtszelle etc. Diese Fähigkeiten stellen sicher, dass sie aus der Aminosäure-verarmten Umgebung der Wirtszelle ausbrechen und sich freilebend in aquatischen Milieus bewegen können, um schließlich einen Wirt zu finden. Studien haben gezeigt, dass der Kontakt von *L. pneumophila* mit Amöben oder Makrophagen über Filopodie hergestellt wird. Filopodien sind eine Form von Pseudopodien (Scheinfüßchen), also Plasmaausstülpungen, die bei einigen Eukaryoten vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Bewegung und Ernährung. Meist handelt es sich um haarförmige Zellauswüchse, die z.B. bei Makrophagen als Fangarme dienen. Sie ziehen Nahrungspartikel F-Aktin-abhängig aus der Umgebung zur Zelle, um die Partikel zu phagozytieren (Kress et al., 2007). Bei Amöben wie *Hartmannella vermiformis* kann die Internalisierung von Legionellen aber auch unabhängig von F-Aktin, also auf einem nicht-phagozytotischem Weg, stattfinden. Stattdessen kommt zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose (King et al., 1991), bei der eine ganze Reihe von Wirtsproteinen an spezifischen Tyrosinresten dephosphoryliert werden, was Signalkaskaden zur Folge hat, die zur Internalisierung eines Phagosoms mit Legionellen führt. In den ersten Stufen des Prozesses spielt ein Lektin, welches durch Galaktose und N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) inhibiert werden kann, eine besondere Rolle (Venkataraman et al.; 1997). Dieses Protein kommt als eigentlicher Rezeptor (GalNAc-Rezeptor) zur Bindung von *Legionella* in Frage. Die Infektion von humanen Makrophagen dagegen ist F-Aktin abhängig (Fields et al., 2002). Die Unterschiede von der Internalisierung bis zur Freisetzung von Legionellen aus dem Wirt sind in Abb. 1.7 schematisch dargestellt.

In Abb. 1.8 ist die Aufnahme einer Legionellen-Zelle in eine Amöbe und die Biogenese der sogenannten replikativen Vakuole schematisch dargestellt. Legionellen-Mutanten, welche nicht in der Lage sind Dot/Icm-Effektoren zu sekretieren, werden anders internalisiert als Wildtyp-Legionellen (WT).

Bekannt ist, dass bei *dot/icm*-Mutanten Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität eine Rolle spielt, jedoch nicht beim WT. Die Einzelheiten zu diesem Weg sind nicht bekannt.



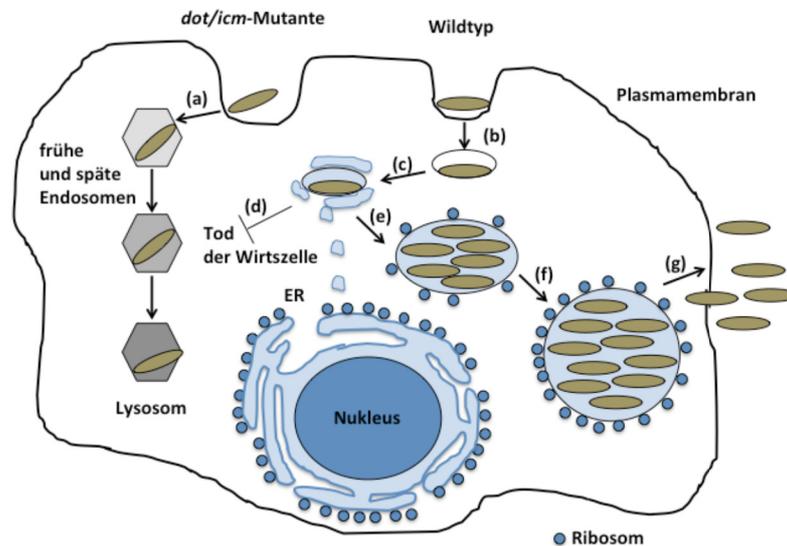
**Abb. 1.7: Lebenszyklus von *L. pneumophila* in Protozoa und humanen Makrophagen.**

Gal – Galaktose; GalNAc – N-Acetylgalaktosamin; *dot/icm* – Gene zur Expression des *dot/icm*-Typ-IV-Sekretionssystems; ppGpp – Guanosin-3',5'-bispyrophosphat.

(Quelle: Fields et al., 2002; modifiziert)

Jedoch wird in diesem Fall das Phagosom dem normalen endosomalen Stoffwechselweg zugeführt (a). Im Fall des Legionellen-WT sind die Prozesse Dot/Icm-Effektoren abhängig. Nach der Internalisierung der Zellen in einem Phagosom setzt ein vier stufiger Transformationsprozess ein, an dessen Ende die Phagosomen, die aus der Plasmamembran der Wirtszelle hervorgegangen sind, ein Organell bilden, das nahezu identisch mit dem rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) ist. Aufgrund dieser Transformation kann man ab einem gewissen Punkt nicht mehr von Phagosomen sprechen. Daher wird der Terminus Legionella containing vacuole (LVC) verwendet. Zunächst wird ein Legionellum phagozytiert (b). Unmittelbar darauf werden sämtliche Vorgänge blockiert, welche das Phagosom dem normalen endosomalen Stoffwechselweg überantworten. Die dafür verantwortlichen Vorgänge sind abhängig von Proteinen, die über den Typ-II-Sekretionsweg (Rossier et al., 2004) und den Dot/Icm Typ-IV-Sekretionssystem von *L. pneumophila* sezerniert werden (Vogel et al., 1998; Coers et al., 2000) (nur dieser ist in Abb. 1.5 dargestellt). In der zweiten Phase induziert *L. pneumophila*, wiederum Dot/Icm-Sekretionsapparat-abhängig, das Andocken von ER-Vesikeln (c) und Mitochondrien (nicht gezeigt) an der LCV-Membran. Beispielsweise werden über diesen Weg Faktoren auf den LCVs präsentiert, die in Wirtszellen eine Rolle bei der Regulation des Vesikelverkehrs zwischen ER-und

Golgi-Apparat spielen (Machner & Isberg, 2006). In der dritten Phase 15-20 Minuten nach der Infektion ändert sich die Zusammensetzung und Dicke der LCV-Membran, was auf eine Änderung der chemischen Zusammensetzung hindeutet. Das könnte vor allem Cholesterol und Sphingolipide, die in Plasmamembranen sehr häufig sind, in der Membran des ERs jedoch nahezu fehlen, betreffen (Bretscher & Munro, 1993). In der vierten Phase nimmt die Besetzung der LCV-Membran mit Wirtsorganellen ab (nicht gezeigt). Nun sind Ribosomen direkt an der LCV-Membran assoziiert (e). Der Eintritt in diese Phase der Entwicklung findet erst viele Stunden nach der Veränderung der Membrandicke statt. Wie das geschieht ist unbekannt. Möglicherweise fusionieren die an die LCV-Membran-assoziierten rER-Vesikel mit den LCV-Membran. Einen Hinweis darauf liefert die Beobachtung, dass die Zahl der Vesikel an der LCV-Membran im Laufe der Zeit abnimmt, während die Zahl der Ribosomen an der LCV-Membran steigt. Außerdem vergrößert sich das Volumen des LCV.



**Abb. 1.8: Internalisierung von *L. pneumophila* und Biogenese der replikativen Vakuole im Wildtyp und in der *dot/icm*-Mutante.** a) Normalerweise werden fremde Zellen phagozytiert und dem endosomalen Stoffwechselweg zugeführt. In *dot/icm*-Mutanten geschieht dies mit Legionellen nicht. b) Im Wildtyp werden *L. pneumophila*-Zellen phagozytiert. c) Das Phagosom umgeht mit Hilfe von Dot/Icm-Effektoren den endosomalen Stoffwechselweg, indem sofort rER-Vesikel (und Mitochondrien; nicht dargestellt) des Wirts angelagert werden. Es wird die Legionella Containing Vacuole (LCV) gebildet. d) Weitere Dot/Icm-Effektoren führen zur Inhibition des Wirtszelltods. e) Die LCV lagert Ribosomen an und verwandelt sich in ein ER-Kompartiment. Dieses bildet die Replikationsvakuole. f) In der Replikationsvakuole findet Zellteilungswachstum statt. g) Schließlich verlassen die *L. pneumophila*-Zellen den Wirt mit Hilfe weiterer Dot/Icm-Effektoren. (Quelle: Shin & Roy, 2008; modifiziert)

Auf diese Weise schafft sich *L. pneumophila* eine replikative Nische in der Wirtszelle. Durch den Umbau der LCV-Membran zu einem rER-Kompartiment, ist der Nährstoffnachschub gegeben und eine Azidifizierung ausgeschlossen. Mit einem pH-Wert von 7 im ER ist die Umgebung gegenüber Lysosomen mit pH-Werten um pH 4,8 für *L. pneumophila* sehr gut. Nach etwa 20 Stunden hat Replikation stattgefunden und viele *L. pneumophila*-Zellen befinden sich in einem LCV, welches zu diesem Zeitpunkt von keinen rER-Vesikeln mehr begleitet wird aber dicht mit Ribosomen besetzt ist (Tilney et al., 2001) (f). Die Prozesse, die mit dem Teilungswachstum im Wirt zu tun haben, sind ebenfalls abhängig

vom Typ-II-Sekretionsweg (Rossier et al., 2004). Auch die Anknüpfung an die ER-Physiologie wie z.B. die ER-assoziierte Degradations-Maschinerie ist essentiell für die Replikation (Dorer et al., 2006). Können Wirtszellen wie Makrophagen und alveolare Epithelzellen den Nährstoffbedarf von *Legionella* nicht mehr decken, kommt es zur Apoptose und in einer späteren Phase zur Nekrose, die durch eine Porenbildung in der Zellmembran eingeleitet wird (Gao & Kwaik, 1999). Im Unterschied dazu kommt es bei Amöben wie *Acanthamoeba polyphaga* zu keiner Apoptose, sondern zu einer durch Porenbildung induzierten Nekrose (Gao & Kwaik, 2000). Dadurch werden die in der Zwischenzeit replizierten Zellen frei und ein neuer Lebenszyklus beginnt (h).

### 1.3.4 Legionellosen

Legionellose ist der Name der Erkrankung, die in zwei verschiedenen klinischen Formen auftreten kann. In etwa 85% der Krankheitsfälle ist *L. pneumophila* der Erreger. Davon entfallen je nach Quelle etwa 50% bis 70% auf die Serogruppe (SG) 1 (Maiwald et al., 1998). Neben *L. pneumophila* wurden *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii*, *L. feelei*, *L. anisa* und *L. longbeachae* als Erreger nachgewiesen (Tab. 1.1). Außerdem wurden auch Infektionen mit mehr als einer Art/Serogruppe festgestellt.

#### 1.3.4.1 Legionärskrankheit

Die schwere Verlaufsform ist die Legionärskrankheit mit einer Letalität von 15-20% und einer Befallsrate von weniger als 5%. Sie tritt besonders nach Inhalation kontaminierter Aerosole auf. Häufige Quellen sind Whirlpools, Klimaanlage, Luftbefeuchter, kontaminiertes Untersuchungsbesteck für den Einsatz bei Atemwegs-Untersuchungen usw. (Edelstein, 1987). Die Infektionsdosis ist unbekannt. Eine Studie behauptet jedoch, dass eine einzige koloniebildende Einheit pro 50 l Luft ausreicht, um zu einer Infektion zu führen (Breiman & Hoge, 1991). Laut Arbeitsblatt W551 des Deutschen Vereins des Gas und Wasserfaches e.V. werden Legionellenbefunde wie in Tab. 1.2 bewertet (Behling, 2004).

Nur 20% der Legionellose-Fälle in den USA und UK sind auf sogenannte Legionellose-„Outbreaks“ zurückzuführen; bei 65% - 80% handelt es sich um sporadische Fälle. In den USA werden jährlich 600-1300 Fälle gemeldet. Die Dunkelziffer wird auf 8000-18000 Fälle geschätzt. In Deutschland sind Legionellose-Fälle erst seit 01.01.2001 meldepflichtig. Zuverlässige Statistiken gibt es daher noch nicht. Schätzungen gehen von einer Dunkelziffer von 6000-10000 Fällen im Jahr aus. Bei gesunden Menschen beträgt die Letalität ca. 15% bei Menschen mit ernsthaften Vorerkrankungen beträgt sie 80% (Behling, 2004). Nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen zeigen sich neben einer Pneumonie folgende klinische Symptome, die über 10-14 Tage andauern können: mehr als 40°C Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie, Husten, Dyspnoe, Pleuritis, Diarrhoe, Delirium (Hoge & Breiman, 1991) und

Brachykardie (Maiwald et al., 1998). Klinisch ist die Legionärskrankheit nicht von anderen Pneumonien zu unterscheiden.

**Tab. 1.1 : Erreger der Legionärskrankheit in den USA (1980-1982).** Angaben nach Centers for Disease Control (CDC) für den Zeitraum. Diagnose mittels dIFA (s. Kapitel 1.3.4.1). SG - Serogruppe; (Quelle: Reinhold et al., 1984 )

	Anzahl (%) der <i>Legionella</i> -positiven Proben berichtet von:	
	CDC	State health department laboratories
<b><i>Legionella pneumophila</i></b>		
<b>SG1</b>	83 (52)	82 (49)
<b>SG2</b>	8 (5)	2 (1)
<b>SG3</b>	3 (2)	7 (4)
<b>SG4</b>	3 (2)	6 (4)
<b>SG5</b>	5 (3)	11 (7)
<b>SG6</b>	19 (12)	14 (8)
<b>Gemischte Serogroups</b>	6 (4)	0
<b>Unbekannte oder andere SG</b>	9 (6)	13 (8)
<b>Summe <i>L. pneumophila</i></b>	<b>136 (85)</b>	<b>135 (80)</b>
<b><i>L. micdadei</i></b>	19 (6)	12 (7)
<b><i>L. bozemanii</i></b>	5 (3)	3 (2)
<b><i>L. dumoffii</i></b>	2 (1)	4 (2)
<b><i>L. gormanii</i></b>	1 (<1)	1 (1)
<b><i>L. longbeachae</i></b>	1 (<1)	5 (3)
<b>Summe bekannte Arten</b>	160	168
<b>Summe unbekannte Arten</b>	0	7
<b>Summe</b>	<b>160</b>	<b>175</b>

Eine Studie ergab, dass die Wahrscheinlichkeit einer Legionellen-Infektion um so höher ist, je mehr von den folgenden Symptomen festzustellen sind: hohe Körpertemperatur, keine Sputumproduktion, niedrige Natriumkonzentration im Serum, hohe Lactat-Dehydrogenase-Konzentration, hohe CRP-Konzentration und geringe Zahl an Thrombozyten. Solche Erkenntnisse fließen in Scoring-Systeme für die Diagnose ein. Doch sind diese Scores letzten Endes nicht sehr verlässlich (Carratalá & Garcia-Vidal). Weitaus am häufigsten betroffen sind Senioren, Raucher, Trink-Trinker, Diabetiker, Menschen mit chronischer Bronchitis, Leberzirrhose oder entzündlichem Rheuma und Menschen, die Immunsuppressoren nehmen oder aufgrund von chroni-

**Tab. 1.2: Bewertung von Legionellenbefunden in Wasser.**  
KBE – Koloniebildende Einheiten; (Quelle: DVGW-Arbeitsblatt W551)

Legionellen (KBE/100 ml)	Bewertung der Kontamination	Maßnahmen
>10000	Extrem hoch	Direkte Gefahrenabwehr notwendig (Desinfektion und Nutzungseinschränkung)
>1000	hoch	Kurzfristige Sanierung notwendig
≥100	mittel	Mittelfristige Sanierung notwendig
<100	keine/gering	keine

schen Herz-Kreislauf- oder Lungen-Erkrankungen sowie Krebs usw. immundepressiv sind (Hoge & Breiman, 1991). In nosokomialen Fällen ist die Sterblichkeit höher, abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Unbehandelt kann es zu bleibenden Schäden kommen oder die Erkrankung tödlich verlaufen (28 Todesfälle in Deutschland im Jahr 2002) (Behling, 2004).

#### **1.3.4.2 Pontiac-Fieber**

Die zweite klinische Verlaufsform ist das Pontiac-Fieber. Die Inkubationszeit ist mit 1-2 Tagen wesentlich kürzer. Die Befallsrate beträgt bis zu 95%. Die Erkrankung ist nicht letal und befällt auch Menschen ohne zugrunde liegende medizinische Probleme. Lungenentzündungen treten nicht auf. Der Verlauf ähnelt dem einer Influenza (Hoge & Breiman, 1991). Die Erkrankung klingt nach 2-5 Tagen folgenlos ab. Die Infektion findet auch im Falle des Pontiac Fiebers über die Inhalation von kontaminierten Aerosolen statt. Die Bakterien vermehren sich jedoch nicht in der Lunge. Bisher wurden nur *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. anisa* und *L. feeleii* in den Zusammenhang mit Pontiac Fieber gebracht. Daneben gibt es Berichte über Legionellen-Nachweise im Zusammenhang mit Pyelonephritis, Perikarditis, Myokarditis, Peritonitis, Sinusitis, perirektalen Abszessen, Wundinfektionen und Infektionen nach dem Einsetzen künstlicher Herzklappen (Hoge & Breiman, 1991).

#### **1.3.3.3 Nosokomial, ambulant und auf Reisen erworbene Legionärskrankheit**

In der Epidemiologie unterscheidet man zwischen ambulant erworbener, auf Reisen erworbener und nosokomialer Pneumonie. Gemäß Joseph et al. gelten folgende Kriterien für:

1. Nosokomial-erworbene Legionellose
  - a) Der Patient muss mehr als 9 Tage im Krankenhaus verbracht haben, bevor die ersten Legionellosis-Symptome auftraten.
  - b) Er muss 1-9 Tage im Krankenhaus verbracht, bevor die ersten Legionellose-Symptome auftraten, wobei in dem Krankenhaus (I) noch andere Legionellose-Patienten behandelt wurden oder (II) Legionellen aus der Wasserversorgung des Krankenhauses isoliert wurden, die mittels „Subgrouping“ mit monoclonalen Antikörpern oder einer Genotypisierung ununterscheidbar sind, von den Legionellen des Patienten.
2. Reise-assozierte Legionellose
 

Der Patient muss in den 10 Tagen vor dem Auftreten erster Legionellose-Symptomen mindestens eine Nacht außerhalb seiner eigenen Umgebung verbracht haben.
3. Ambulant-erworbene Fälle

Treffen die Umstände unter 1 und 2 nicht ein, wird der Fall als ambulant erworben eingestuft.

Außerdem wird zwischen „Outbreaks“ und sporadischen Fällen unterschieden. Von einem „Outbreak“ wird gesprochen, wenn mindestens zwei Fälle innerhalb von 6 Monaten auftreten. Sporadische Fälle sind gelegentlich auftretende Fälle (Joseph et al., 1994; Helbig et al., 2003).

In den Jahren zwischen 1989 und 1992 gab es in England und Wales 2347 Legionellose-Fälle. In 15% der Fälle (218 Patienten) konnte die Infektion auf eine Quelle innerhalb eines Krankenhauses zurückgeführt werden. Der Anteil an Legionärskrankheiten an allen Fällen von nosokomial erworbenen Pneumonien betrug 47%. Von insgesamt 68 Krankenhäusern waren 17 von „Outbreaks“ betroffen. Insgesamt 62% der nosokomialen Fälle traten im Zusammenhang dieser Outbreaks auf. Bei einer Sterblichkeitsrate von 31% wird deutlich, dass die Überwachung von eventuellen Legionellose vorkommen in Krankenhäusern eine extrem wichtige Angelegenheit ist. Sie sind also eine der größten Gefahren für immun-depressive Patienten, vor allem auf Intensivstationen (Joseph et al., 1994).

### **1.3.5 Labordiagnostik bei klinischen Proben und Umweltproben**

Die Diagnose von Legionellen betrifft zwei unterschiedliche Bereiche. Zum einen muss bei einer Pneumonie, bei der der Verdacht auf Legionellen-Infektion besteht, die Legionellose sicher nachgewiesen werden. Zum anderen ist es sehr wichtig, die Fälle zu ihrer Quelle zurück zu verfolgen. Da keine Fälle von Mensch-zu-Mensch-Übertragung bekannt sind (Shin & Roy, 2008), stehen in solchen Fällen meist künstliche Süßwasserquellen im Verdacht. Zur Diagnose von Legionellosen sind viele verschiedene Methoden basierend auf Kultur-, PCR- und Antikörper-basierten Techniken entwickelt worden. Da Legionellosen jedoch nur für 1% bis 6% (Maiwald et al., 1998) der diagnostizierten Pneumonien verantwortlich sind, ist eine sehr hohe Spezifität der Nachweis-Methoden notwendig.

#### **1.3.5.1 Immunfluoreszenz-Assays**

Früher wurden direkte Immunfluoreszenz-Assays (dIFA) zur Diagnose verwendet. Dabei handelte es sich um den direkten Nachweis von Legionellen-Antigenen in Gewebeproben, Abstrichen oder Kulturen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die Sensitivität derartiger Tests ist mit 25-70% recht niedrig (Murdoch; 2003). Außerdem sind für einen positiven Nachweis  $10^4$ - $10^5$  Zellen/ml nötig. Ein negatives Ergebnis schließt demnach keine Legionellen-Infektion aus (Jonas et al., 2005)

Der Nachweis einer Legionellose wurde sehr häufig auch durch indirekte Immunfluoreszenz-Assays (iIFA) geführt. Dabei wird ein Träger mit Legionellen-Antigenen ausgestattet und Serum darauf appliziert. Sind Antikörper spezifisch gegen Legionellen-Antigene im Serum, binden sie an den Träger und können mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der gegen humane Antikörper gerich-

tet ist, nachgewiesen werden (Wilkinson, Fikes et al., 1979). Die Antigenpräparation stammte von Legionellen bekannter Art und Serogruppe, die zuerst in Dottersäcken von Hühnereiern kultiviert wurden. Später, als Kulturmedien zur Verfügung standen, wurde es möglich Legionellen auf Kulturmedien heranzuziehen (Wilkinson et al., 1981). Die Legionellen wurden mit Hitze, 10% Formalin oder Diethylether inaktiviert. Formalin und Diethylether stören jedoch die Antigenintegrität auf der Zelloberfläche (Wilkinson & Brake, 1982). Im Fall der Diethylether-Inaktivierung ist bekannt, dass Antikörper gegen *L. pneumophila* SG 2 im iIFA nicht erkannt werden (falsch negative Resultate). Die iIFA sind auch stark anfällig für falsch positive Resultate. Das Immunsystem kann Antikörper gegen Antigene produzieren, welche spezifisch in Legionellen vorkommen und gegen Antigene, die sowohl in Legionellen als auch anderen gram-negativen Bakterien, vorkommen. Das Antigen ist dann spezifisch für taxonomisch höhere Einheiten. In solchen Fällen kann man ein falsch positives Resultat erhalten, wenn der nachgewiesene Antikörper nicht im Zuge einer Legionellen-Infektion gebildet wurde aber trotzdem das Legionellen-Antigen erkennt. Phänomene dieser Art lassen sich jedoch weitgehend unterdrücken, indem man beispielsweise *E. coli*-Antigene zum Probe-Serum zugibt, welches durch Bindung an Antikörper mit breitem Spektrum eben diese blockiert (Wilkinson et al., 1981). Die Antikörper-Titer unterscheiden sich auch in Abhängigkeit der Serogruppe des Bakteriums, aus dem die Antigenpräparation stammt (Wilkinson, 1979). Die Serokonversion könnte also auch unbemerkt bleiben, wenn im iIFA Antigene Verwendung finden, die nicht zu den Antikörpern im Serum passen (Edelstein, 1987).

Meistens werden im Serum IgG-, IgM- und IgA-Antikörper durch iIFA nachgewiesen. Aber es gibt auch Fälle, in denen nur IgG und IgM aber kein IgA gefunden wird oder IgG und IgA aber kein IgM. Auch Nachweise von ausschließlich IgG oder ausschließlich IgA sind bekannt (Wilkinson, Farshi et al., 1979). In diesen Fällen ist die Sensitivität des Assays zwar hoch, seine Spezifität jedoch gering. Um möglichst alle Serokonversions-Möglichkeiten abzudecken, können Polyimmunglobuline eingesetzt werden, die sowohl mit IgG als auch mit IgM und IgA reagieren. In 25% der Fälle kann in einem Zeitraum von 6-9 Wochen durch iIFA gar keine Legionellose nachgewiesen werden, obwohl sie durch Kultur bereits bestätigt ist. Bei nur 20% bis 40% der Patienten sind in der ersten Woche der Erkrankung (also ab prodromaler Phase) detektierbare Serum-Antikörper-Veränderungen feststellbar (Edelstein, 1987). Die Sensitivität der besten Tests dieser Art liegt zwischen 68% und 82% und die Spezifität zwischen 80% und 99%. Wenn Kreuzreaktionen mit Antigenen, die nicht von Legionellen stammen, mit Antigenen von verwandten Organismen (z.B. *E. coli*) geblockt werden, lässt sich die Spezifität sogar auf 100% erhöhen (Wilkinson et al., 1981).

### **1.3.5.2 Legionella-Antigen-Nachweis im Urin**

Serokonversionstests sind trotz ihrer hohen Sensitivität und (serogruppen-abhängigen) Spezifität nur von geringem klinischem Wert, da die Serokonversion für vierfach erhöhte Antikörper im Blut bis zu

neu Wochen dauern kann. Inzwischen werden Legionellosen üblicherweise durch den Nachweis von Legionellen-Antigenen im Urin diagnostiziert (Helbig et al., 2003). Bei dem Antigen handelt es sich um ein lösliches Polysaccharid, das bei Legionellen-Infektion im Urin zu finden ist. Zu diesem Zweck stehen Radioimmunassays, Enzym-Immunoassays (EIA), Latex-Agglutinationstests zur Verfügung. Die Sensitivität der Tests liegt für die Gattung *Legionella* zwischen 50% und 90%. Im Fall von *L. pneumophila* SG1 ist die Sensitivität mit 70% bis 90% am höchsten und die Spezifität liegt bei über 99%. Für manche Serogruppen ist die Sensitivität jedoch erheblich vermindert, so dass die Tests nur für *L. pneumophila* verlässlich sind (Murdoch; 2003). Eine Studie von Yzerman et al. anhand von Proben, die 1999 während eines Outbreaks in den Niederlanden erhoben wurden, zeigte, dass derartige Tests bei sehr milden Verläufen der Legionärskrankheit nur eine Sensitivität von etwa 40% erreichen. Bei schweren Verläufen liegt der Studie zufolge die Sensitivität bei 88% und 100%. Die Sensitivität lässt sich bei milden Verläufen auch mit einer vorherigen Ankonzentration der Urinproben nur auf 53% erhöhen. Bei schweren Verläufen ließ sich die Sensitivität durch Ankonzentration von Urinproben bis auf 100% erhöhen (Yzerman et al., 2002). Yzerman et al. kommen zu dem Schluss, dass auch bei Ankonzentration der Urinproben im Fall von milden Verläufen und Involvierung anderer Serogruppen die Inzidenzrate unterschätzt wird. Daher halten sie sowohl Kultur als auch serologische Tests für gleichermaßen wichtige diagnostische Methoden. Helbig et al. zeigen in einer Studie, dass bei Anwendung von Urin-Antigentests im nosokomialen Kontext nur 45% der Fälle richtig erkannt werden (Helbig et al., 2003). Sie empfehlen, dass ein klinischer Mikrobiologe daher möglichst viele Diagnosemethoden parallel verwendet. Für den Urin-Antigen-Test spricht, dass er in weniger als einer Stunde Resultate liefert, so dass therapeutische Maßnahmen sehr schnell getroffen werden können, was die Sterblichkeit verringert.

### **1.3.5.3 Diagnose mittels PCR**

Vielversprechend ist auch die Diagnose von Legionellosen durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch den Einsatz spezifischer Primer kann Legionellen-DNA in Patientenproben durch DNA-Amplifikation mit hoher Spezifität und besserer Sensitivität gegenüber der Kultur nachgewiesen werden. Von Vorteil sind hier die schnelle Durchführbarkeit und die Möglichkeit auch andere Legionellen-Arten festzustellen, d.h., nicht auf eine Art oder Serogruppe eingeschränkt zu sein. Als Marker werden oft die 5S- und 16S-rRNA-Sequenzen oder die Sequenz des „macrophage infectivity potentiator“-Gens (*mip*) verwendet. Letztere wurde bei der Untersuchung auf Umwelt-, Urin-, Serum und Schleimproben, die im Rahmen von bronchoalveolären Lavagen (BAL) aus den Alveolen entnommen wurden, verwendet. Verschiedene Assay-Formate wurden getestet. Zunächst wird das spezifische Amplifikat einfach durch Färbung in Agarosegelen nachgewiesen. Das Resultat muss aber durch Hybridisierung oder reverse Hybridisierung bestätigt werden. Bei der letzteren Methode werden zu-

nächst Oligonukleotid-Sequenzen auf einer Membran immobilisiert, die zu den im Assay bei Präsenz von Legionellen amplifizierten Sequenzen homolog sind. Dann werden zur verdächtigen Proben-Gesamt-DNA biotinylierte Primer zugesetzt und amplifiziert. Das Amplifikat wird dann ebenfalls auf die Membran gegeben und inkubiert. Sollte bei der Amplifizierung ein Amplifikat entstehen, dessen Sequenz zu der Sequenz der Sonde auf der Membran homolog ist, hybridisieren die beiden Sequenzen. Alles andere wird durch einen Waschschrift entfernt. Nun kann das Hybrid z.B. durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden, die durch Zugabe eines Komplexes aus Streptavidin und einer Meerrettichperoxidase (HRP von engl. horseradish peroxidase) bzw. Alkalischen Phosphatase (AP) und eines entsprechenden Substrats katalysiert wird. Bei BAL-Proben erreichte man auf diese Weise eine Sensitivität von 80% - 100% und eine Spezifität von >90% (Murdoch; 2003). Solche konventionellen PCR-Methoden sind noch recht arbeitsintensiv und dauern wegen der nachgeschalteten Hybridisierungsverfahren ca. einen Tag.

Schnelligkeit und Effizienz wird durch die Anwendung von real-time PCR-Methoden mit hoher Sensitivität und Spezifität verbunden. Bei einer Variante dieser Methode braucht man neben dem Primer-Paar noch eine spezifische DNA-Sonde für den Sequenzabschnitt von Interesse. Es handelt sich um eine kurze Nukleotidsequenz, welche am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reportermarker trägt und am 3'-Ende einen Quencher. Die Sonde soll bei einer bestimmten Temperatur mit dem gewünschten DNA-Abschnitt hybridisieren. Wird dann der Reporter an der Sonde mit Licht einer adäquaten Wellenlänge angeregt, kommt es wegen der Nähe zum Quencher zu einem Förstertransfer der Energie vom Reporter auf den Quencher. Kein Fluoreszenzlicht wird emittiert. Durch den Einsatz spezieller DNA-Polymerasen mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität geschieht Folgendes: Die Polymerasen setzen in der Primer-Region an und synthetisieren einen zur Zielsequenz auf dem Template komplementären DNA-Strang. Sie schreiten das Template in 5'-3'-Richtung ab. Treffen sie auf die Sonde, wird die Exonuklease-Funktion aktiv. Die Sonde wird in Einzelnukleotide zerlegt. Damit wird die räumliche Nähe von Reporter und Quencher aufgehoben. Die Bedingungen für den Förstertransfer sind dadurch nicht mehr erfüllt. Der Reporter emittiert Fluoreszenzlicht, welches detektiert wird. Je weiter die PCR-Reaktion voranschreitet, desto mehr Fluoreszenz wird gemessen. Der Fluoreszenzanstieg ist direkt proportional zur Anreicherung mit Amplifikat.

Hayden et al. berichten von einem *L. pneumophila*-Assay für klinische Proben basierend auf Real Time-PCR. Innerhalb von 1-2 Stunden können Legionellen auf Gattungsniveau und auf Artniveau nachgewiesen werden. Sowohl auf Gattungs- als auch auf Artebene konnte für BAL-Proben eine Sensitivität und Spezifität von 100% erreicht werden. Nur 10 CFU/ml waren nötig. Diese Methoden finden in der Praxis bisher noch keine Anwendung, da noch keine Assays kommerziell angeboten werden. Weitaus häufiger verwendet man heute Kulturtechniken zum Nachweis.

### 1.3.5.4 Kulturtechniken

Legionellen können sehr gut auf selektiven BCYE-Medien kultiviert werden (Ta et al., 1995). BCYE steht für „buffered charcoal yeast extract“-agar (BCYE). Die Aktivkohle dient der Detoxifizierung des Mediums. Der Hefe-Extrakt deckt als Aminosäure-Quelle den Nährstoffbedarf. Das Medium ist außerdem mit  $\alpha$ -Ketoglutarat (0,1%), L-Cystein und löslichem ( $\text{Fe}^{3+}$ )-Pyrophosphat angereichert. Der pH-Wert sollte mit N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure (ACES)-Puffer auf pH 6,9 eingestellt werden. Mit solchen Medien können jedoch auch einige andere Arten wie *Francisella tularensis* kultiviert werden (Ng et al., 1989). Ein Selektionsmedium wird hergestellt, indem dem BCYE-Medium Antibiotika zugesetzt werden. Polymyxin wird verwendet, um Wachstum von gram-negativen Bakterien zu verhindern, Cefamandol oder Vancomycin gegen gram-positive Bakterien und Anisomycin gegen Hefen. Allerdings sind auch Fälle publiziert, in denen bestimmte *L. pneumophila*-Stämme mit Cefamandol im BYCE nicht nachgewiesen werden konnten. Vickers et al. (1991) berichten dies für *L. pneumophila* der Serogruppe 1, Stamm Bellingham, welcher nicht aus dem Sputum eines nosocomial an Legionellose erkrankten Patienten isoliert werden konnte. Mit Vancomycin dagegen war es gelungen (Vickers et al., 1991). Aufgrund höherer Hitze- und Säurestabilität gegenüber anderen Bakterien werden Proben oft mit Hitze oder Säure vorbehandelt (Edelstein, 1981; Maiwald et al., 1998). Durch die etablierten Kulturbedingungen wird für Proben aus dem Lungengewebe oder von respiratorischen Sekreten eine Spezifität von 100% erreicht. Jedoch ist die Sensitivität bei dieser Methode schwer einzuschätzen und abhängig von der Aufarbeitung der Proben. Reller und Weinstein geben je nach Bedingungen eine Sensitivität von weniger als 10% bis 80% an (Murdoch; 2003).

In Proben, die aus der Umwelt entnommen werden, kommen nur sehr wenige Legionellen vor. Früher wurden Wasserproben in sterilen Flaschen entnommen und zentrifugiert oder gefiltert, um die enthaltenen Bakterien anzukonzentrieren. Pellets wurden nach der Zentrifugation mit sterilem, destilliertem Wasser kleineren Volumens resuspendiert oder von den Filtern gewaschen. Anschließend wurden die Konzentrate intraperitoneal in Meerschweinchen injiziert. Die Tiere wurden täglich untersucht und wenn die Körpertemperatur für zwei Tage um mehr als 1% von der Temperatur vor der Injektion abwich, als fiebrig eingestuft. Nach dem Tod der Tiere wurden ihnen die Leber und Milz entnommen sowie Abstrich des peritonealen Raums gemacht. Die Proben wurden anschließend direkt mit Immunfluoreszenzmethoden untersucht oder zuerst als Homogenisat auf BCYE-Medium (s.u.) kultiviert. Die Meerschweinchen-Inokulation stellte lange Zeit den besten Weg dar, die Legionellen aus Umweltproben zu extrahieren, die durch andere Arten kontaminiert sind (Tobin et al., 1981; Fliermans et al., 1981; Edelstein et al., 1982). Inzwischen stehen selektive BCYE-Medien zur Verfügung, wodurch der Zeit- und Kostenaufwand geringer ist. Sie eignen sich besser für Proben aus künstlichen Wasservorkommen, in denen weniger Bakterien vorkommen (Edelstein et al., 1982). Die

Kultivierung auf solchen selektiven BCYE-Medien ist der Kultivierung in Meerschweinchen überlegen, da man bei 60-fach weniger eingesetztem Bakterienmaterial bessere Ergebnisse erzielt. Als eine der sensitivsten Methoden gilt die Detektion von Legionellen durch direkte Applikation von Proben aus einer Lungenbiopsie auf selektiven Kulturmedien. Bei der Diagnose spielt aber auch die Morphologie der Kolonien und das Ergebnis einer Gram-Färbung eine Rolle. Außerdem wird der Befund normalerweise mit serologischen Tests abgesichert und die Spezies mit Immunfluoreszenz-Methoden ermittelt. Inokulierte Platten werden bei 35 °C – 37 °C in feuchter Atmosphäre für 10 Tage inkubiert. Kolonien sind im Durchschnitt nach fünf Tagen zu erkennen (Maiwald et al., 1998).

#### **1.3.5.5 Zusammenfassung**

Die Labordiagnostik von Legionellen gilt als sehr problematisch. Der Grund ist, dass Legionellen auf künstlichen Medien weit weniger gut wachsen als die meisten Arten anderer Gattungen. Alle Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Eine universelle Methode gibt es nicht (Maiwald et al., 1998). Tabelle 1.3 zeigt eine Zusammenfassung der erreichbaren Sensitivitäten und Spezifitäten nach Murdoch (Murdoch; 2003).

Kulturtechniken haben den Vorteil, dass damit sämtliche Legionellen-Arten und Serogruppen nachgewiesen werden können. Je nach Bedingungen wird bei klinischen Proben aus den unteren Atemwegen jedoch maximal eine Sensitivität von 80% erreicht. Die Spezifität ist mit 100% sehr gut. Ein Nachteil ist die lange Bearbeitungszeit, die Murdoch mit 3-7 Tage angibt (Murdoch; 2003). dIFA-Methoden liefern zwar schon in weniger als vier Stunden Ergebnisse, ihre Sensitivität ist mit nur 25-70% jedoch sehr gering. Außerdem ist die Methode technisch sehr anspruchsvoll. Der Antigen-Nachweis im Urin dauert weniger als eine Stunde und besitzt mit 70-90% im Vergleich zu dIFA und Kultur eine sehr hohe Sensitivität. Mit derartigen Tests lässt sich jedoch nur *L. pneumophila* SG 1 verlässlich nachweisen. Serologische Tests haben den großen Nachteil, dass die Serokonversion 3-10 Wochen in Anspruch nehmen kann. Auch mit der Sensitivität von 60-80% bleiben sie gegenüber dem Urin-Antigen-Test zurück. Am vorteilhaftesten erscheinen PCR-Verfahren.

Sie kombinieren im Falle von BAL-Proben Sensitivitäten zwischen 80% und 100% mit hoher Spezifität (>90%) und sehr kurzen Bearbeitungszeiten von weniger als vier Stunden. Sie kombinieren im Falle von BAL-Proben Sensitivitäten zwischen 80% und 100% mit hoher Spezifität (>90%) und sehr kurzen Bearbeitungszeiten von weniger als vier Stunden. Außerdem können alle Arten und Serogruppen nachgewiesen werden. Wie Hayden et al. zeigen, sind Spezifität und Sensitivität für BAL-Proben durch den Einsatz ihrer real time PCR-Methode auf 100% steigerbar.

**Tab.1.4: Diagnostische Tests für Legionellen-Infektionen.** LRT – lower respiratory tract. (Quelle: Murdoch, 2003)

Test	Dauer	Probentyp	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Kommentar
<b>Kultur</b>	3-7 d	LRT	<10-80	100	Detektiert alle Arten und SG
		Blut	<10	100	Für klinischen Einsatz nicht sensitiv genug
<b>dIFA</b>	<4 h	LRT	25-70	>95	Technisch anspruchsvoll
<b>Antigendetektion</b>	<1 h	Urin	70-90	>99	Nur für <i>L. pneumophila</i> SG1 verlässlich
<b>Serologische Tests</b>	3-10 w	Serum	60-80	>95	Tests von Proben aus akuter und konvaleszenter Phase nötig;
<b>PCR</b>	<4 h	LRT	80-100	>90	Keine kommerziell erhältliche Tests für klinische Anwendung; Detektion aller Arten und Serogruppen
		Serum	30-50	>90	
		Urin	46-86	90	

### 1.3.6 Behandlung

Legionellosen wurden in der Vergangenheit meist mit Erythromycin behandelt, was lange Zeit als Mittel der Wahl galt (Hoge & Breiman, 1991). Später wurde Rifampin als die besser Alternative verwendet (Hoge & Breiman, 1991). Als vielversprechend gelten Ciprofloxacinhydrochlorid, Clarithromycin, Azithromycin und Levofloxacin. Mit Azithromycin kann eine Legionärskrankheit in 95% der Fälle innerhalb 10-14 Tagen geheilt werden. Levofloxacin, Moxifloxacin und Azithromycin gelten als die effektivsten Inhibitoren von intrazellulärem Legionellen-Wachstum. Carratalá und Garcia-Vidal empfehlen daher die Gabe dieser Antibiotika über 7-10 Tage und bei immundepressiven Patienten bis zu 20 Tagen (Carratalá & Garcia-Vidal, 2010).

## 1.4 Regenerierbare Oberflächen auf Zucker-Lektin-Basis zur gerichteten Antikörper-Immobilisierung

Wie aus Kapitel 1.2.1 hervorgeht, ist die gerichtete Immobilisierung von Antikörpern schwierig umzusetzen. Selbst wenn man Protein A, Protein G oder Streptavidin verwendet, mit dem Ziel, Antikörper gerichtet zu immobilisieren, gilt für diese Proteine die gleiche Problematik. Sie müssen zunächst möglichst so immobilisiert werden, dass die Antikörper-Bindestellen so orientiert sind, dass die Orientierung der Antikörper möglichst optimal ist. Im Falle von ähnlich hohen Funktionsverlusten wie bei der Antikörper-Immobilisierung ist nicht viel gewonnen, da bei Funktionsausfall dieser Proteine möglicherweise nicht viel mehr funktionsfähiger Antikörper auf der Oberfläche vorhanden ist als es

bei den herkömmlichen Methoden der Fall ist. In Kapitel 1.2.1 wurde dies als eines der Probleme der Biosensorik bezeichnet. Das zweite dort benannte Problem betraf die meist fehlende Regenerierbarkeit von einmal verwendeten Oberflächen. Um beide Probleme mit einem Ansatz zu lösen, wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Keusgen mit einem Streptavidin-Concanavalin A-Fusionsprotein eine elegante Lösung entwickelt. Streptavidin (SAv) hat die Fähigkeit, biotinylierte Antikörper (bAK) zu binden. Immobilisierung von bAK an Streptavidin-OF sollte die Antikörperfunktion nicht stark beeinträchtigen, da sterische Barrieren etc. bei dieser Methode stark minimiert sind. Nun soll das Streptavidin aber reversibel immobilisiert werden. Um das zu erreichen, wird die Funktionalität des SAv mit den Eigenschaften von einem Lektin kombiniert. Lektine sind zuckerbindende Proteine. Concanavalin A (ConA) ist ein sehr gut untersuchtes Lektin, das spezifisch an Mannose und etwas schwächer an Glucose bindet. Die Idee ist, ConA und SAv rekombinant zu fusionieren, so dass ein Fusionsprotein entsteht, welches die zuckerbindenden Eigenschaften von ConA und die Fähigkeit von SAv zur Bindung von bAKs vereint. Das Fusionsprotein mit dem Namen ConA-SAv soll als Linker zwischen einer Mannan beschichteten Glasoberfläche und bAKs dienen. Von der ConA-Mannan-Bindung wird erwartet, dass sie durch Bindung eines thermodynamisch favorisierten Monosaccharids, welches mit dem Mannan um die ConA-Bindestelle konkurriert gelöst werden kann. Die Applikation eines Monosaccharids gelöst in einem Puffer sollte auf diese Weise zur Entfernung des ConA-SAv-Fusionsproteins von der OF führen.

#### 1.4.1 Streptavidin

Streptavidin ist in der Quartärstruktur ein homotetrameres Protein von ca. 60 kDa Molekulargewicht, welches aus dem Actinobakterium *Streptomyces avidinii* stammt. Zunächst wird ein „Precursor“-Protein von 159 Aminosäuren gebildet. Nach Prozessierung bleibt ein „Core“-Protein aus den Aminosäuren 18-139 übrig. Die Sekundärstruktur jedes Monomers besteht aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche so gefaltet sind, dass sich in der Tertiärstruktur ein  $\beta$ -Barrel ergibt (Hendrickson et al., 1989). Über deren OF lagern sich je zwei Monomere aufgrund von starken van-der-Waals-Wechselwirkungen zusammen. Zwei Homodimere bilden aufgrund von van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen, die schwächer ausfallen als zwischen den Monomeren, ein Homotetramer. Ohne Biotin sind an den Aminosäuren Asn23, Tyr43, Ser27, Ser45, Asn49, Ser88, Thr90 und Asp128 im Inneren der Bindungstasche Wassermoleküle via Wasserstoffbrücken gebunden (Hendrickson, et al. 1989). Bei Bindung von Biotin kommt es zur Exklusion von Wassermolekülen von der Bindetasche

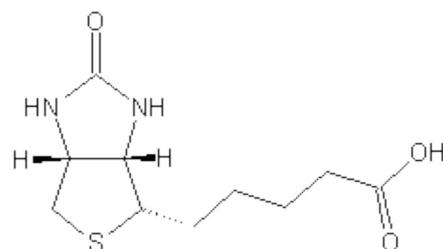


Abb. 1.9: Strukturformel von Biotin

## 1 | EINFÜHRUNG

und zur Etablierung neuer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Biotin und dem Valeriansäureteil des Biotins (Abb. 1.9). Außerdem tragen van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen vier in der Bindetasche vorhandenen Tryptophan-Resten mit dem Biotin zur Bindung bei. Dabei stammt jeweils ein Tryptophan-Rest von einem benachbarten Monomer. Letztlich kommt es auch zu Konformationsänderungen im Streptavidin, welche thermodynamisch relevant sind. Diese Einflüsse summieren sich letztlich derart, dass sich die außergewöhnlich starken Streptavidin-D-Biotin-Bindungen ( $K_a \cong 10^{-13} \text{ M}^{-1}$ ) ergeben (bei Avidin-D-Biotin-Bindung sehr ähnlich mit  $K_a \cong 10^{-15} \text{ M}^{-1}$ ). Sie gehören zu den stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Natur (deChancie & Houk, 2007; Reznik et al., 1996). Die Bindung ist in einem großen pH-Wert- und Temperaturbereich stabil (Holmberg et al., 2005). Die thermale Denaturierung von Streptavidin findet bei 75°C statt. Bei Biotin-Sättigung erhöht sich die Denaturierungstemperatur auf 112°C (González et al., 1997). Anstelle von Streptavidin wurde früher Avidin verwendet. Der Einsatz dieses Proteins ist von vielfältigen unspezifischen Wechselwirkungen begleitet. Diese Effekte werden auf Glykosylierungen am Avidin zurückgeführt, die dem bakteriell exprimierten Streptavidin fehlen (Wilcheck & Bayer, 1990).

### 1.4.2 Concanavalin A

Der andere Teil des Fusionsproteins ist ein Lektin. Peter Hermann Stillmark machte 1888 erstmals auf Substanzen aufmerksam, die in der Lage waren, Agglutination von Erythrozyten zu verursachen. Diese Substanzen wurden Hämagglutinine genannt oder, der Tatsache Rechnung tragend, dass sie in pflanzlichen Extrakten gefunden wurden, als Phytoagglutinine. Stillmark isolierte diese Substanz aus dem Wunderbaum (*Ricinus communis* L.; Euphorbiaceae) und nannte sie Ricin. Kurz darauf wurde eine Substanz mit ähnlicher Wirkung aus der Paternostererbse (*Abrus precatorius* L.; Fabaceae) isoliert und als Abrin bezeichnet. Mit diesen Substanzen gelang es Paul Ehrlich in den 1890er Jahren die Grundlagen der Immunologie zu legen (Sharon & Lis, 2004).

Verschiedene Lektin-Definitionen wurden vorgeschlagen (Dixon, 1981; Peumans & Van Damme, 1998). Eine sehr hilfreiche Definition wurde schließlich 1981 von Jan Kocourek und Vaclav Hofejsi in Nature vorgenommen (Kocourek & Hofejsi, 1981). Danach sind Lektine als Proteine mit folgenden Eigenschaften definiert:

1. Sie besitzen mindestens eine Bindungsstelle an der freie oder glykosidisch gebundene Kohlenhydrate binden können. Die Wechselwirkung kann durch Kohlenhydrate von geringem Molekulargewicht inhibiert werden.
2. Sie werden nicht im Zuge einer Immunantwort gebildet und sind strukturell von Immunglobulinen verschieden.
3. Sie entfalten keinerlei enzymatische Aktivität bezüglich des Zuckers, den sie binden.

Concanavalin A (ConA) wurde 1919 von James B. Sumner entdeckt, jenem Forscher, dem erstmals die Kristallisation eines Enzyms (Urease) gelang. Seine Isolation von ConA aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.; Fabaceae) war die erste Gelegenheit, zu der man ein reines Hämagglutinin in Händen hielt. Sumner und Howell berichteten erst 1936 von der erythrozyten- und hefezellenagglutinierenden Wirkung von ConA und deren Hemmung durch Saccharose. Das führte erstmals zu der Theorie, dass die Hämagglutination durch Bindung von Proteinen an Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Zellen verursacht wird. Lektine können agglutinierend aber auch mitogen wirken (Nowell, 1960). Sie sind in der ganzen belebten Natur anzutreffen, so z.B. in Mikroorganismen (Glick & Garber, 1983), Tieren (Harrison, 1991) und Pflanzen. Dort wurden sie in Blättern (Suzuki et al., 1979), Früchten (Xu et al., 1991), Wurzeln (Yamashita et al., 1992) und vor allem in Samen (Matsuda et al., 1989) entdeckt. Strukturell können Lektine sehr verschieden sein. Ricin und das Pea Lectin sind z.B. Heterodimere, Wheat Germ Agglutinin (WGA) ein Homodimer, ConA ein Homotetramer (Quioco, 1986) und Astragalus membranaceus Lectin (AML) ein Monomer (Yan et al., 2010). Die Zuckerbindestelle vermittelt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip die Spezifität der Bindung über Wasserstoffbrücken-Netzwerke. Bei der Bildung des Zucker-Protein-Komplexes werden Wassermoleküle von polaren Gruppen in der Bindetasche am Protein und um den Zucker verdrängt. Stattdessen werden neue Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zucker und Protein gebildet und van-der-Waals-Kräfte kommen zum Tragen (Quioco, 1986). Lektine spielen eine wichtige Rolle bei Zellagglutination, Toxizität, Antiproliferations- und Antitumoreffekten und können antifungal, antiviral etc. wirken (Yan et al., 2010). Seitdem Lektine gut verfügbar sind, finden sie vielfältige Anwendungen in der Medizin und Biologie. Sie wurden eingesetzt, um Rote Blutkörperchen zu typisieren (Nakajima et al., 1988), als Mitogene (Licastro et al., 1991), um Kohlenhydrate auf Zelloberflächen zu untersuchen (Clark, 1991), zur Reinigung von Glykoproteinen (Delanghe et al., 1989) etc. Unterschiedliche Lektine besitzen verschieden Zuckerspezifitäten. ConA aus *Canavalia ensiformis* (L.) DC. ist  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glukose-spezifisch, Wheat Germ Agglutinine (WGA) aus *Triticum vulgare* N-Acetylglucosaminspezifisch, Jacalin aus *Artocarpus integrifolius* L.f. Milibiose und Methyl- $\alpha$ -D-Galactopyranose-spezifisch und Ricin aus *Ricinus communis* L.  $\beta$ -D-Galactose-spezifisch (Kennedy et al., 1995).

Eine eigene Lektinfamilie bilden die Leguminosen-Lektine. Die Vertreter dieser Gruppe zeigen sehr verschiedene Zuckerspezifitäten trotzdem ihre Sequenzen hoch konserviert sind. Im allgemeinen bestehen alle Monomere aus drei  $\beta$ -Faltblättern: einem  $\beta$ -Faltblatt aus sechs Strängen, einem aus sieben und einem aus fünf Strängen. Sie bilden zunächst Dimere aufgrund der Assoziation von zwei der 6-strängigen  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Monomer. Das Ergebnis ist ein einziges, großes, 12-strängiges  $\beta$ -Faltblatt. Dieser als kanonisch angesehenen Struktur folgen jedoch nicht alle Lektine der Leguminosen-Familie, wie die Beispiele *Erythrina corallodendron* L. und *Griffonia simplicifolia*

## 1 | EINFÜHRUNG

(DC.) Baill. zeigen. Bei allen Lektinen dieser Gruppe ist die Bindung von Kohlenhydraten abhängig von einem  $\text{Ca}^{2+}$ - und einem weiteren Metall-Ion. Die Metallionen-Bindestellen sind in der Leguminosen-Gruppe hoch konserviert.

ConA ist ein homotetrameres Protein, das vor allem in den sich entwickelnden Kotyledonen der Jackbohne *Canavalia ensiformis* (L.) DC.) gebildet wird und eine wichtige Rolle beim Anlegen von Proteinreserven spielt. Zunächst findet die Translation eines „Precursor“-Proteins am rauen Endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Der Precursor wird durch das ER/Golgi-System transportiert, wobei er eine Glykosylierung erfährt. Das Endprodukt heißt Pro-Concanavalin A, ist kuppel- oder haubenförmig,  $42 \times 40 \times 39 \text{ \AA}$  groß und hat eine Molekularmasse von 34 kDa (Herman et al., 1985). Im Folgenden lokalisieren die Precursorproteine in Proteinkörperchen (Herman & Shannon, 1984), die, als zum vakuolären Kompartiment gehörend, schließlich Protein-Speichervakuolen bilden können. Beide Strukturen sind spezielle membran-umhüllte Speicherorganellen in Kotyledonen, in denen Speicherproteine akkumulieren. Die Kohlenhydratkette vom Oligomannose-Typ am proConA ist wesentlich für den Transport der Proteine durch die einzelnen Stationen des ER/Golgi-System und zu den Proteinkörperchen (Faye & Chrispeels, 1987). Das proConA wird in den Proteinkörperchen durch zwei endoproteolytische Eingriffe posttranslational modifiziert. Ein kleiner Teil der Aminosäuresequenz im Zentrum des proConA wird „ausgeschnitten“. Das ist der Teil, der auch die Kohlenhydratseitenkette enthält. Die beiden resultierenden Stücke werden in einem Ligationsschritt wieder zusammengefügt. Die Aminosäuresequenzen von ConA und proConA sind jedoch nicht colinear, da die beiden Fragmente in einer anderen Anordnung zusammengefügt werden. Erst dieses nicht-glykosylierte ConA von 30 kDa stellt die gereifte Version des ConA dar (Chrispeels, 1986). Min et al. fanden jedoch heraus, dass auch die deglykosylierte Form des proConA funktional ist. D.h., die Transposition der Aminosäurekette vor der Religation ist nicht notwendig, um ein aktives Lektin zu erhalten (Min et al., 1992). Bei ConA komplexiert das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion mit den Aminosäuren Asp10, Asp19, Tyr12, Arg 228 sowie zwei  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekülen, welche über Wasserstoffbrücken an Asn14 und Asp208 gebunden sind. Das zweite Metallion ist ein  $\text{Mn}^{2+}$ , welches ebenfalls über Asp10 und Asp19 und über die Aminosäuren Glu8 und His24 und zwei  $\text{H}_2\text{O}$  komplexiert ist. Ohne die Metallionen ist das Monomer teilweise entfaltet; man spricht dann von der „unlocked“-Konformation im Gegensatz zur „locked“-Konformation mit gebundenen Metallionen. In der metallionfreien Variante befinden sich dennoch 10% der ConA-Proteine in der „locked“-Konformation. In Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Mannose steigt der Prozentsatz (Brown et al., 1982). Die „locked“- und „unlocked“-Konformationen werden daher als im Gleichgewicht befindlich angesehen, wobei hohe Mannose-Konzentrationen das Gleichgewicht auf die Seite der „locked“-Konformation verschieben. Denselben Effekt haben Calcium und, weniger stark ausgeprägt, Mangan und Cadmium. Sie stabilisieren die „locked“-Konformation,

was mit einer *trans*- zu *cis*-Isomerisierung der Peptidbindung von Ala207 und Asp208 einhergeht. Van Dongen und Heck zeigten, dass auch das metallionen-freie apo-ConA spezifische Zuckerbindungen eingehen kann (van Dongen & Heck, 2000). ConA liegt oberhalb von pH 7 als Tetramer vor und unterhalb von pH 5 als Dimer (McCubbin & Kay, 1971). Das Tetramer wird gebildet, in dem zwei Dimere über ihr 12-strängiges  $\beta$ -Faltblatt assoziieren (Reecke et al., 1975). ConA bindet spezifisch an mannose- oder glukosehaltige Kohlenhydrate. Besonders hohe Affinität besteht zu 3,6-di-O-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-D-mannose-Kernstrukturen (van Dongen & Heck, 2000).

### 1.4.3 Mannan und Mannose

Mannan ist neben Chitin, Galactanen und Glucanen ein komplexes Polysaccharid, das in den Zellwänden von Pilzen vorkommt. Ein Hauptbestandteil pilzlicher Zellwände wurde 1888 von Emil Fischer entdeckt: die Mannose (Abb. 1.10). Polysaccharide mit Mannose-Einheiten sind seit den 1890er Jahren bekannt. Der Nobelpreisträger von 1937, Sir Walter Norman Hayworth, beschrieb die Hefe-Zellwand als aus Mannose bestehend.

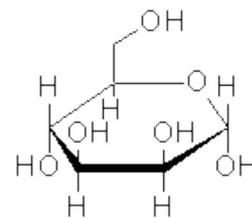
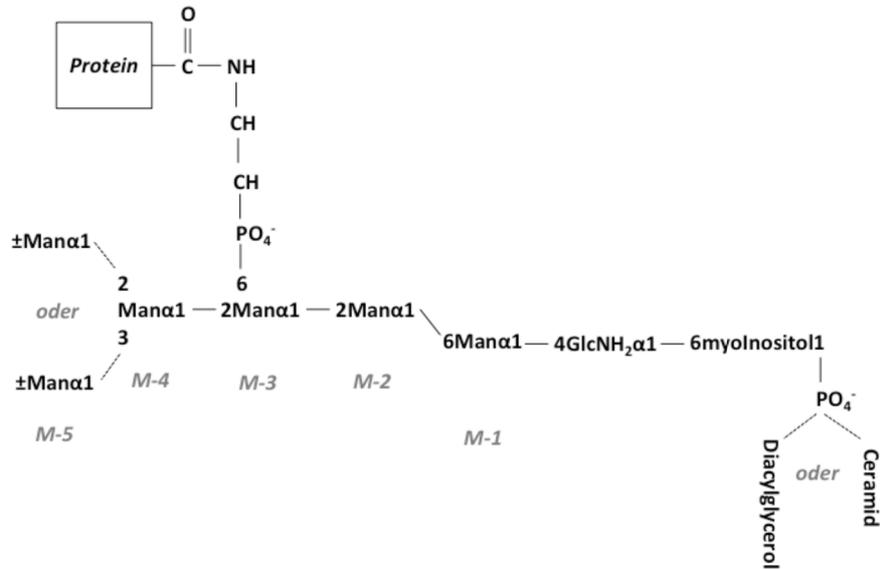


Abb.1.10: Mannose

Tatsächlich kommen aber auch andere Zucker vor wie Glucose, Galactose, N-Acetylglucosamin und manchmal Rhamnose. Sie sind als Monosaccharide in Polysacchariden verbaut wie Mannan, Glucan, Chitin, Galactomannan, Glucomannan, Rhamnomannan und Phosphomannan. Auch finden sich Glycoproteine mit Zuckerseitenketten von enormer Vielfalt in den Zellwänden. *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, die Bäckerhefe, besitzt eine breite Palette an Glykokonjugaten wie z.B. Proteine, die N- oder O-glykosidisch gebundenes Mannan tragen. O-glykosidisch gebundenes Mannan ist an einen Serin- oder Threonin-Rest angehängt, während N-glykosidisch gebundenes Mannan an Asparagin gebunden ist. Nur wenige Glykolipide kommen in den Zellwänden von *S. cerevisiae* vor und liegen als Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid (MIPC) vor. Auch durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI) auf der Zelloberfläche verankerte Glycoproteine besitzen Mannose-Einheiten.

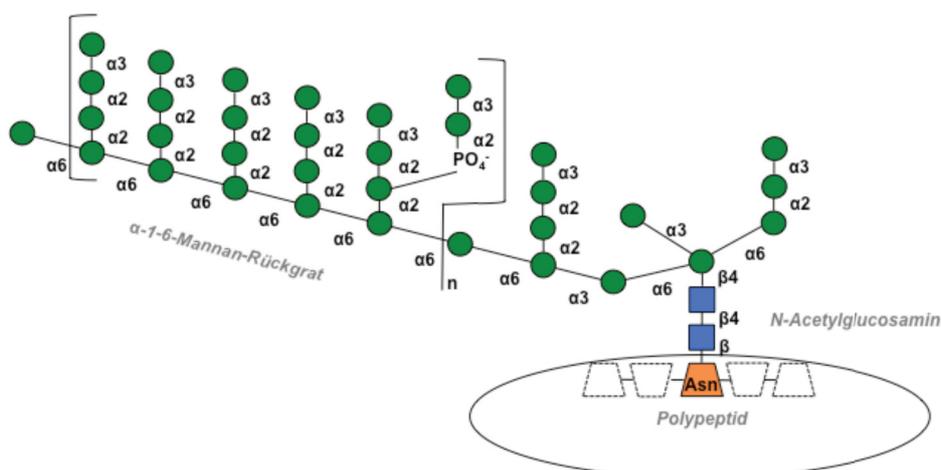
Studien an u.a. *Trypanosoma brucei* (Fergusson et al., 1988) und dem Glykoprotein Thy-1 im Rattenhirn (Homans et al., 1988) zeigten, dass es im GPI-Anker eine unter Eukaryoten hoch konservierte Kernstruktur gibt. Die Struktur verbindet den C-Terminus eines Proteins mit der Lipideinheit. Wie in Abb. 1.11 dargestellt, enthält die Struktur von GPI-Ankern in dieser Kernstruktur ebenfalls Mannose (Man)-Einheiten (Fankhauser et al., 1993). Die konservierte Kernstruktur besteht aus Ethanolaminphosphat, vier bis fünf Mannose-Einheiten (*M-1* bis *M-5*) und *myo*-Inositol (*myo*Inositol), das an die mannose-enthaltende Struktur gebunden ist. An letzterem bindet über eine Phosphatbrücke ein Lipid in Gestalt eines Diacylglycerols bzw. eines Ceramids. Der fünfte Mannose-Rest fehlt in 80% der GPI-Anker.

# 1 | EINFÜHRUNG



**Abb. 1.11: Struktur von GPI-Ankern bei *S. cerevisiae*.** Die konservierte Struktur besteht aus Ethanolaminphosphat, welches über den C6-Kohlenstoff von Mannose-Einheit M3 an Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcN $\alpha$ 1-6myo-Ins gebunden ist. Man - Mannose; myo-Ins - *myo*-Inosit; GlcN - Glucosamin; M1-M5 - Mannose-Einheiten. (Quelle: Fankhauser et al. 1993)

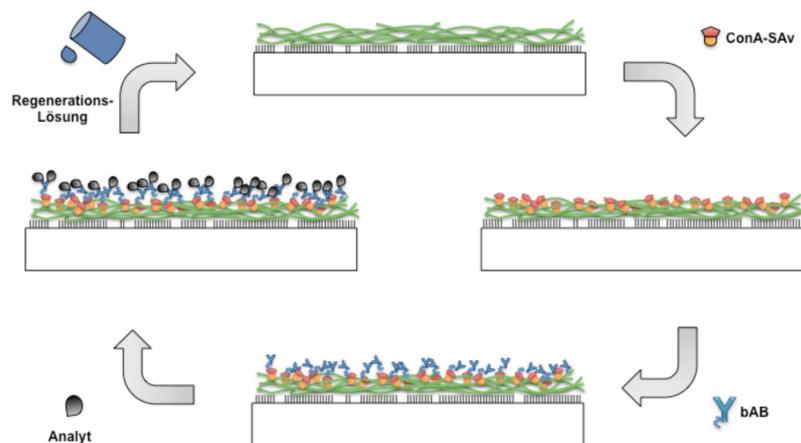
In die Zellwand eingebettete Manno-Proteine sind wie folgt aufgebaut: Ein *N*-Acetylglucosamin(GlcNAc)-Dimer ist N-glykosidisch an Asparagin gebunden. Daran ist das Mannoserückgrat aus  $\alpha$ 1-6-gebundenen Mannose-Einheiten angefügt. Von dem Rückgrat zweigen  $\alpha$ 1-2- und  $\alpha$ 1-3-verbundene Mannose-Seitenketten ab. Manche der Seitenketten verzweigen über Phosphodiesterbrücken (Abb. 1.12). Mannane in Proteinen mit N-glykosidisch gebundenen Seitenketten sind in der Art ihrer Verzweigungen und Länge sehr verschieden. Daneben gibt es auch Proteine an die Mannoseketten O-glykosidisch an die Reste der Aminosäuren Serin oder Threonin gebunden sind. Bei dieser Variante bleiben die Mannose-Strukturen in ihrer Komplexität, Heterogenität und Länge deutlich hinter denen von N-glykosidisch gebundenen zurück (Cummings & Doering, 2009).



**Abb. 1.12: Struktur von Mannan-Seitenketten an Proteinen.** Asn – Asparagin;  $\alpha$ / $\beta$ x – Bezeichnung der glykosidischen Verbindung. (Quelle: Cummings & Doering, 2009)

#### 1.4.4 Prinzip des ConA-SAv/Mannan-Systems

Durch die Fusion der Proteine ConA und SAv zu ConA-SAv und der Etablierung von Mannan-OF kann das Problem der orientierten Antikörperimmobilisierung und der Regeneration von OF elegant gelöst werden. Das Prinzip ist in Abb. 1.13 dargestellt. Auf einer mannanfunktionalisierten OF (oben) wird im ersten Schritt das ConA-SAv immobilisiert (rechts), indem der ConA-Teil an Mannan bindet. Im nächsten Schritt wird ein biotinylierter Antikörper am ConA-SAv gebunden (unten). ConA-SAv fungiert hier nun als Linkerprotein zwischen einer Mannan-OF und einem biotinyliertem Antikörper. Die Orientierung des Antikörpers auf der OF ist im Vergleich zu adsorptiv an OTS-OF gebundene Antikörper weniger zufällig. Im nächsten Schritt wird eine Probe mit einem potentiellen Analyten appliziert (links). Befindet sich ein Analyt in der Probe, wird er gebunden.



**Abb. 1.13: Prinzip des ConA-SAv/Mannan-Systems.** Erläuterungen s. Text.

Alle anderen Probenkomponenten werden durch Waschschriffe mit Puffer weggespült. Nun soll mit einer Regenerationslösung das Konstrukt aus ConA-SAv/bAK/Analyt von der OF gelöst werden. Als Regenerationsreagenzien bieten sich thermodynamisch begünstigte Monosaccharide wie  $\alpha$ -Methylmannopyranosid an. Die OF sollte dann wieder für ein neues Experiment zur Verfügung stehen (oben).

## 2. Fragestellung

In dieser Arbeit werden die drei Probleme der Biosensorik behandelt, die in den Kapiteln 1.2.1, 1.2.2 und 1.2.3 herausgearbeitet worden sind. Die Thematik der Antikörper-Immobilisierung und Regeneration der OF wird zusammen behandelt während der Ganzzellbiosensorik ein eigenes Kapitel zukommt. Die Ziele dieser Arbeit können wie folgt formuliert werden:

1. Getestet werden soll, ob sich die RfS-Plattform in Gestalt des BIAffinity® von Analytik Jena dazu eignet Ganzzellbiosensorik zu betreiben. Wegen der theoretischen Limitierung des Messbereichs auf die Höhendimension der Flusskanäle wird erwartet, dass mit der RfS-Methodik bessere Ergebnisse resultieren als mit der SPR-Methodik. Die SPR-Methodik erlaubt nur Messungen in einem Bereich von wenigen hundert Nanometern über der OF. Ivnitzyk et al. geben in ihrem Review zu Ganzzellbiosensorik für SPR-basierte Methoden eine Detektionsgrenze von  $10^5$ - $10^7$  CFC/ml an, welches noch nicht reproduzierbar unterschritten werden konnte (Ivnitzky et al., 2000). Die Arbeiten sollen am Beispiel des klinisch relevanten Bakteriums *Legionella pneumophila* durchgeführt werden. Im Erfolgsfall soll ein Legionellen-Assay entwickelt werden.
2. Die Ziele im Zusammenhang mit der Problematik der orientierten Antikörperimmobilisierung und der OF-Regeneration waren die Folgenden:
  - a. Die Technik zur Funktionalisierung von Oberflächen mit Mannan sollte von Gold-OF (SPR) bzw. Mikroskopierdeckgläschen (SPI) auf die RfS-Glaschips übertragen werden.
  - b. Auf diesen Oberflächen sollte die Funktionsfähigkeit des ConA-SAv-Fusionsproteins nachgewiesen werden.
  - c. ConA-SAv sollte als Linkerprotein zwischen biotinylierten Antikörpern und einem Analyten einerseits und der Mannan-OF andererseits etabliert werden.
  - d. Die Bindung des ConA-SAv/bAK/Analyt-Konstrukts zu Mannan sollte mit geeigneten Regenerationsmitteln erreicht werden und zwar derart, dass die Mannan-OF wieder verwendet werden konnte.

(Die Arbeiten verfolgten gleichzeitig ein weiteres Ziel: sie wurden im Rahmen des „Multiprot“-Projekts (gefördert von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF)) durchgeführt und sollten den „Proof of Principle“ für das ConA-SAv/Mannan-System liefern, um dieses anschließend auf Polyethylen-Sinterkörper zu übertragen (s. Kehrel et al., 2012).

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

Die in der Arbeit verwendeten Materialien sind in Tab. 3.1 bis 3.8 samt Bezugsquelle und Herstellerangaben aufgeführt.

#### 3.1 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Quelle	Qualität	Zweck
Toluol	Merck KGaA, Darmstadt	for gas chromatography SupraSolv <sup>®</sup>	Silanisierung, Reinigung
Toluol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	ROTISOLV <sup>®</sup> ≥99,8%, GC Ultra Grade	Silanisierung, Reinigung
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	ROTISOLV <sup>®</sup> ≥99,98%, Ultra LC-MS	Reinigung
Aceton	hausintern	technisch	Reinigung
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	for gas chromatography, SupraSolve <sup>®</sup>	Reinigung
Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Heraeus GmbH, Hanau	doppelt destilliert (in Wasserbidestillierapparat BI 4)	Lösungsmittel, Reinigung

#### 3.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Qualität
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥98%
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥98 %
1,4-Butandiol diglycidylether (BDDG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥95%
Calciumchloride Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	≥99,5%
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Feinbiochemie GmbH & Co. KG, Heidelberg	
Dextran	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	von <i>Leuconostoc</i> spp. (6 kDa)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim,	anhydrous ≥ 99,9%
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	zur Analyse
Ethanolamin Hydrochlorid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum ≥98% (AT)
3-Glycidoxypropyldimethylethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	97%
Guanidinhydrochlorid	Applichem GmbH, Darmstadt	99%, BioChemica
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥99,5%, p.a.
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-	Carl Roth GmbH & Co.,	≥99,5%, Buffer

### 3 MATERIAL UND METHODEN

ethansulfonsäure (HEPES)	Karlsruhe	Grade
Mannan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Manganese (II) chloride Tetrahydrate (MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O)	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	≥99%
Methyl-α-D-mannopyranosid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	≥99% (GC)
Natriumacetat	Riedel-de Haen	anhydrous, ≥ 99,9 %
Natriumborhydrid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥97%, Granulat
Natriumborhydrid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum p.a. ≥96% (gas volumetric)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥99,5%, p.a. ACS, ISO
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum p.a. crystal- lized, ≥99% (T)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥99,5% für die Elektrophorese
Natriumhydroxid	hausinterne Quelle	
Natriumtetraborat Decahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	≥99.5%
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	BioReagent, sui- table for electro- phoresis, ~99%
PAGERuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Roth	10-170 kDA
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	A - 30 % Ac- rylamidlösung B - 2 % Bisac- rylamidlösung
Schwefelsäure	Fisher Chemicals AG, Loughborough, UK	≥95%, analytical reagent grade
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Merck KGaA, Darmstadt	GR for analysis
Octadecyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim,	technisch, ≥90% (GC)
Triton X 100 (Alkylphenylpolyethyl- englykol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	reinst
Tween® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	cell culture tested
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥30%, TraceSE- LECT® Ultra, for ultratrace analysis
Zitronensäure (2-hydroxypropane- 1,2,3-tricarboxylic acid)	(KMF Laborchemie)	98%
The Blocking Solution	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen	Keine Angabe

## 3.3 Antikörper

Antikörper	Antigen	Lieferant	Details
Polyclonal Antibody to Rabbit IgG [H&L]-HRP (Kat.-Nr.: R1364HRP) (Lot-Nr.: 22489)	Rabbit-IgG	Acris Antibodies GmbH, Herford	Typ: sekundär Klonalität: polyklonal Wirt: Ziege Puffer: 0,02 M Kaliumphosphat, 0,15 M Natriumchlorid pH 7,2 (mit 10 mg/ml BSA (IgG und Protease-frei) und 0,01% (w/v) Gentamicinsulfat)
anti- <i>Legionella pneumophila</i> Antibody (Kat.-Nr.: ABIN237744)	<i>L. pneumophila</i> , Serogruppe 1-12, reagiert mit Antigenen ganzer Zellen	antikoerper-online.de, Aachen	Typ: primär Klonalität: polyklonal Wirt: Kaninchen Puffer: 0,01 M PBS pH 7,2, 0,1% Natriumazide
Polyclonal Antibody to Concanavalin-A-HRP (Kat.-Nr.: AP21430HR-N) (Lot-Nr.: 20-783)	ConcanavalinA	Acris Antibodies GmbH, Herford	Typ: primär Klonalität: polyklonal, Wirt: Ziege, Puffer: PBS pH 7,2; Molares Verhältnis: Enzym/AK ~1,3
anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody (Biotin) (Kat.-Nr.: ABIN237746)	<i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1-12, reagiert mit Antigenen ganzer Zellen	antikoerper-online.de, Aachen	Typ: primär Klonalität: polyklonal Wirt: Kaninchen Puffer: 0,01 M PBS, pH 7,2, 0,1% Natriumazid
anti-Ig-fraction Antikörper (Kat.-Nr.: ABIN400073)	Immunglobulin-Fraktion	antikoerper-online.de, Aachen	Typ: primär Klonalität: polyklonal Wirt: Kaninchen Puffer: 10 mM Natriumphosphat, 0,15 M Natriumchlorid, pH 7,2, 0,05% Natriumazid,
anti-IgG b-Antikörper (Biotin) (Kat.-Nr. ABIN375976)	Kaninchen-Immunglobuline (IgM und IgG)	antikoerper-online.de, Aachen	Typ: sekundär Klonalität: polyklonal Wirt: Ziege Puffer: 0,1 M Boratpuffer, pH 8,2
Polyclonal antibody to Mouse IgG(H&L)-HRP (Kat.-Nr.: R1253HRP) (Lot-Nr.: 23976)	Maus-IgG ganzes Molekül	Acris Antibodies GmbH, Herford	Typ: sekundär Klonalität: polyklonal Wirt: Rabbit Puffer: 0,02 M Kaliumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,2, mit 0,01% (w/v) Gentamicinsulfat, 10 mg/ml BSA,
anti-Fibrinogen-Antikörper (Biotin) (ABIN457984)	Humanes Fibrinogen	antikoerper-online.de, Aachen	Typ: primär Klonalität: polyklonal Wirt: Ziege Puffer: PBS pH 7,2

### 3 MATERIAL UND METHODEN

			molares Verhältnis Biotin/IgG ~ 4,4
Monoclonal Antibody to Streptavidin – Purified (Kat.-Nr.: AM09035PU-N) (Lot.-Nr.: A1211901)	Rekombinantes Streptavidin (25-183 aa) aus <i>E. coli</i>	Acris Antibodies GmbH, Herford	Typ: primär Klonalität: monoklonal Wirt: Maus Puffer: PBS, pH 7,4, 0,09% Natriumazid
Leg1G3	<i>L. pneumophila</i> serogruppe 1, Philadelphia & Corby	FzmB GmbH, Bad Langensalza	Typ: primär Klonalität: monoklonal Wirt: Maus Puffer: PBS pH 7,3 Charge: 09.02.2012
Leg1E6	<i>L. pneumophila</i> serogruppe 1, Philadelphia & Corby	FzmB GmbH, Bad Langensalza	Typ: Primär-AK Klonalität: monoklonal Wirt: Maus Puffer: PBS pH 7,3 Charge: 07.03.2012
Polyclonal Antibody to LSD-Ig Fraction (Kat.-Nr.: AP09743PU-N) (Lot.-No: RS243-P11)	LSD-BSA-Konjugat	Acris Antibodies GmbH, Herford	Typ: Primär-AK Klonalität: polyklonal Wirt: Schaf Puffer: 20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,2, 0,09% Natriumazid

#### 3.4 Andere Proteine

Protein	Quelle	Lieferant	Details
ConcanavalinA	<i>Concanavalia ensiformis</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	Type V
Streptavidin	<i>Streptomyces avidinii</i>	Prozyme, USA	
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	
<i>Persea americana</i> -Lektin	<i>Persea magnifera</i>	EY Laboratories Inc., San Mateo, USA	
Fibrinogen	humanes Plasma	antikoerper-online.de, Aachen	0,1 M Natriumcitrat, 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,3,
BSA (bovine serum albumin),	from bovine serum	Merck KGaA, Darmstadt	albumin fraction V, for biochemistry
ConA-SAv	AK Keusgen		in PBS, pH 7,3

#### 3.5 Puffer/Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Herstellung
PBS (phosphate buffered saline); 30 mmol/l Phosphat, 120 mmol/l NaCl; pH 7,3	7,01 g NaCl + 4,27 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 0,94 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	900 ml vorbereiten, pH-Wert mit NaOH einstellen und auf 1 L Puffer auffüllen, 0,2 µm-steril filtriert

Substratpuffer pH 5,5	0,1 M Natriumacetat	
Lektin-Puffer (PBS); 0,01 mol/l; 0,015 mol/l NaCl; pH 7,3	78 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 89 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 87,66 mg NaCl	Jeweils 50 ml der 0,01 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ und der 0,01 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ zusammengeben.
0,2 M Borat-Puffer; pH 10	50 mmol/l Natriumtetraborat- Decahydrat;	mit 1 M NaOH auf pH 10
HEPES 2 (H2) 20 mmol/l HEPES + 5,5% (v/v) Glycerol + 325 mmol/l NaCl + 5 mmol/l $\text{MnCl}_2$ + 5 mmol/l $\text{CaCl}_2$ pH 6,8		mit 1M NaOH auf pH 6,8
HEPES 3 (H3) 25 mmol/l HEPES + 500 mmol/l NaCl + 1 mmol/l $\text{MnCl}_2$ ??? + 1 mmol/l $\text{CaCl}_2$ ??? pH 6,8		mit 1M NaOH auf pH 6,8
1 M Ethanolamin-Lösung	1,951 g EthanolaminxHCl + 20 ml ddH <sub>2</sub> O	pH mit NaOH (2 mol/l) auf 8,5 einstellen. Mit der Stammlösung eine 0,1 mol/l Lösung herstellen

Tab. 3.6: Instrumente

Instrument	Zweck	Hersteller	Details
Multiskan EX	ELISA-Platten Reader	Thermo Scientific, Schwerte	
Costar 3595	96-well culture cluster	Corning Incorporated (via Sigma-Aldrich, Schnelldorf	(Flat bottom)
Hera Safe	Cleanbench	Thermo Scientific, Schwerte	
Hereaus Pico17	Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte	
Titramax 101	Plattenschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach	
HTM130	Heizblock	HLC	
Ofen		Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach	
Pipetten Research		Eppendorf AG, Hamburg	10 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ , 5000 $\mu\text{l}$
Sonorex	Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin	35 kHz
Electronicrührer POLY15	Magnetrührer	Variomag, Daytona Beach, USA	
BIAffinity	RfS	Analytik Jena AG, Jena	Prototyp
BIAffinity	RfS	Analytik Jena AG, Jena	Nullserie Generation 1
BIAffinity	RfS	Analytik Jena AG, Jena	Nullserie Generation 2
CP225D-OCE	Feinwaage	Satorius AG, Göttingen	
NanoWizard™	Atomic Force Microscop (AFM)	JPK Instruments, Berlin	
NSC 16 AIBS	AFM cantilevers	Micromasch, Estonia	Ultra sharp tips (Spitzenradius < 10 nm), Länge 125 $\mu\text{m}$ , Federkonstante 36 N/m
Hitachi S-510	Rasterelektronenmikroskop		

### 3 MATERIAL UND METHODEN

SmartSpec 3000	Photometer	Bio-RadLaboratories GmbH, München	Zellzahlbestimmung
Mini-PROTEAN® Tetra	Elektrophorese-Kammer	Bio-RadLaboratories GmbH, München	
	Puffer-Filtrierungs-Gerät	VWR International GmbH, Darmstadt	1000 ml
KNF Laboport	Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg i.B.	
Lab 850	pH-Meter	Schott AG, SI Analytics GmbH, Mainz	

**Tab. 3.7: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Anmerkungen
Präzisionswischtücher	KIMTECH Science	Kimberly-Clark Professional	fusselfrei
Filtervorsatz	CHROMAFIL® PET-45/25	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren	Vorsatz für Spritze
Spritzen + Kanülen	NORM-JECT® 5 ml (6 ml)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen	
Spritzen + Kanülen	NORM-JECT® 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen	
unbehandelte Glaschips		Analytik Jena AG, Jena	
Mikrotiterplatten für Mannan-Versuche	Costar 3590, 96Well EIA/RIA Plate, Flat Bottom without Lid, High Binding Polystyrene	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	

#### 3.8 Software

Software	Internetadresse
Origin 8 Pro	kein Online-Tool
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
Outlier Calculator	<a href="http://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/">http://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/</a>
ACD/ChemSketch (Freeware) Produktversion 12.01	<a href="http://www.acdlabs.com">http://www.acdlabs.com</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Oberflächenmodifikationen

#### 3.2.1.1 OF-Modifikation mittels 3-Octadecyltrimethoxysilan (OTS-Chips)

Das verwendete Protokoll findet sich auch in der Dissertation von Dr. Saikat D. Mazumdar (AK Keusgen). Im Lauf der vorgelegten Arbeit wurden einige Modifikationen vorgenommen, die im nachfolgenden Protokoll berücksichtigt worden sind.

1. Jeweils 5 Glaschips wurden in einer extra angefertigten Teflonhalterung positioniert, so dass jeweils ein Steckplatz zwischen den Chips frei war. Die Chips wurden samt Halterung in einen Färbetrog mit Aceton überführt und für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Chips in der Halterung unter einer Cleanbench getrocknet.

Anmerkung: Zunächst wurde mit technischem Aceton gearbeitet; später wurde zu Aceton für Gaschromatographie gewechselt (siehe Anmerkungen bei den entsprechenden Versuchen).

2. Die Chips wurden in einer anderen Teflon-Halterung in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert. (Sie wurden in eine neue Halterung überführt, damit keine Aceton-Reste in die NaOH-Lösung überführt werden.)

3. Anschließend wurden die Chips durch viermaliges Waschen in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 2 min in einem Ultraschallbad von NaOH-Resten befreit.

4. Dann folgte die Inkubation der Chips in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%) + 16 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) über 30 min in einem Ultraschallbad.

5. Reste von Piranha-Lösung wurden durch viermaliges Spülen der Chips in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 2 min in einem Ultraschallbad entfernt.

6. Reste von ddH<sub>2</sub>O wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt.

7. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt.

8. Die Chips wurden dann in Zentrifugengläser, befüllt mit jeweils 6 ml 1%-iger (m/m) 3-Octadecyltrimethoxysilan-Lösung (technisch, ≥90%) in Toluol (für Gaschromatographie), überführt und für 6 h (RT, Schüttler 300 rpm) inkubiert.

9. Reste von 3-Octadecyltrimethoxysilan wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

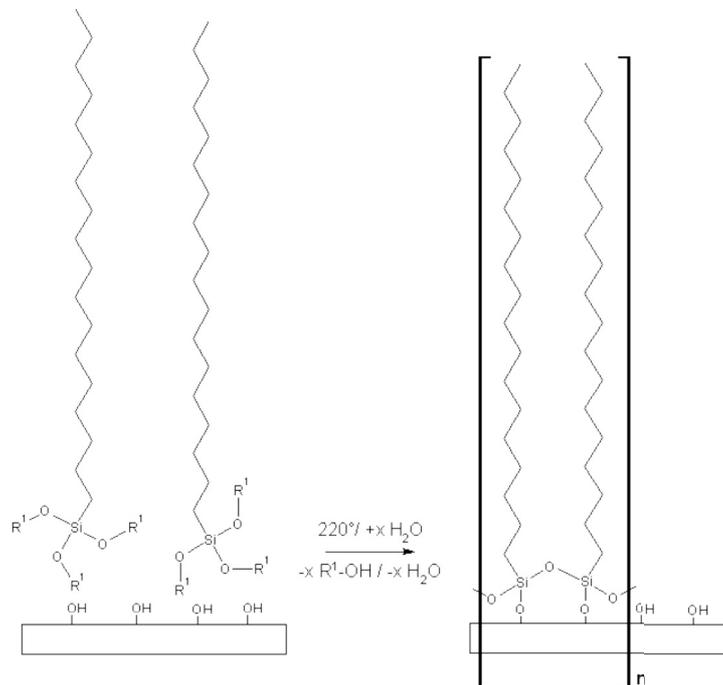
10. Reste von Toluol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

11. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 100 ml ddH<sub>2</sub>O für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

12. Die Chips wurden anschließend aus der Halterung mittels einer Pinzette entnommen. Sie wurden mit der „dicken“ Glasseite (s. 3.2.4.1) nach oben auf zuvor mit Aceton gereinigten Mikroskopierobjektträgern positioniert, welche zuvor in einem verschließbaren Schutzgefäß deponiert wurden. In dieser Anordnung wurden sie in einem Ofen bei 220°C für 15 min erhitzt.

Nach 15 min wurden die Chips in dem Schutzbehälter aus dem Ofen entnommen und zur Abkühlung unter die Cleanbench gestellt. Zur Lagerung empfiehlt sich ein verschließbarer Rundkolben aus Glas unter der Cleanbench. Die Chips sollten stets mit der „dicken“ Seite (s. 3.2.4.1) nach oben gelagert werden und sollten sich nicht überlappen. Sichtbare Fussel können im Folgenden mit reiner Druckluft aus der Dose entfernt werden. Das Reaktionsschema ist bildlich in Abb. 3.1 dargestellt.



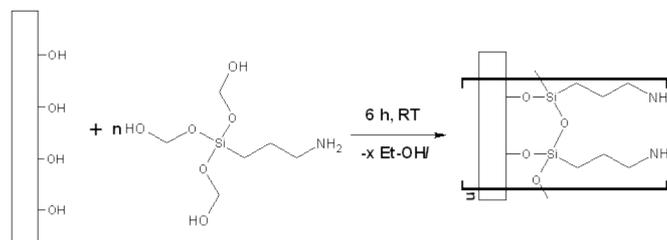
**Abb. 3.1 Reaktionsschema OTS-Funktionalisierung.** Linke Seite - Zustand der OF nach Schritt 7 (aktivierte OF)

Im ursprünglichen Protokoll sind der erste Reinigungsschritt mit Aceton und das Erhitzen im Ofen bei 220 °C nicht enthalten sind:

#### **3.2.1.2 Mannan I: „Klassische“ Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips**

1. Die Chips wurden in einer Halterung platziert und in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert.
2. NaOH-Reste wurden durch 4-maliges Waschen in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 45 s in einem Ultraschallbad von den Chips entfernt.

3. Anschließend wurden sie 30 min in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%) + 16 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) in einem Ultraschallbad inkubiert.
4. Reste der Piranha-Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Chips in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für je 60 s in einem Ultraschallbad entfernt.
5. ddH<sub>2</sub>O-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.
6. Methanol-Reste wurden von den Chips durch 3-maliges Waschen für je 60 s in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.
7. Die Chips wurden für 6 h in je 6 ml einer 1%-igen (m/m) APTES-Lösung (≥98%) in Toluol (für Gaschromatographie) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert. Die APTES-Lösung wurde zuvor mit PTFE-Filtern gefiltert, um eventuelle Polymerisierungsprodukte auszuschließen.
8. Überschüssiges APTES wurde durch 3-maliges Waschen für je 60 s in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) entfernt. Dabei wurden die Chips mit einer Pinzette gehalten und hin und her geschwenkt.
9. Toluol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) entfernt. Dabei wurden die Chips mit einer Pinzette gehalten und hin und her geschwenkt.
10. Methanol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s in 100 ml ddH<sub>2</sub>O entfernt. Dabei wurden die Chips mit einer Pinzette gehalten und hin und her geschwenkt. Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.2 illustriert.



**Abb. 3.2: Reaktionsschema APTES an aktivierter Glasoberfläche.**

11. Die Chips wurden ungetrocknet in Schnappdeckelgläschen mit je 6 ml BDDG-Lösung (3ml/10ml 1,4 Butandiolglycidylether (BDDG, ≥95%) in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10 + 6 mg/ml NaBH<sub>4</sub> (≥96%)) überführt und 12 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
12. Danach wurde ungebundenes BDDG durch 3-maliges Reinigen für je 60 s in 100 ml ddH<sub>2</sub>O von den Chips entfernt. Dabei wurden die Chips mit einer Pinzette gehalten und hin und her geschwenkt. Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.3 dargestellt.
13. Anschließend wurden die Chips 24 h in Schnappdeckelgläschen, befüllt mit je 6 ml Mannan-Lösung (5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10), bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert. Die Mannan-Lösung wurde zuvor mit einer Spritze mit PET 45/25-Filter gefiltert, um größere unlösliche Anteile aus der Lösung zu entfernen.

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

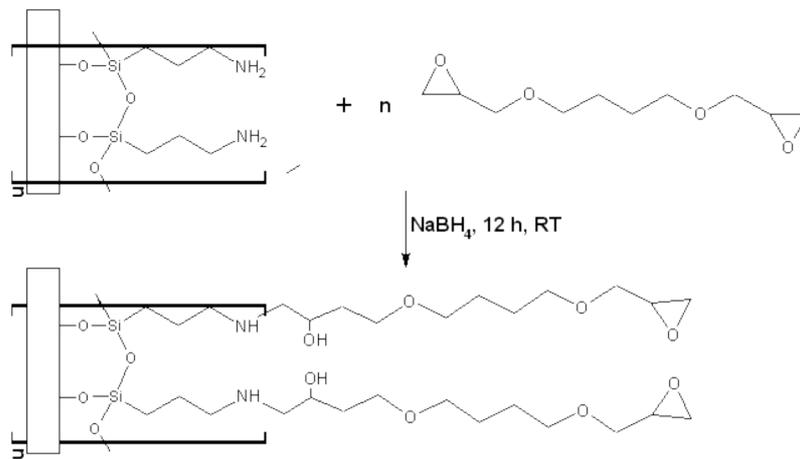


Abb. 3.3: Reaktionsschema BDDG an APTES-funktionalisierter Glasoberfläche nach Mannan I-Protokoll.

14. Ungebundenes Mannan wurde durch 3-maliges Reinigen der Chips für je 60 s in 100 ml ddH<sub>2</sub>O entfernt. Dabei wurden die Chips mit einer Pinzette gehalten und hin und her geschwenkt. Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.4 dargestellt.

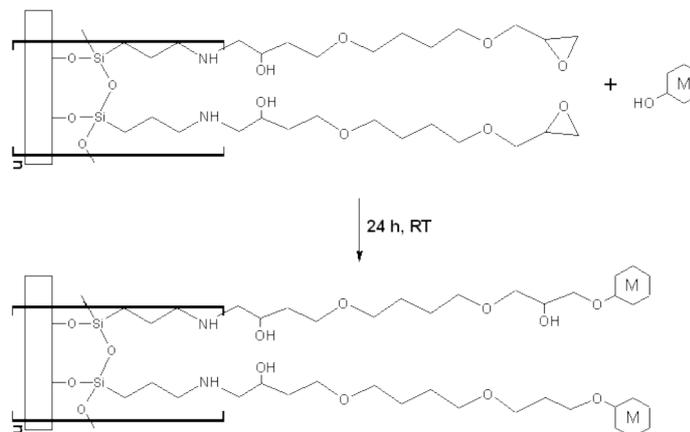


Abb. 3.4: Reaktionsschema Mannan an APTES/BDDG-funktionalisierter Glasoberfläche.

15. Die Trocknung und Lagerung der Chips erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

#### 3.2.1.3 Mannan II: Protokoll zur Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips

1. Jeweils 5 Glaschips wurden so in einer Teflonhalterung platziert, dass jeweils ein Steckplatz in der Halterung frei blieb. Die Halterung samt Chips wurde zur Reinigung in einen Färbetrog mit Aceton (für Gaschromatographie) überführt und für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurden die Chips in der Halterung unter einer Cleanbench getrocknet.

2. Die Chips wurden in eine neue, trockene der Halterung überführt und in 40 ml NaOH (6 mol/l) für 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert.
3. NaOH-Reste wurden durch 4-maliges Waschen in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für je 2 min in einem Ultraschallbad von den Chips entfernt.
4. Anschließend wurden sie für 30 min in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%) + 16 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) in einem Ultraschallbad inkubiert.
5. Reste der Piranha-Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Chips in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für je 2 min im Ultraschallbad entfernt.
6. ddH<sub>2</sub>O-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.
7. Methanol-Reste wurden von den Chips durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.
8. Die Chips wurden für 6 h in je 6 ml einer 1%-igen (m/m) APTES-Lösung (≥98%) in Toluol (für Gaschromatographie) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
9. Überschüssiges APTES wurde durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) auf einem Schüttler (350 rpm) entfernt.
10. Toluol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) auf einem Schüttler (350 rpm) entfernt.
11. Methanol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (250 rpm) entfernt.
12. Die Chips wurden 2 h in einem ddH<sub>2</sub>O-Bad bei 40 °C inkubiert.
13. Die Chips wurden dem ddH<sub>2</sub>O-Bad entnommen. Das Restwasser wurde unter der Cleanbench mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig abgezogen. Nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 40 min in einem verschlossenen Glasgefäß (mit der „dicken“ Seite nach oben; s. 3.2.4.1) in einem Ofen bei 120 °C erhitzt. Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.5 dargestellt.

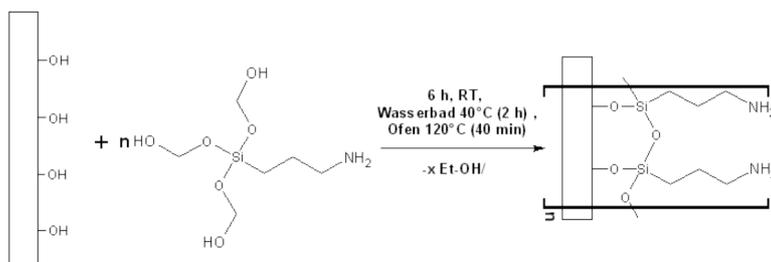


Abb. 3.5: Reaktionsschema BDDG an APTES-funktionalisierter Glasoberfläche nach Mannan II-Protokoll.

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

14. Die abgekühlten Chips (RT, unter Cleanbench, verschlossenes Gefäß) wurden anschließend in Zentrifugengläser mit je 6 ml BDDG-Lösung (3ml/10ml 1,4-BDDG ( $\geq 95\%$ ) in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10 + 6 mg/ml  $\text{NaBH}_4$  (96%)) überführt und für 12 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert. (Die Zentrifugengläser wurden mit Parafilm verschlossen. Damit das entstehende  $\text{H}_2$  entweichen konnte wurden sie mit einigen Löchern versehen.)

15. Danach wurde ungebundenes BDDG durch 3-maliges Reinigen für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (350 rpm) von den Chips entfernt. (Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.3 dargestellt.)

16. Anschließend wurden die Chips 24 h in Schnappdeckelgläschen, befüllt mit je 6 ml Mannan-Lösung (5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.

17. Ungebundenes Mannan wurde durch 3-maliges Reinigen der Chips für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (350 rpm) entfernt. (Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.4 dargestellt.)

18. Die Trocknung und Lagerung der Chips erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

#### **3.2.1.4 Mannan III: Protokoll zur Mannan-Funktionalisierung von APTES-Chips**

1. Jeweils 5 Glaschips wurden so in einer Teflonhalterung platziert, dass jeweils ein Steckplatz in der Halterung frei blieb. Die Halterung samt Chips wurde zur Reinigung in einen Färbetrog mit Aceton (für Gaschromatographie) überführt und für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurden die Chips und Halterung unter einer Cleanbench getrocknet. Die Chips wurden in einer Halterung platziert und in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert.

2. Die Chips wurden in eine neue, trockene Halterung überführt und in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert.

3. NaOH-Reste wurden durch 4-maliges Waschen in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 2 min in einem Ultraschallbad von den Chips entfernt.

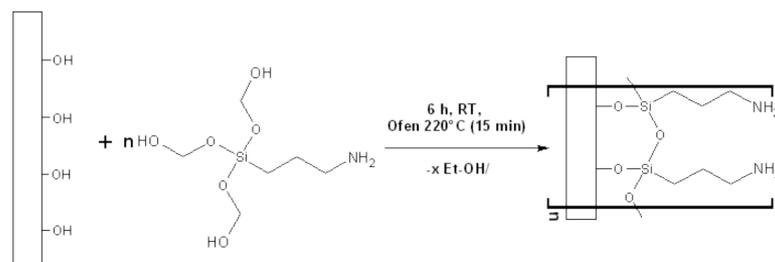
4. Anschließend wurden sie 30 min in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95%) + 16 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)) in einem Ultraschallbad inkubiert.

5. Reste der Piranha-Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Chips in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für je 2 min in einem Ultraschallbad entfernt.

6. ddH<sub>2</sub>O-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.

7. Methanol-Reste wurden von den Chips durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie, getrocknet) in einem Ultraschallbad entfernt.

8. Die Chips wurden für 6 h in je 6 ml einer 1%-igen (m/m) APTES-Lösung in Toluol (für Gaschromatographie, getrocknet) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert.
9. Überschüssiges APTES wurde durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) auf einem Schüttler (250 rpm) entfernt.
10. Toluol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) in einem Ultraschallbad entfernt.
11. Methanol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O in einem Ultraschallbad entfernt.
12. Das Restwasser wurde unter einer Cleanbench mit Hilfe der Kapillarkräfte eines fusselfreien Tuchs, welches an den Rand des Chips angelegt wurde, so weit wie möglich entfernt. Die Chips wurden dann in ein sauberes Glasgefäß mit Deckel positioniert („dicke“ Chipseite nach oben; s. 3.2.4.1) und 15 min in einem Ofen bei 220 °C erhitzt. Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.6 dargestellt.



**Abb. 3.6:** Reaktionsschema BDDG an APTES-funktionalisierter Glasoberfläche nach Mannan III-Protokoll.

13. Nach der Inkubation im Ofen wurden die Chips im verschlossenen Glasbehälter unter der Cleanbench gelagert, bis sie wieder Raumtemperatur erreicht hatten. Dann wurden sie in Schnappdeckelgläsern mit je 6 ml BDDG-Lösung (3ml/10ml 1,4-BDDG (≥95%) in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10 + 6 mg/ml NaBH<sub>4</sub> (≥96)) überführt und 12 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert.
14. Danach wurde ungebundenes BDDG durch 3-maliges Reinigen für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (250 rpm) von den Chips entfernt. (Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.3 dargestellt.)
15. Anschließend wurden die Chips 24 h in Schnappdeckelgläsern, befüllt mit je 6 ml Mannan-Lösung (5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10), bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert.
16. Ungebundenes Mannan wurde durch 3-maliges Reinigen der Chips für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (250 rpm) entfernt. (Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.4 dargestellt.)

17. Die Trocknung und Lagerung der Chips erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

#### **3.2.1.5 Mannan IV: Mannan-Funktionalisierung von OTS-OF**

1. Jeweils 5 Glaschips wurden in einer extra angefertigten Teflonhalterung positioniert, so dass jeweils ein Steckplatz zwischen den Chips frei war. Die Chips wurden samt Halterung in einen Färbetrog mit Aceton (für Gaschromatographie) überführt und für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Chips in der Halterung unter einer Cleanbench getrocknet.
2. Die Chips wurden in einer neuen Teflon-Halterung in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Danach wurden sie in eine neue Halterung gesetzt, damit keine Aceton-Reste in die NaOH-Lösung überführt werden.
3. Anschließend wurden die Chips durch viermaliges Waschen in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 2 min in einem Ultraschallbad von NaOH-Resten befreit.
4. Dann folgte die Inkubation der Chips in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%) + 16 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) über 30 min in einem Ultraschallbad.
5. Reste von Piranha-Lösung wurden durch viermaliges Spülen der Chips in 100 ml ddH<sub>2</sub>O für 2 min in einem Ultraschallbad entfernt.
6. Reste von ddH<sub>2</sub>O wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt.
7. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt.
8. Die Chips wurden dann in Zentrifugengläser, befüllt mit jeweils 6 ml 1%-iger (m/m) 3-Octadecyltrimethoxysilan-Lösung (≥90%) in Toluol (für Gaschromatographie), überführt und für 6 h (RT, Schüttler 300 rpm) inkubiert.
9. Reste von 3-Octadecyltrimethoxysilan wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Toluol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).
10. Reste von Toluol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 40 ml Methanol (für Gaschromatographie) für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).
11. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips samt Halterung in jeweils 100 ml ddH<sub>2</sub>O für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).
12. Die Chips wurden anschließend aus der Halterung mittels einer Pinzette entnommen. Sie wurden mit der „dicken“ Glasseite nach oben (s. 3.2.4.1) auf zuvor mit Aceton gereinigten Mikroskopierobjektträgern positioniert, welche zuvor in einem verschließbaren Schutzgefäß deponiert wurden. In dieser Anordnung wurden sie in einem Ofen bei 220°C für 15 min erhitzt.

13. Nach 15 min wurden die Chips in dem Schutzbehälter aus dem Ofen entnommen und zur Abkühlung (bis Raumtemperatur) unter die Cleanbench gestellt. (Das Resultat dieser Schritte ist im Reaktionsschema in Abb. 3.1 dargestellt.)
14. Die Chips wurden dann für 24 h bei RT in Zentrifugengläser gegeben, die zuvor mit je 6 ml einer Mannan-Lösung (5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10) befüllt worden waren und auf einem Schüttler (250 rpm) bei RT inkubiert.
15. Ungebundenes Mannan wurde durch 3-maliges Reinigen der Chips für je 2 min in 100 ml ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler (250 rpm) entfernt.
16. Die Trocknung und Lagerung der Chips erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

#### **Anmerkungen:**

**1. Achtung:** Die mit NaOH und Piranha-Lösung gereinigten Chips besitzen eine hohe Oberflächenenergie und dürfen nun nicht mehr trocken fallen (d.h., sie müssen stets vollständig benetzt sein, wenn sie aus der Piranha-Lösung genommen werden und in Kontakt mit der Umgebungsluft kommen; solche Phasen müssen so kurz wie möglich gehalten werden), da es ansonsten zu Verunreinigungen der Oberfläche durch Stoffe in der Umgebungsluft kommen kann.

**2. Achtung:** Die Reaktion von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist stark exotherm! Wasserstoffperoxid sollte zu Beginn der Arbeiten aus dem Kühlschrank genommen werden und unter Lichtabschluss auf Zimmertemperatur erwärmt werden. Die Schwefelsäure wurde stets im Färbetrog vorgelegt, die Halterung mit den Chips hineingestellt und das Wasserstoffperoxid hinzugefügt, indem es langsam an der Färbetrogwand herunterlaufen gelassen wurde.

3. Die verwendeten Zentrifugengläser wurden zuvor selbst mit dem Silan beschichtet, mit welchem gearbeitet wurde, damit im Beschichtungsprozess die Konzentration des Reagenzes nicht durch Adsorption an die Zentrifugenglaswand verändert wird.

4. Die Qualität der hydrophoben Modifikation lässt sich beim langsamen Herausziehen der Chips aus dem Wasser abschätzen. Ist der Chip völlig trocken, spricht dies für hohe Qualität. Bleiben Tropfen erhalten, sollte man den Chip vorsichtig mit der Kante auf ein sauberes, fusselfreies Tuch klopfen. Lässt sich das Wasser auch dadurch nicht entfernen, sollte der Chip verworfen werden. APTES-funktionalisierte Chips dagegen sind nach dem langsamen Herausziehen aus dem Wasserbad benetzt.

5. Der Ofen sollte vor Schritt 9 eingeschaltet werden, damit er rechtzeitig auf die gewünschte Temperatur kommt (Dauer: etwa 20 min). Die Skala des Temperatureinstellknopfs ist bei dem verwendeten Ofen sehr ungenau. Die Temperatur wurde durch ein Thermometer kontrolliert, welches im Innenraum deponiert wurde.

#### 3.2.2 Legionellenkultivierung und -preparation

##### **3.2.2.1 Legionella pneumophila-Zellen vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin des UKGM, Gießen (Leg1G)**

Die *Legionella pneumophila*-Zellen wurden vom Institut für Hygiene- und Umweltmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH unter der Leitung von Frau Dipl. Ing. Susanne Harpel angezogen und zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus einem Isolat aus Wasserproben, welches gemäß TrinkwV 2001 („Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch“) der Bundesrepublik Deutschland gewonnen wurde.

Das Isolat wurde auf *Legionella*-GVPC-Selektivnährböden (zur Isolierung aus der Umwelt) der Firma Oxoid aufgebracht und inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden von den Platten mit 10 ml NaCl abgeschwemmt. Die Konzentration der Zellen wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension zur Inaktivierung in 9 ml einer 1 %-ige Thimerosal-Lösung gegeben und für 48 h bei 36 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 48 h eingefroren, wieder aufgetaut und jeweils 0,5 ml-Proben der Suspension zur Kontrolle der Inaktivierung auf zwei GVPC-Platten aufgetragen. Blieb das Wachstum aus wurden die Zellen für die Experimente verwendet.

##### **3.2.2.2 Legionella pneumophila-Zellen vom Forschungsinstitut für Medizintechnik und Biotechnologie (FzMB), Bad Langensalza (Leg1P)**

Die *L. pneumophila*-Zellen der Serogruppe 1, Stamm Philadelphia wurden von Frau Andrea Helming vom Robert-Koch-Institut bezogen. Die Legionellen wurden von Frau Helming wie folgt kultiviert:

BCYE-Agar: 10 g Hefeextrakt und 5 g N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure (ACES) wurden in 900 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 1 M KOH auf pH 6,9 eingestellt. Dann wurden 2 g Aktivkohle und 15 g Agar hinzugefügt und mit Wasser auf 980 ml aufgefüllt. Das Medium wurde in einem Autoklaven sterilisiert und anschließend durch 10 ml sterilisiertes L-Cystein (40 g/L) und 10 ml Fe(III)NO<sub>3</sub> (25 g/L) ergänzt. Die Platten wurden mit je 20 ml des Mediums gegossen und zum Entfernen von Schaumbläschen an der Oberfläche abgeflammt. Unter einer Sicherheitswerkbank wurde auf jeder Platte je eine Mikrobankugel ausgestrichen und bei 37°C inkubiert, bis deutliches Zellteilungswachstum zu erkennen war. Die Zellen wurden mit 2 ml dH<sub>2</sub>O von den Platten abgeschwemmt

Flüssigmedium: 10 g Hefeextrakt und 10 g ACES wurden in 900 ml (einfach-) destillierten Wassers (dH<sub>2</sub>O) gelöst und mit 1 M KOH auf pH 6,9 eingestellt. Das Medium wurde in einem Autoklaven sterilisiert. Anschließend wurde das Medium durch 10 ml sterilisiertes L-Cystein (40 g/L) und 10 ml Fe(III)NO<sub>3</sub> (25 g/L) ergänzt. Die Zellen wurden zunächst auf BCYE-Platten gezogen, mit einem Wattestäbchen abgenommen und in H<sub>2</sub>O überführt, bis eine optische Dichte von OD<sub>600</sub>>2 gemessen werden konnte. Das Flüssigmedium wurde mit 500 µl dieser Suspension inokuliert und bei 37°C auf einen

Schüttler bei 90 rpm inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf Falcon-Tubes aliquotiert und bei 5000xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit Medium wurde verworfen während das Zell-pellet in sterilem Wasser resuspendiert wurde. Außerdem wurde die Zellsuspension mit BSA-blockierten TF112 Filterfritten zur Beseitigung von Agglomeraten filtriert.

Zur Inaktivierung der Zellen wurden zunächst 1 ml Zellsuspension mit 9 ml einer 1%-igen Thimerosal-lösung versetzt und für 48 h bei 36°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen, indem sie bei 5000\*g für 10 min zentrifugiert und anschließend die Pellets mit PBS oder dH<sub>2</sub>O resuspendiert wurden. Zum Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung wurde eine Probe auf Medium ausplattiert. Blieb das Me-dium koloniefrei, wurde die Charge für Experimente freigegeben.

Die Zellen wurden in Form einer dH<sub>2</sub>O-Suspension geliefert. Die Messungen im RfS fanden in PBS statt. Da der Brechungsindex von dH<sub>2</sub>O sich vom Brechungsindex von PBS unterscheidet, müssen die Zellen in PBS überführt werden, um bei der Messung Brechungsindex-Effekte auszuschließen. Mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm (Hereaus Pico17)) wurden die Zellen in der dH<sub>2</sub>O-Zell-Suspension pelletiert und der Überstand (dH<sub>2</sub>O) verworfen. Das Pellet wurde anschließend in sterilem PBS resus-pendiert und die Zellen-Konzentration auf  $1,5 \cdot 10^9$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.2.3 Nachweis der Antikörperbindung an *Legionella* in Mikrotiterplatten

Da es sich bei den verwendeten Zellen um ein Wildtyp-Isolat aus Gießen handelte, musste überprüft werden, ob die erworbenen Antikörper zur Antigenpräsentation dieses speziellen Stammes passen. Zu diesem Zweck wurden je 200 µl *L. pneumophila*-Lösung einer Konzentration von  $7,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml in PBS pH 7,3 in Wells einer 96 Well EIA/RIA-Platte mit flachem Boden gegeben und für 24 h bei 4°C inkubiert, um die Adsorption der Zellen an den Boden der Wells zu erreichen. Anschließend wurde zunächst mit 200 µl PBS pro Well gewaschen, um nicht-adsorbierte Zellen zu entfernen. Nicht besetz-te Bindungsstellen wurden durch die Applikation von je 200 µl BSA (1 mg/ml) in PBS pH 7,3 und Inku-bation für 1 h (RT, Schüttler 200 rpm) blockiert, um die Adsorption der im nächsten Schritt folgenden Antikörpern an das Mikrotiterplattenmaterial zu verhindern. Durch einen Waschschrift mit 200 µl PBS pro Well wurde nicht-adsorbiertes BSA entfernt. Darauf folgend wurden 200 µl einer 1:1000-Verdünnung des fraglichen Legionellen-Antikörpers (4,5 mg/ml-Stammlösung) in PBS für 1 h (RT, Schüttler, 200 rpm) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurde durch drei 10-minütige Waschschriffe mit jeweils 200 µl PBS pro Well entfernt (RT, Schüttler 200 rpm). Danach wurde ein polyklonaler An-tikörper gegen Kaninchen-Antikörper mit einem HRP-Lable (anti-rabbit-IgG-[H&L]-HRP-Konjugat) appliziert (1:10000-Verdünnung in PBS (2 mg/ml Stammlösung) und für 1 h inkubiert (RT, Schüttler 200 rpm). Darauf folgten drei weitere Waschriffe mit je 200 µl PBS für je 10 min (RT, Schüttler 200 rpm) und ein Waschschrift mit Substratpuffer für 10 min (RT, Schüttler 200 rpm). Die HRP-TMB-

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

Reaktion wurde ausgelöst durch Applikation von 150 µl einer Substrat-Lösung (Stammlösung: 0,1 ml TMB in DMSO (10 mg/ml) + 0,02 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03% in ddH<sub>2</sub>O) + 1 ml Dextran-Lösung (100 mg/ml) + 8,88 ml Substratpuffer). Der Umsatz zum blauen Farbstoff wurde durch die Addition von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24%) gestoppt.

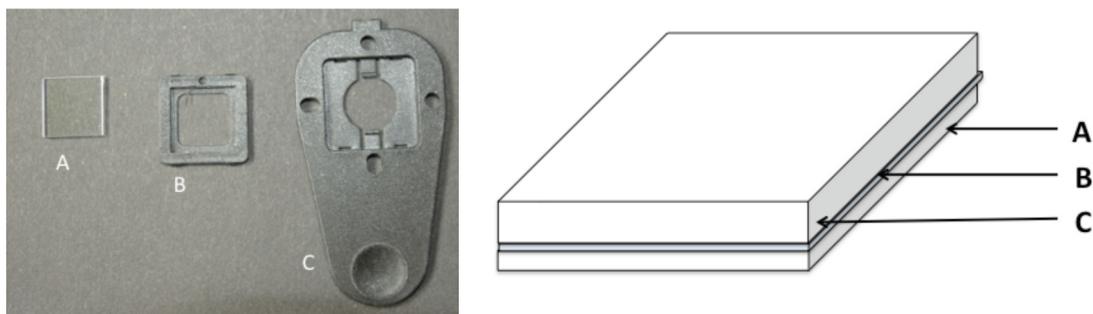
Der Umsatz zum blauen Farbstoff wurde quantifiziert, indem in einem ELISA-Plate-Reader die Absorptionen bei den Wellenlängen von 450 nm und 620 nm gemessen wurde. Zur Kontrolle wurden drei Experimente unter den gleichen Bedingungen jedoch unter Auslassung von *L. pneumophila*, anti-*L. pneumophila* und des anti-rabbit-IgG-[H&L]-HRP-Konjugat durchgeführt.

#### 3.2.4 Arbeiten mit dem BIAffinity®

Das BIAffinity der Analytik Jena GmbH misst die Änderung der optischen Schichtdicke während Bioaffinitätsexperimente auf der Oberfläche von Glaschips durchgeführt werden. Das zugrunde liegende Messverfahren nutzt die Prinzipien der reflektometrischen Interferenz Spektroskopie (RIFS) (s. Kapitel 1.1.3). Gearbeitet wurde mit einem Prototyp, einem Gerät der Nullserie Generation 1 und einem Gerät der Nullserie Generation 2. Experimente mit *L. pneumophila* wurden auf den Geräten der Nullserie durchgeführt, Experimente mit Mannanoberflächen auf dem Prototypen. Wenn von dieser Regel abgewichen wurde, ist dies gesondert vermerkt.

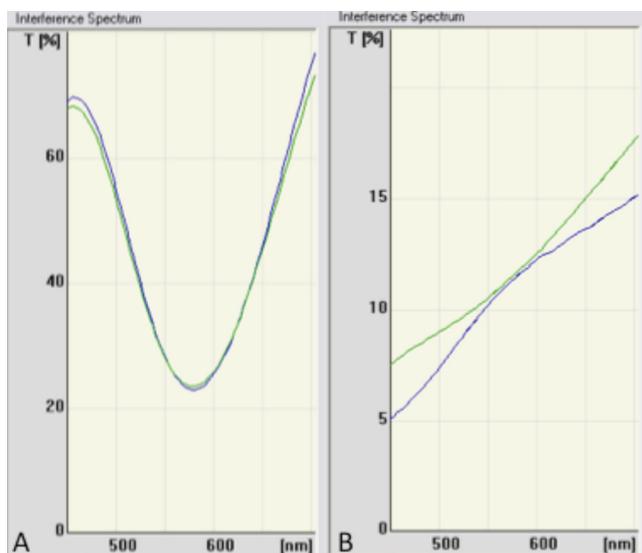
##### 3.2.4.1 Glassubstrate

Die Affinitätsstudien wurden auf Glaschips (Abb. 3.7 links A) durchgeführt, die von der Analytik Jena GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Die Chips sind dreischichtig aufgebaut. Zwischen einer dünnen Glasschicht und einer dickeren Siliziumdioxidschicht befindet sich eine 10 nm dicke Tantalpentoxid-schicht (Tantal(V)-O-oxid, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Abb. 3.7 rechts). In Ermangelung einer besseren Ausdrucksweise wird im Folgenden auf diese beiden Glasschichten mit den Begriffen „dicke“ und „dünne Seite“ referiert. Die Chips werden nicht einzeln geliefert, sondern in Form von Platten mit Sollbruchkanten. Abbrechen der Einzelchips von solchen Platten führt zu einer Bruchkante an der dünnen Seite des Chips, wodurch die dünne Seite erst erkennbar ist. Die Chips werden in einen Kunststoffrahmen (Abb. 3.7 links B) eingefügt und in eine Halterung (Abb. 3.7 links C) eingelegt. **Es ist wichtig darauf zu achten, dass die dünne Seite nach unten zeigt.** Die Experimentieroberfläche ist stets die dicke Seite und zeigt nach oben. Der Sensorchip ist auch im Gerät mit der dicken Seite nach oben orientiert. Die Flusszelle liegt oberhalb des Chips. Die beiden Komponenten werden durch einen definierten Andruck der Flusszelle an den Chip zusammengedrückt. Die Flusszelle liegt dann an der dicken Seite des Chips, der Experimentieroberfläche, an.



**Abb. 3.7: Einzelkomponenten (links) und Schema eines RIFS-Glaschips (rechts).** Links: A – Glaschip; B – Rahmen; C – Halterung; Rechts: A – dünne Glasschicht (liegt im Rahmen nach unten orientiert); B – Tantalpentoxidschicht (10 nm); C – dicke Glasschicht; dies ist die OF auf welcher die Experimente stattfinden (liegt im Rahmen nach oben orientiert). (Abbildung rechts nicht maßstabsgetreu.)

Werden die beiden Seiten verwechselt, schlägt sich dies nach dem Start der Messung im als „Interference Spectrum“ bezeichneten Teil der Messsoftware nieder. Dort wird die Transmission in Prozent aufgetragen gegen die Wellenlänge in einem Bereich von 400-750 nm angegeben. Der typische Verlauf ist parabelähnlich. Liegt die richtige Chipseite oben, ist die Skala der y-Achse im Bereich 0-80% (Abb. 3.8 A). Andernfalls geht der parabel-artige Verlauf verloren und die Skala der y-Achse zeigt einen Bereich von 0-20% Transmission (Abb. 3.8 B) an. In diesem Fall muss die Messung abgebrochen, der Chip aus der Halterung genommen und im Rahmen gedreht werden.



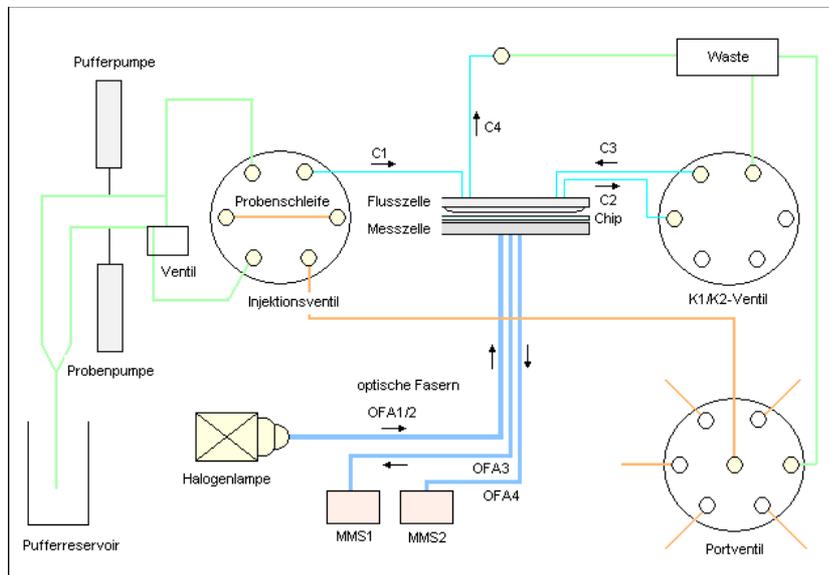
**Abb. 3.8: Interferenzspektren.** A – Gestalt des „Interferenzspektrums“, wenn der Chip korrekt eingelegt worden ist (dicke Seite nach oben orientiert). B - Gestalt des „Interferenzspektrums“, wenn der Chip falsch eingelegt wurde.

### 3.2.4.2 Aufbau des BIAffinity®

Wie die Abb. 3.9 zeigt besitzt das BIAffinity® zwei Injektionskolbenpumpen (Pufferpumpe und Probenpumpe) mit einer Strokekapazität von 100 µl, die einen pulsfreien Fluss durch die Flusszelle gewährleisten sollen. Ist der Chip eingelegt und eine Messung gestartet, sorgt eine der Pumpen für einen laminaren Pufferstrom über den Chip (Pufferpumpe), der sich aus einem Pufferreservoir (Puf-

### 3 MATERIAL UND METHODEN

ferreservoir) speist und in einem Abfallbehälter (Waste) endet. Die andere Pumpe (Probenpumpe) ist ebenfalls mit dem Pufferreservoir verbunden und sorgt für die Aufnahme der Proben über ein 6-Wege-Injektionsventil (Injektionsventil), mit dessen Hilfe die entsprechenden Proben über eine Probenschleife (Probenschleife) in den Strom in Richtung Flusszelle (Flusszelle) eingebunden werden.



**Abb. 3.9: Aufbau des BIAffinity.** Erklärungen siehe Text. Mit freundlicher Genehmigung durch Analytik Jena (Abbildung modifiziert).

Mit dem BIAffinity<sup>®</sup> hat man die Möglichkeit, auf einem Glaschip (Chip) zwei Flusskanäle zu verwenden. Eine Kapillare C1 steht als Zufluss zum Flusskanal 1 der Flusszelle zur Verfügung. Der Strom wird schließlich über Kapillare C2 weitergeleitet bis zu einem K1/K2-Umschaltventil (K1/K2-Ventil). Je nach Stellung wird hier der Pufferstrom in das Abfallreservoir (Waste) weiter geleitet oder über Kapillare C3 der zweite Flusskanal angesteuert. Ist Letzteres der Fall wird dann am Ausgang von Flusskanal 2 der Fluss über Kapillare C4 zum Abfallreservoir geleitet. Die Probenaufnahme geschieht mittels eines Portventils (Portventile), welches die Ansteuerung von fünf verschiedenen Probenreservoirs ermöglicht.

#### 3.2.4.3 Flusszelle (Micro Fluidic Cartridge)

Die Flusszelle und die Messzelle mit dem dazwischen liegenden Glaschip werden mit einem definierten Druck aufeinander gepresst, um eine genügende Abdichtung zu erreichen (Abb. 3.9); andernfalls könnte aus der Zelle Puffer auslaufen.

Die ursprünglichen Dimensionen der Flusskanäle von 1000  $\mu\text{m}$  in der Länge, 600  $\mu\text{m}$  in der Breite und 150  $\mu\text{m}$  in der Höhe ändern sich dadurch in der Höhendimension durch den Andruck auf 125  $\mu\text{m}$ . Die Bauteile sind aus dem Silikonmaterial Sylgard 170 gefertigt, einem Material, welches häufig eingesetzt wird, wenn Bauteile oder Bereiche gegen Feuchtigkeit, mechanische und thermische Schocks so wie Vibrationen geschützt werden müssen und gleichzeitig gute Adhäsionseigenschaften nötig sind. Die Flusszelle ist verbunden mit Kapillaren eines Innendurchmessers von 250  $\mu\text{m}$ . Damit kann das Totvolumen auf 700 nl begrenzt werden. Die Flusszelle stellt zwei Flusskanäle bereit, die zwar räumlich nebeneinander angeordnet aber bezüglich des Pufferstroms in Reihe geschaltet sind. Flusskanal 1 besitzt zwei Messspots, wodurch dieser zum Messkanal wird.

#### **3.2.4.4 Optik**

Die Messzelle ist beim eingelegten Chip unterhalb desselben angeordnet (Abb. 3.9). Die Lichtleitfasern werden von unten mit einem definierten Druck an den Chip angedrückt. In Flusskanal 1 sind zwei Messspots realisiert, die jeweils aus zwei optischen Fasern bestehen. Über jeweils eine optische Faser (OFA1 und OFA2) wird Weißlicht einer Halogenlampe zum Glaschip geleitet. Die jeweils andere Faser (OFA 3 und OFA4) leitet das an den Grenzflächen der Schichten, die sich während eines Experimentes bilden, reflektierte Licht weiter zu jeweils einem UV/VIS-Spektrometer in Form eines monolithischen Miniaturspektrometers (MMS1 und MMS2) (Diodenarray). Das Signal wird schließlich über einen Multiplexer (MUX) an einen Rechner übermittelt. Der Signalverlauf im Sensorgramm entspricht der zeitaufgelösten Änderung des Lichts.

#### **3.2.4.5 Messstrategien**

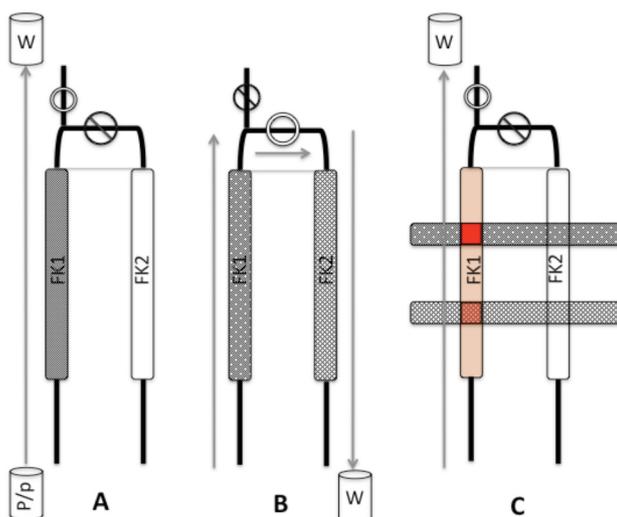
Prinzipiell sind mit dem BIAffinity drei unterschiedliche Messstrategien möglich, die sich aus der speziellen Konstruktion zum Zweck einfacher Kontrollexperimente ergeben.

##### Messstrategie 1

In der Regel wird ein im Reagenzglas chemisch modifizierter Chip in das Gerät eingelegt. Anschließend wird ein Biomolekül A, z.B. ein Protein, appliziert und online dessen Bindung an die chemisch modifizierte Oberfläche verfolgt (Abb. 3.10 A). Damit wäre ein möglicher Ausgangspunkt für Bioaffinitätsstudien etabliert. Im einem der nächsten Schritte soll die Interaktion eines Biomoleküls B, z.B. eines anderen Proteins, mit dem immobilisierten Biomolekül A untersucht werden. Zuvor muss jedoch ausgeschlossen werden, dass unspezifische Bindungen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Das erreicht man, durch sinnvolle Passivierungsmaßnahmen, die dafür sorgen, dass im Idealfall nur spezifische Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen A und B möglich sind. Das Instrument stellt dafür eine Reihe von Möglichkeiten bereit. So kann es den

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Chip in zwei verschiedenen Orientierungen aufnehmen: der Immobilisierungsorientierung und der Messorientierung. In der Immobilisierungsorientierung kann ein chemisch modifizierter Glaschip zunächst mit einem Biomolekül A beladen werden. Dabei ist lediglich Flusskanal 1 (FK1) aktiv (Abb. 3.10 A). Im nächsten Schritt werden die restlichen Stellen, an denen unspezifische Wechselwirkungen möglich sind, mit einem Passivierungsreagenz blockiert. Dabei sind beide Kanäle aktiv (Abb. 3.10 B), d.h., das Blockierungsreagenz setzt sich an Stellen, die in FK1 nicht von Biomolekül A belegt sind und in FK2 (hier wurde das Protein nicht immobilisiert, sondern nur mit Blockierungsreagenz blockiert) kann es die gesamte Oberfläche belegen. Dann wird die Messung gestoppt, der Chip ausgeworfen und in Messorientierung in das Gerät eingelegt (Abb. 3.10 C). Für die folgende Interaktionsanalyse wird nur FK1 aktiviert. Biomolekül B, dessen Wechselwirkung mit dem immobilisierten Biomolekül A beobachtet werden soll, wird appliziert. Der Chip liegt so im Instrument, dass der Strom mit Biomolekül B im FK1 zunächst Messspot 2 (MS2) erreicht. An dieser Stelle befindet sich die zuvor (als der Chip in Immobilisierungsrichtung blockiert wurde) nur mit Blockierer belegte Oberfläche. Das zu untersuchende Biomolekül B sollte hier nicht oder nur wenig wechselwirken (blass-rot auf unterem Messspot MS2). Als nächstes trifft der Strom auf MS1, dessen Oberfläche zuvor mit Biomolekül A beladen worden ist. Hier sollte nun Biomolekül B mit Biomolekül A wechselwirken, was sich online beobachten lässt (rot auf MS2). Man erhält also zwei Sensorgramme: ein Sensorgramm, welches eine erfolgreiche Immobilisierung und das Ausmaß der Blockierung nachweist bzw. anzeigt. Der Signalverlauf im Sensorgramm ist für beide Messspots ähnlich in Höhe und Verhalten. Im anderen Sensorgramm lässt sich nun das Verhalten des Signals von MS1 mit dem Signal von MS2 vergleichen.



**Abb. 3.10: Messstrategie 1.** A – Chip in Immobilisierungsorientierung eingelegt; FK1 offen; Immobilisierung des Biomoleküls A (dunkel schraffiert). B – Chip in Immobilisierungsorientierung; FK1 und 2 offen; Passivierung (weiße Kreuze, grauer Grund). C – Chip in Messorientierung eingelegt; FK1 offen; Bioaffinitätstest mit Biomolekül B (orange) → unterer Messspot (MS2) mit wenig unspezifischer Bindung von B; oberer Messspot (MS1) mit spezifischer Bindung von B (rot). FK – Flusskanal; W – Waste; P/p – Puffer (P)- bzw. Proben (p)-Reservoir. Pfeile - Flussrichtung.

Dem unterschiedlichen Verhalten liegt ein Unterschied in der Affinität des Biomoleküls B zum immobilisierten Biomolekül A einerseits und des Biomoleküls B zum Blockierungsreagenz ande-

rerseits zugrunde. Damit hat man im gleichen Sensorgramm sowohl das eigentliche Experiment als auch den Kontrollversuch. Mit dem Aufbau des BIAffinity ist somit eine bequeme Art gegeben, Kontrollversuche durchzuführen.

#### Messstrategie 2

Man kann jedoch auch eine andere Messstrategie verfolgen, indem man Experiment und Kontrollversuch von einander trennt. Der Chip wird in Immobilisierungsrichtung eingelegt und nur Kanal 1 aktiviert. Das Biomolekül A wird immobilisiert, ein Blockierungsreagenz appliziert und schließlich das Biomolekül B injiziert. Die Messung wird online verfolgt. Auf beiden Messspots wird der gleiche Prozess beobachtet. Da Kanal 2 in dieser Strategie noch nicht verwendet wurde, kann der Chip nun in der Halterung um 180° gedreht werden und ein weiteres Experiment, z.B. das Kontrollexperiment, durchgeführt werden. Auf diese Weise kann man pro Chip zwei Experimente durchführen.

#### Messstrategie 3

Man verwendet den Chip für eine erste Messung in der Immobilisierungsorientierung. Ist das Experiment zu Ende, wird der Chip entnommen und aus Rahmen und Halterung genommen. Er wird um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, wieder eingelegt und ein weiteres Experiment unternommen. Der Signalverlauf auf MS1 interessiert nicht, da die OF im Experiment davor schon belegt worden ist. Die Oberfläche unter MS2 ist jedoch noch unversehrt und kann für ein Experiment verwendet werden. Dann bricht man erneut ab, entnimmt den Chip aus Rahmen und Halterung, dreht ein weiteres Mal den Chip um 90° im Uhrzeigersinn im Rahmen und legt den Chip wieder ein. Auch hier kann die OF unter MS1 nicht verwendet werden, so dass die Daten ignoriert werden können. Die OF unter MS2 ist jedoch auch jetzt unversehrt und bereit für ein weiteres Experiment. Die Chiphalterung muss dabei stets in der gleichen Orientierung im Gerät liegen. Auf diese Weise können drei Messungen pro Chip durchgeführt werden, solange nur MS2 betrachtet wird.

Die erste Strategie hat den Vorteil, dass Experiment und Kontrollexperiment gemeinsam in einem Sensorgramm nachzuvollziehen sind. Der Nachteil ist, dass dadurch pro Chip nur ein Experiment möglich ist. Außerdem sind die Vorgänge in FK2 nicht kontrollierbar, da hier keine Messspots vorliegen, mit denen das Geschehen verfolgt werden könnte. Diese beiden Probleme werden durch die zweite Strategie gelöst. Dazu kommt, dass auf diese Weise auf zwei unterschiedlichen Bereichen des Chips das gleiche Experiment zweimal und zwar gleichzeitig durchgeführt werden kann. Jedoch dürfen hier strenggenommen die Messungen von Messspot 1 und 2 nicht direkt verglichen werden, da

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

es zu unterschiedlichem Signalverhalten auf Grund der Tatsache kommen könnte, dass Kanal 2 von dem Strom zuerst erreicht wird und Messspot 2 erst kurz danach. Das könnte dazu führen, dass es zu einem Konzentrationsgefälle bezüglich des applizierten Biomoleküls zwischen Messspot 2 und Messspot 1 kommt. Auf der Oberfläche unter Messspot 2 wird zunächst ein Großteil der Biomolekül gebunden, so dass die Lösung, welche in der Folge Messspot 1 erreicht, von geringerer Konzentration ist. Daher ist gerade in den ersten Minuten, nachdem die Applikation stattfand, mit unterschiedlichem Verhalten zu rechnen. Es dürfen also, ohne Angabe guter Gründe davon abzuweichen, lediglich die Signale von Kanal 1 mit anderen Signalen von Kanal 1 verglichen werden. Das gleiche gilt für Kanal 2. Jedoch können auch Kombinationen der Signale von Kanal 1 und Kanal 2 (Summe) untereinander verglichen werden.

#### **3.2.4.6 Vorbereitung einer Messung mit den BIAffinity®**

Systemspülung: Das BIAffinity® wurde zu Beginn jedes Arbeitstages zweimal mit dem Puffer gespült, mit dem die anschließenden Experimente durchgeführt werden sollten. Am Ende des Arbeitstages wurde das Gerät zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Danach wurden die Eppendorfgefäße gegen leere ausgetauscht und mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, so dass die Schlauchenden stets im ddH<sub>2</sub>O standen. Dadurch wird verhindert, dass Luft in das Gerät gelangt und Salze aus Pufferresten im Gerät kristallisieren. (Das Pufferreservoir ist stets mit einem Deckel mit einem Loch für den Schlauch zu versehen, damit Verdunstung verhindert wird, welche sich auf die Stoffmengenkonzentrationen im Puffer auswirken würde.)

Chip-Äquilibration: Nach dem Einlegen eines trockenen Messchips und dem Starten des Systems zum Zweck der Äquilibration des Chips im Pufferstrom wird ein Signal aufgezeichnet, welches nach wenigen Sekunden stark ansteigt und auf einem hohen Niveau bleibt. Der Grund dafür ist, dass zunächst ein Signal aufgezeichnet wird, welches sich auf den trockenen Chip bezieht. Sobald der Pufferstrom auf MS1 und etwas später auf MS2 ankommt, verändert sich der Brechungsindex des Medium über der Glasoberfläche. Dies führt zu einer drastischen Veränderung in der Signalhöhe. Sobald sich in der Vorbereitung eines Experimentes im Interferenzspektrum ein Bild wie in Abb. 3.8 A ergab und sich das Signal im Sensorgramm konstant entwickelte (ohne Sprünge, die auf Verschmutzungen hinweisen), wurde die Äquilibration abgebrochen und nochmals gestartet. Andernfalls kann man nicht den typischen Verlauf bei der Äquilibration verfolgen, was jedoch wichtig ist, da dies schon Rückschlüsse auf die Qualität einer Oberflächenmodifikation zulässt. Ergeben sich schon während der Äquilibration Schwankungen im Signalverlauf, sollte man den Chip nicht verwenden. Zu beachten ist außerdem, dass sich das Interferenzspektrum beim Übergang vom trockenen zum benetzten Chip deutlich verändert. Bei Chips gleicher Oberflächenmodifikation und Qualität hat das Spektrum im benetzten Zustand ein typisches Aussehen, welches sich einstellen sollte, sobald der Pufferstrom die

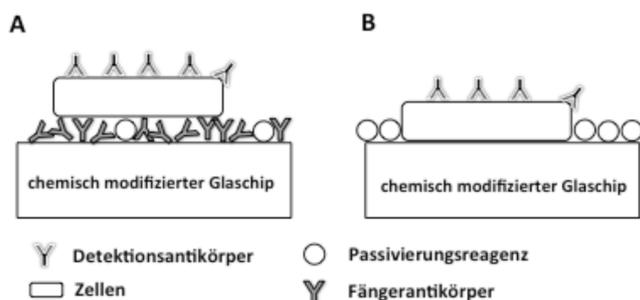
Messspots erreicht. Die beiden parabelförmigen Kurven sollten sich immer nahezu decken (Abb. 3.8 A). Die genaue Gestalt hängt von der Kalibrierung mit dem mitgelieferten Referenzchip ab. Sollten im benetzten Zustand Abweichungen zur typischen Gestalt des Spektrums auftreten, ist dies ein Indiz für Schmutz auf der Chipoberfläche. In solchen Fällen wurde die Flussrate kurz auf 200-300  $\mu\text{l}/\text{sec}$  erhöht, bis das Spektrum bezüglich MS1 und MS2 wieder in der typischen Gestalt vorlag. Zeigen diese Maßnahmen keine Wirkung, sollte der Chip dem Gerät entnommen werden und seine Unterseite mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig gereinigt werden. In seltenen Fällen läuft ein Kanal auch aus, vor allem, wenn auskristallisierte Salze einen dichten Abschluss zwischen Flusszelle und Chipoberfläche verhindern. Wenn alle genannten Maßnahmen keine Wirkung zeigen, besteht eventuell ein deutlicher Unterschied in der Qualität der Oberflächenmodifikationen unter MS1 und MS2. Das spiegelt sich meist auch in den Signalen von Messungen wieder, die auf solchen Chips durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind dann zu verwerfen.

Wie vom Hersteller empfohlen wurde etwa alle sechs Monate eine Referenzierung des Systems mit einem speziellen Referenzchip durchgeführt. Außerdem wurde das System regelmäßig wie in der Anleitung beschrieben mit Detergenzien und antibakteriellen Substanzen gereinigt.

### 3.2.4.7 Assay-Formate auf dem BIAffinity<sup>®</sup>

#### 3.2.4.7.1 Experimente mit *Legionella pneumophila*

In dieser Arbeit wurde vor allem die Strategie des klassischen Sandwich-Assay-Formats (SAF) gewählt. Gemäß dieser Strategie wird ein polyklonaler Fängerantikörper oder ein Lektin entweder kovalent oder adsorptiv durch hydrophobe Wechselwirkung auf einer Oberfläche immobilisiert. Im nächsten Schritt wird gegebenenfalls mit einem adäquaten Blockierungsreagenz blockiert. Als nächstes wird der fragliche Analyt appliziert und schließlich ein monoklonaler Detektionsantikörper (Abb. 3.11 A). In einigen Experimenten wurde der Antikörper nicht direkt auf der modifizierten Oberfläche immobilisiert sondern auf einer OF, die zuvor mit einem antikörperbindenden Linkerprotein ausgestattet worden ist (Protein A, Streptavidin, ConA-SAv-Fusionsprotein).



**Abb. 3.11: Grundlegende Experimentaldesigns.**  
A – Sandwich-Assay-Format; B – Direct-Assay-Format.

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

Außerdem wurde auch die Strategie eines direkten Assay-Formats (DAF) verfolgt. Dabei wird der Analyt auf bestimmte Weise unspezifisch, z.B. durch hydrophobe Wechselwirkung auf der Oberfläche fixiert und anschließend mit einem monoklonalen (oder seltener polyklonalen) Detektionsantikörper nachgewiesen (Abb. 3.11 B).

#### 3.2.4.7.2 Experimente mit dem Fusionsprotein auf der Mannanoberfläche

Experimente auf mannanfunktionalisierten Oberflächen folgen der Idee eines regenerierbaren Sandwich-Assay-Formats. Auch hier wird ein polyklonaler Antikörper als Fängerantikörper auf der Oberfläche immobilisiert und die Bindung eines Analyten mit der Bindung eines monoklonalen Detektionsantiköpers bestätigt. Der Polyklonale Antikörper wird allerdings nicht direkt auf einer Oberfläche immobilisiert sondern auf einem zuvor applizierten Linkerprotein. Dabei handelt es sich um eine rekombinant hergestellte Concanavalin A-Streptavidin-Chimäre (ConA-SAv) (s. Kapitel 1.4)

#### 3.2.5 Kontaktwinkelanalyse

##### 3.2.5.1 Hintergrund

Flüssigkeiten nehmen auf Oberflächen wegen der Interaktion mit ihnen eine bestimmte Form an, die von den Oberflächenspannungen der Flüssigkeit und der Festkörperoberfläche sowie der zwischen ihnen herrschenden Grenzflächenspannungen abhängig ist. Wird die Grenzfläche zwischen zwei beliebigen Phasen vergrößert, muss Arbeit verrichtet werden. Der Grund liegt in den energetischen Zuständen der Moleküle in den beiden Phasen. Das System strebt dem energetisch günstigsten Zustand entgegen, d.h., dass z.B. Ladungen bzw. Partialladungen der Flüssigkeitsmoleküle sich räumlich in der Flüssigkeit derart ausrichten, dass sie sich im Mittel neutralisieren. An Oberflächen kann diese räumliche Organisation nicht im gleichen Maße aufrecht erhalten werden, so dass ein Teil der Ladungen und Partialladungen unkompensiert bleibt. Durch Diffusion können OF-Moleküle in die Bulk-Flüssigkeit übergehen, wobei sie Energie abgeben. Umgekehrt muss Energie investiert werden, damit Teilchen an die OF treten können. Das ganze System wird den energetisch günstigsten Zustand anstreben, also die kleinste mögliche OF exponieren. In der Schwerelosigkeit nimmt Flüssigkeit demnach eine kugelförmige Gestalt an. Dividiert man die aufzuwendende oder aufgewendete Arbeit  $dW$  durch die zusätzlich erzeugte OF  $dA$ , erhält man die Oberflächenspannung  $\gamma$ , welche abhängig ist von der Temperatur  $T$ , dem Druck  $p$ , der Stoffmenge  $n$  und der Grenzfläche bzw. Oberfläche  $A$ . Unter isothermen, isobaren und isomolaren Bedingungen kann die Entropieänderung  $dG$  wie folgt ausgedrückt werden:

$$dG = \gamma dA = dW$$

Wobei sich für die Oberflächenspannung  $\gamma$  ergibt:

$$\gamma = \frac{dG}{dA}$$

Oberflächenspannungen  $\gamma$  von Flüssigkeiten liegen im Bereich 10-100 mN/m, die von Festkörpern im Bereich einiger N/m. Aufgrund der Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung wird die Form eines Tropfens auf einer OF durch die Oberflächenspannung des Festkörpers und der Flüssigkeit sowie der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Festkörper bestimmt. Die Oberflächenspannung kann man mittels des Kontaktwinkels am Dreiphasenkontaktpunkt (der Punkt, an dem Festkörper, Flüssigkeit und Umgebungsluft aufeinander treffen) ermitteln. Die Methode der Kontaktwinkelanalyse wird aber nicht nur verwendet, um die Oberflächenspannung zu bestimmen.

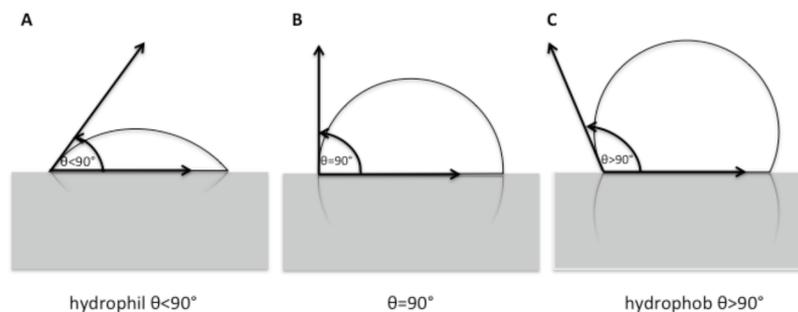


Abb. 3.12: Schematische Darstellung von Tropfen auf Oberflächen mit ihren Kontaktwinkeln  $\theta$ .

In dieser Arbeit wird die Methode verwendet, um den Silanisierungserfolg zu verifizieren und die Reproduzierbarkeit der Silanisierungsmethode festzustellen. Dafür ist es nicht nötig, die Oberflächenspannung zu ermitteln. Kontaktwinkel größer als  $90^\circ$  zeigen hydrophobe OF an, Winkel kleiner als  $90^\circ$  hydrophile OF (Abb. 3.12).

### 3.2.5.2 Verfahren der Auswertung

Die Auswertung basiert auf einer digitalen Fotografie des Tropfens auf der Oberfläche in der Ebene der Oberfläche. Die Software Drop Shape Analysis ermittelt zunächst die Konturen des Tropfens und die Kontaktlinie des Tropfens und der Oberfläche. Dies geschieht anhand der Nullstellen der 2. Ableitung des Helligkeitsprofils. Bei dem entsprechenden Pixel liegt ein Wendepunkt im Helligkeitsverlauf vor, der den Übergang vom Tropfen zum umgebenden Medium (Luft) anzeigt. Anschließend wird eine Konturanalyse durchgeführt, bei der verschiedene mathematische Modelle zum Einsatz kommen können. Berechnungsgrundlage ist stets der Schnittpunkt zwischen der Tropfenkontur und Kontaktlinie zwischen Tropfen und OF (dem sog. Dreiphasenkontaktpunkt). Für die hier präsentierten

### 3 | MATERIAL UND METHODEN

Ergebnisse wurden die in Drop Shape Analysis integrierten mathematischen Verfahren Tangent-2 verwendet.

Beim Tangent-2-Verfahren wird auf die Tropfenkontur im Bereich des Phasenkontaktpunktes eine Polynomfunktion folgender Form angewendet:

$$y = a + bx + c\sqrt{x} + \frac{d}{\ln x} + \frac{e}{x^2}$$

Die Parameter werden iterativ angepasst, so dass eine Tangente im Dreiphasenkontaktpunkt resultiert. Aus deren Steigung wird schließlich der Kontaktwinkel  $\theta$  bestimmt.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Kontaktwinkelanalyse-Geräts der Firma Krüss GmbH von Dr. Jens Wallauer (Institut für Physikalische Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Analysiert wurden Chips, die gemäß Protokoll 3.2.1.1 OTS-funktionalisiert worden sind. Die Chips wurden auf der Probenplattform des Geräts mit der Interaktions-OF (dicke Glasschicht) nach oben positioniert. Dann wurden jeweils mindestens drei Tropfen eines Volumens von 4  $\mu$ l Millipore-Wasser auf die Oberfläche gegeben, die Kamera justiert und jeder Tropfen fotografiert. Die Bilder wurden am Computer mittels der Software Drop Shape Analysis der Firma Krüss GmbH ausgewertet. Dazu dienten die in der Software integrierten Methoden Tangent 2-Methode und Sessile Drop-Fitting-Methode der Auswertung. Für jeden Tropfen wurde anhand der Spiegelung des Tropfens an der Chip-OF vom Computer automatisch oder von Dr. Wallauer manuell eine Basislinie bestimmt, anhand derer die Kontaktwinkel gemessen wurden. Für jeden Tropfen wurden jeweils der linke und rechte Kontaktwinkel gemessen.

#### 3.2.6 Proteinsynthese

Die Herstellung des ConA-SAv ist Thema der Dissertation von Nina Dassinger (Institut für pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) und kann in entsprechenden Arbeiten nachgelesen werden.

#### 3.2.7 SDS-Page

Durchgeführt wurde eine SDS-PAGE nach Lämmli mit einem 10%-igen Trenngel und einem 3,5%-igem Sammelgel. Für das Trenngel wurden 30% Acrylamid und 2% Bisacrylamid mit dem Radikalenspender Ammoniumperoxidsulfat versetzt und zwischen zwei Glasplatten in einer Halterung mit dem Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) zur Polymerisation gebracht (1 h). Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet (Polymerisation 30 min) und ein Kamm hinzugefügt, so dass das System zwischen den Glasplatten luftdicht abgeschlossen war. Nach der Auspolymerisierung wurde der Kamm gezogen und der Aufbau in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Pro Proben tasche wurden 15  $\mu$ l der Probe mit einer flexiblen Pipettenspitze aufgetragen

(5 µg Probe pro Lane in 5-fach Probepuffer wurde mit H<sub>2</sub>O auf 15 µl aufgefüllt, so dass der Probepuffer 1:5 verdünnt wurde). Durch schließen des Stromkreises wurde ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die Proben migrieren konnten (25 V, 300 mA). Der Stromkreis wurde zu dem Zeitpunkt wieder unterbrochen, zu dem das im Probepuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte. Das Gel wurde dann aus der Apparatur entnommen, das Sammelgel entfernt und das verbliebene Trenngel in einer Coomassie Brilliant Blau G250-Lösung über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde es dreimal mit 10 %-iger Essigsäure (in Wasser) für je ca. 1 h gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Das Gel wurde zuletzt in Plastik eingepackt und gescannt.

### 3.2.8 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden Elektronen von einer Elektronenquelle (Lanthanhexaborid-Kristall, Feldemissionskathode) erzeugt, durch ein elektrisches Feld beschleunigt und schließlich zeilen- und spaltenweise über die Probe geführt. Der feingebündelte Strahl wird mittels Magnetspulen auf die Probe fokussiert. Dies findet in einem Hochvakuum statt, damit die Elektronen nicht mit Komponenten einer umgebenden Atmosphäre interagieren. Die Probe wird mit einem dünnen Goldfilm bedampft. Dadurch werden der nötige Kontrast und die nötige Tiefenschärfe hergestellt. Treffen die Primärelektronen (die von der Quelle emittierten Elektronen) auf der zu untersuchenden OF auf, werden einige reflektiert und als Rückstreuelektronen detektiert. Andere Primärelektronen führen zur Freisetzung von Sekundärelektronen aus der Probe (Mäntele, 2012). Sekundärelektronen sind von geringer Energie (einige eV) und stammen aus den oberen Schichten der Oberfläche. Sekundärelektronen aus tieferen Schichten besitzen nicht die nötige Energie, um an die OF zu gelangen. Daher bilden sie die Topographie der OF am besten ab. Die Sekundärelektronen werden im Detektor in ein Spannungssignal umgewandelt, dessen Amplitude in Form einer Helligkeitsinformation eines Pixels auf einem Bildschirm dargestellt wird (Zubkov, 2013).

Die für diese Arbeit gemachten REM-Aufnahmen wurden wie folgt durchgeführt. Die Chips wurden auf Objektträgern fixiert und mit Gold besputtert (Gold-SputterCoater). Es wurden drei Coating-Durchgänge mit 10 mA in einem 10<sup>-1</sup> torr Vakuum für je 1 min durchgeführt. Die Messung fand bei 5 kV statt. Die REM-Aufnahmen lieferte freundlicherweise Boris Strehlow (Institut für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie, Philipps-Universität Marburg, AK Bakowsky).

## 4. Ergebnisse

### 4.0 Präparation von OTS-funktionalisierten Glaschips

Ein Teil der vorliegenden Arbeit untersucht Strategien zur Detektion von ganzen Zellen mittels RfS unter Verwendung von gut etablierten und häufig verwendeten 3-Octadecyltrimethoxysilan (OTS)-Oberflächen. Für die Arbeit wurde das in Kapitel 3.2.1.1 aufgeführte Protokoll verwendet. Da das Protokoll zur OTS-Funktionalisierung erstmals auf die Glaschips, welche von Analytik Jena für die RfS-Plattform BIAffinity® angewendet wurde, ist der Funktionalisierungserfolg mittels Kontaktwinkelanalyse kontrolliert worden.

#### 4.0.1 Kontaktwinkelanalyse

Für drei OTS-funktionalisierte Glaschips wurden mit einem Kontaktwinkelanalyse-Gerät der Firma Krüss die Kontaktwinkel zwischen Millipor-Wasser und der Oberfläche am Dreiphasenkontaktpunkt bestimmt. Als Kontrolle dienten zwei Chips: Ein unbehandelter nur mit Methanol für zwei Minuten im Ultraschallbad gereinigter Glaschip (Kontrollchip 1). Er wurde nicht mit 6 M NaOH oder Piranha-Lösung behandelt. Der zweite Kontrollchip wurde mit NaOH- und Piranha-Lösung „aktiviert“ (Kontrollchip 2). Auf jeden Chip wurden mindestens drei Tropfen eines Volumens von jeweils 4 µl mit einer Eppendorf-Pipette gesetzt. Die Tropfen wurden fotografiert und am Computer mit der Software Drop Shape Analysis (V 1.92.1.1) ausgewertet (Abb. 4.1).



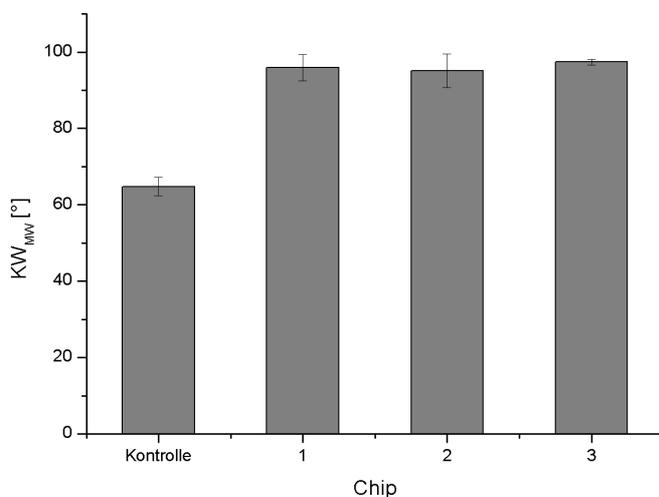
**Abb. 4.1: Tropfengestalt von Millipor-Wasser verschiedenen OF (Beispielbilder):** Links - nicht-„aktivierte“/nicht-silanisierte Glasoberfläche (Kontrollchip 1); Mitte – „aktivierte“/nicht-silanisierte Glasoberfläche (Kontrollchip 2); Rechts – OTS-silanisierte Glasoberfläche . Volumen 4 µl.

Es wurden stets zwei Kontaktwinkel (KW), der in der Aufnahme rechte und der linke, bestimmt und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte aller Tropfen auf einem Chip wurden ebenfalls gemittelt. Zur Auswertung wurde die in der Software implementierte Methode „Tangent 2“ verwendet. Tabelle 4.1 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. Die Tropfen auf der Oberfläche des „aktivierten“ Chips (Kontrollchip 2/K2) waren nicht auswertbar, da sie zu klein ausfielen. Das Wasser verlor die Tropfengestalt sofort bei Kontakt mit der OF. Der Mittelwert der Kontaktwinkel über alle drei OTS-Chips be-

trägt  $96,12^\circ (\pm 3,26^\circ)$  nach der Tangent 2-Methode. Im Vergleich dazu beträgt der mittlere Kontaktwinkel des Kontrollchips (K1)  $64,82^\circ (\pm 2,37^\circ)$ .

**Tab. 4.1: Ergebnisse der Kontaktwinkel-Analyse.** Angegeben sind die Mittelwerte der Kontaktwinkel ( $KW_{MW}$ ) und Standardabweichungen (StDev). K1 - nicht-„aktivierter“/nicht-silanisierter Kontrollchip; K2 - „aktivierter“/nicht-silanisierter Kontrollchip; 1, 2, und 3 - OTS-Chips; N=Anzahl der gemessenen Winkel (jeweils N/2 für linken und rechten Kontaktwinkel); na – nicht auswertbar. Methode zur Auswertung: Tangent-2-Fitting.

Chip	N	$KW_{MW}$ [°]	StDev
K1	6	68,58	4,04
K2	-	na	-
1	10	96,85	3,4
2	8	95,54	2,69
3	8	97,93	1,13
1+2+3	26	96,12	3,26



**Abb. 4.2: Ergebnisse der Kontaktwinkelanalyse nach der Tangent 2-Methode.** In Klammern steht die Anzahl der Daten aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Jeweils die Hälfte entspricht dem linken bzw. dem rechten Kontaktwinkel.

Ein Shapiro-Wilk-Test ergab, dass die Ergebnisse normalverteilt sind. Ein Levene’s Test im Rahmen einer ANOVA zeigt, dass die Varianzen aller Stichproben homogen sind ( $\alpha=0,05$ ). Die Overall-ANOVA gibt an, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben gibt ( $\alpha=0,05$ ). Ein Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte ergibt, dass der Mittelwert der Kontrolle (Glas unbehandelt) signifikant von den Mittelwerten, die für die Chips 1, 2 und 3 ermittelt worden sind, abweicht. Die Mittelwerte der Chips 1, 2 und drei unterscheiden sich dagegen nicht signifikant ( $\alpha=0,05$ ).

Der Befund der Kontaktwinkelanalyse zeigt einerseits, dass die OF-Modifikationen der Chip-Oberfläche hydrophobe Eigenschaften verleiht und andererseits, dass die Anwendung des Protokolls zur Modifikation Oberflächen erzeugt, die bezüglich des Kontaktwinkels gut reproduzierbar sind. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Oberfläche der Chips stets von gleicher Qualität ist.

**Anmerkung:** diese Untersuchung fand auf Chips statt, welche in wasserfreiem Toluol OTS-funktionalisiert worden sind. Mit Chips, die in wasserfreiem Toluol silanisiert worden sind, wurde erst ab dem Kapitel 4.1.2 gearbeitet.

### 4.1 *Legionella pneumophila*-Assay (RfS)

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dargestellt, die im Bemühen um einen *Legionella pneumophila*-Assay entstanden sind. Eine einfache Methode ist die hydrophobe Immobilisierung von polyklonalen Fängerantikörpern (fAK) auf OTS-Chips mit anschließender Legionellen-Injektion und einer weiteren Applikation eines monoklonalen Detektionsantikörpers (dAK) (Sandwich-Assay-Format). Den Ergebnissen von Barlen et al. zufolge ist die Strategie besonders effektiv (Barlen et al., 2009). Daher konzentrieren sich die Untersuchungen besonders auf Experimente mit OTS-funktionalisierten Chips. Sie gehen aber über die einfache hydrophobe Immobilisierung von fAK hinaus. Es werden andere OTS-OF-basierte Methoden getestet, um eventuell bessere Detektionsmethoden zu entwickeln. Eine einfache Methode besteht in der direkten Immobilisierung von Bakterienzellen auf einer hydrophoben OF mit anschließendem Nachweis durch spezifische Antikörper (Direct-Assay-Format=DAF). Antikörper wurden, wie bereits erwähnt, direkt über hydrophobe Wechselwirkungen an einer Oberfläche adsorbiert oder wurden über ein durch hydrophobe Wechselwirkung immobilisiertes Linkerprotein gebunden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Protokolle präsentiert, welche das Arbeiten mit Antikörpern auf OTS/Protein A- oder OTS/ConA-SAV-Oberflächen ermöglichen. Als kritischer Punkt wird sich zeigen, dass es schwierig ist, ein passendes Antikörper-Antigen-Paar für solche Experimente zu finden. Daher wurde auch getestet, ob mit dem Gebrauch eines Lektins spezifisch für Zucker in den *Legionella*-Lipopolysacchariden Vorteile gegenüber Antikörpern auftreten.

**Anmerkung:** Wegen der besseren Lesbarkeit wird an manchen Stellen statt von optischen Schichtdicken am Ende einer Dissoziationsphase einfach von Sensorsignal, Nettosignal oder OSD gesprochen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle RfS-Experimente mit dem BIAffinity® der Nullserie Generation 2 durchgeführt. Die Flussrate betrug 5 µl/min. Die Temperierung war auf 21°C eingestellt. Als Laufpuffer wurde, wenn nicht anders angegeben, PBS pH 7,3 verwendet.

**4.1.1 Antikörper-Immobilisierung auf OTS-Oberfläche (Sandwich-Assay-Format)**

**4.1.1.1 Antikörpertests**

Im Vorfeld der Untersuchungen wurden verschiedene Antikörper getestet, welche keine Bindung mit den verwendeten Legionellen-Zellen eingingen. Die folgenden Ausführungen betreffen die Experimente mit dem Antikörper, der am vielversprechendsten war.

**4.1.1.2 Antikörper-Bindungstest in Mikrotiterplatten**

Im Vorfeld der ersten Versuche wurde ein Antikörper gewählt und zunächst einem Bindungstest unterzogen. Dazu wurde ein ELISA-artiges Experiment unternommen, bei dem zunächst die Leg1G-Zellen (*L. pneumophila*-Zellen bezogen durch das Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Universitätsklinikums Gießen Marburg) in Mikrotiterplatten-Wells immobilisiert wurden. Danach wurden mit BSA freie unspezifische Bindestellen blockiert und als nächstes der zu testende Antikörper AK237744 und ein Antikörper-HRP-Konjugat hinzugefügt. Der Antikörper des Konjugats war ein sekundärer anti-Kaninchen-Antikörper. AK237744 ist ein sekundärer Antikörper, der in Kaninchen als Wirt hergestellt worden ist. Bei Anwesenheit aller Komponenten sollte es unter Addition von 3,3',5,5-Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer Farbreaktion kommen. Zur Kontrolle wurde das Experiment ohne die Zellen in mit BSA blockierten Wells wiederholt, um die unspezifische Bindung von AK237744 an BSA zu testen. Außerdem wurde ein Kontrollexperiment ohne AK237744 durchgeführt, um auszuschließen, dass das Antikörper-HRP-Konjugat an etwas anderes als AK237744 bindet.

**Tab. 4.2: Antikörperbindungstest:** a – alle Komponenten vorhanden außer Leg1G-Zellen; b – alle Komponenten vorhanden; c – alle Komponenten vorhanden außer AK237744; d – alle Komponenten vorhanden außer Antikörper-HRP-Konjugat; N – Anzahl der Messungen/verwendete Mikrotiterplatten-Wells; OD<sub>MW</sub> – mittlere optische Dichte; StDev – Standardabweichung; SPW – Spannweite (Maximalwert-Minimalwert); Dk – Teststatistik von Kolmogorow-Smirnow-Test mit einem Signifikanzniveau von α=0,05.

	-Leg1G(Kontrolle) <sup>a</sup>	Exp <sup>b</sup>	-AK1(Kontrolle) <sup>c</sup>	-AK2(Kontrolle) <sup>d</sup>
<b>N</b>	9	9	9	9
<b>OD<sub>MW</sub></b>	1,1	1,42	0,54	0,01
<b>StDev</b>	0,33	0,36	0,18	7,26*10 <sup>-4</sup>
<b>SPW</b>	1,005	1,043	0,518	0,002
<b>Dk(α=0,05)</b>	0,21	0,22	0,17	0,4

Schließlich wurde ein Kontrollexperiment unternommen, in dem das Konjugat weggelassen wurde, um sicher zu gehen, dass die Farbreaktion tatsächlich durch die HRP ausgelöst wurde. Das Ausmaß der Farbreaktion wurde mittels eines UV-Photometers bei den Wellenlängen λ=450 nm und λ=620 nm gemessen und die Werte beider Messungen voneinander subtrahiert. Die Ergebnisse, samt einiger statistischer Parameter, sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Laut einem Kolmogorov-Smirnov-Test sind die Messwerte normalverteilt. Um zu ermitteln, ob die entsprechenden Mittelwerte sich

signifikant unterscheiden wurde jeweils ein Lord-Test durchgeführt. Ein F-Test zum Vergleich der Varianz von -AK2(Kontrolle) vs. Exp ergab, dass sich die Varianzen signifikant unterscheiden ( $\alpha=0,05$ ). Daher wurde zum Vergleich der entsprechenden Mittelwerte ein Weir-Test verwendet. Die Ergebnisse von Lord- und Weir-Test sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

**Tab. 4.3: Resultate der Lord und Weir-Tests.** N – Anzahl der Experimente; u – Teststatistik Lord Test:  $H_0$  wird verworfen, wenn  $u \geq 0,28$  (Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ ); t – Teststatistik Weir-Test:  $H_0$  wird verworfen, wenn  $t \geq n$ .  $H_0$ =Mittelwerte sind gleich groß.

	Exp vs. -Leg1G(Kontrolle)	Exp vs. -AK1(Kontrolle)	Exp vs. -AK2(Kontrolle)
<b>N</b>	9	9	9
<b>u</b>	0,31	3,33	-
<b>t</b>	-	-	23,43

Die Vergleiche zeigen, dass das Resultat von Exp sich signifikant von den Kontrollen unterscheidet. Es darf also davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Antikörper spezifisch an die verwendeten Zellen binden.

#### 4.1.1.3 Blockieren unspezifischer Bindestellen

##### 4.1.1.3.1 Test von Blockierungsreagenzien

Zu Beginn der Arbeiten mit dem RfS-Biosensor wurde getestet, welche Art der Blockierung unspezifischer Bindestellen auf den OTS-Chips am besten funktioniert. Getestet wurden die Blockierer Tween 20, The Blocking Solution der Candor Bioscience GmbH und BSA. Für diese Experimente wurde die Möglichkeit genutzt, den Chip im BIAffinity um  $90^\circ$  zu drehen, damit jedes Experiment mit einem Blockierungsreagenz zusammen mit einem entsprechenden Kontrollexperiment in einem einzigen Sensorgramm dargestellt werden kann (Messstrategie 1, Kapitel 3.2.4.5). Die Experimente sind prinzipielle aufgebaut, wie in Abb. 4.1 dargestellt.

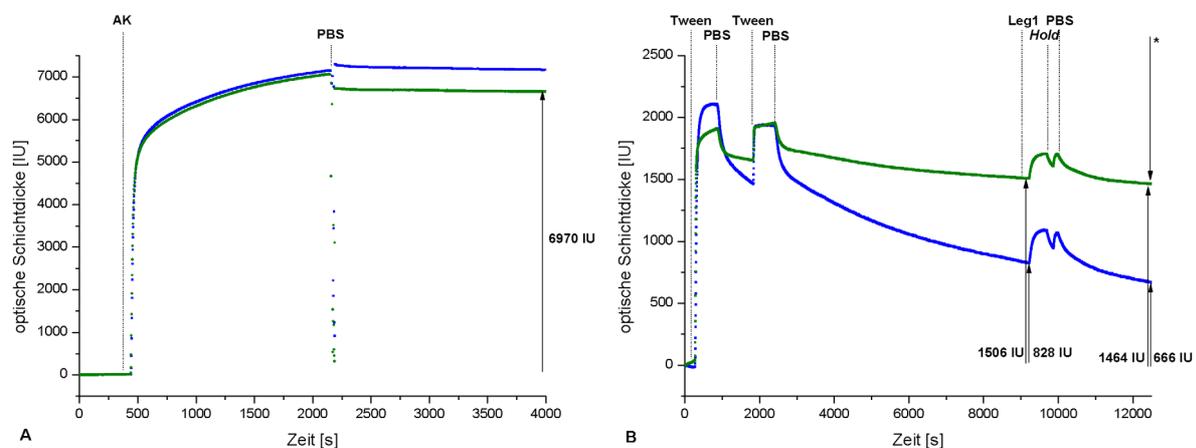


**Abb. 4.3: Schema Blockierertests.**

Verwendete Blockierer: Tween20, The Blocking Solution, BSA. Gestrichelter Balken - Applikation vor Drehen des Chips; orangefarbener Balken – Applikation nach Drehen des Chips; fAK - Fängerantikörper.

Tween 20

Der Chip wurde in das Gerät eingelegt und auf beiden Flusskanälen äquilibriert. Nach dem Abbruch der Äquilibrierung wurden 400 s Basislinie aufgenommen, bevor ein Antikörper (150 µl, 500 µg/ml) (AK237744) injiziert wurde. Nach einer etwa 1900 s dauernden Dissoziationsphase wurde die Messung abgebrochen, der Chip entnommen und anschließend in der Kontrollausrichtung um 90° gedreht wieder eingelegt. Es wurde erneut eine Basislinie aufgenommen (240 s) und dann zwei Tween 20-Injektionen vorgenommen (0,05 %, 50 µl). Nach 6800 s Dissoziation wurden Leg1G-Zellen (50 µl, 4\*10<sup>8</sup> Zellen/ml) appliziert. Die Sensorgramme in den Abbildungen 4.4 A und B zeigen die Resultate dieses Experiments.



**Abb. 4.4 Blockierungstest mit Tween 20.** A – fAK-Immobilisierung: AK - Antikörper; B – Tween-Effekt und Kontroll-Experiment: Tween 20 (0,05 %, 50 µl); Dissoziation 1000 s; Tween 20 (0,05 %, 50 µl); Dissoziation 6900 s; Leg1 - Leg1G-Zellen; nach 500 s „Hold“-Schritt für 180 s (→ die Injektion samt Strom über die OF wurde unterbrochen); Dissoziation 2570 s. \* Ende der Dissoziationsphase.

Die Antikörper-Immobilisierung ergab nach 1900 s Dissoziation eine OSD von etwa 6970 IU auf beiden Messspots (Messspot 1 – blau; Messspot 2 – grün). Nach dem Drehen des Chips um 90° liegt der Messspot 1 über einem OTS-OF-Abschnitt, der vor dem Drehen mit Antikörper belegt worden ist. Messspot 2 dagegen liegt nun über einem unbelegten OTS-OF-Abschnitt. Bei den in B dargestellten Sensorgrammen ist nun nachvollziehbar, wie sich Tween 20 (zwei Injektionen) auf einer bereits mit Antikörper belegten OTS-OF (blau) und auf einer unbelegten OTS-OF (grün) verhält. An beiden Messspots wird zunächst ein Signal aufgezeichnet, welches sich auf 2100 IU (Messspot 1 – blau) bzw. 1800 IU (Messspot 2 – grün) beläuft. In der Folge dissoziiert Tween 20 von der OF sehr langsam. Nach 6900 s konstanten Pufferstroms, war die Dissoziation offensichtlich noch nicht abgeschlossen. Auf der AK-belegten OF fiel das Signal währenddessen um 1270 IU auf 830 IU. Auf der unbelegten OF kommt es zu einem Signalrückgang um 300 IU auf 1500 IU. Die Injektion von Leg1G-Zellen führte auf beiden OF-Abschnitten für die Dauer der Injektion zu einem Signalanstieg von 200-250 IU. Der Ein-

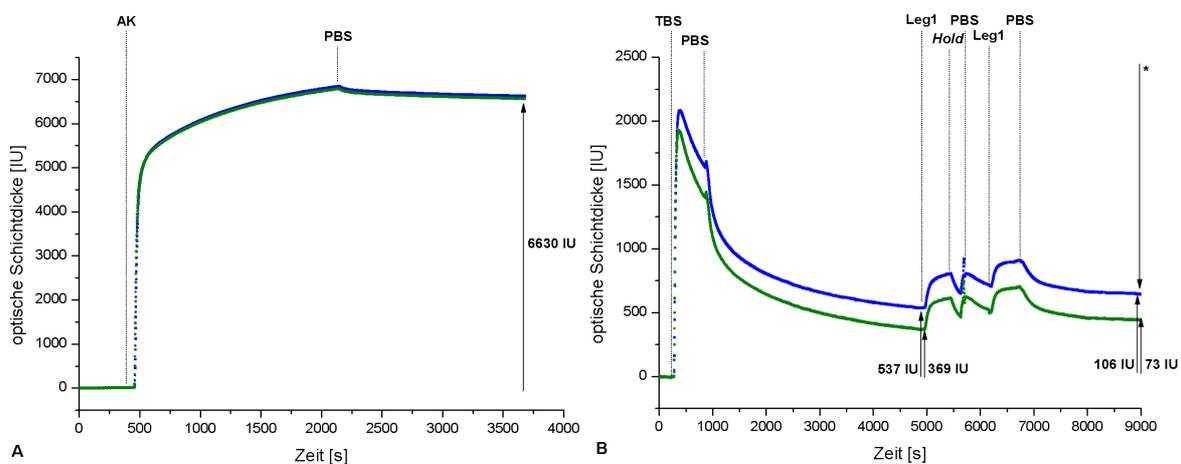
## 4 | ERGEBNISSE

satz des Pufferstrom führte allerdings zu einem schnellen Rückgang des Signals, so dass der Kurvenverlauf von vor der Leg1-Zellen-Injektion fortgesetzt wurde.

### „The Blocking Solution“ (Candor Bioscience GmbH)

Mit dem Blockierer „The Blocking Solution“ wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt. Der Chip wurde in Immobilisierungs-Orientierung in das Gerät eingelegt und ein Flusskanal mit Antikörpern belegt (150  $\mu$ l, 500  $\mu$ g/m). Die blaue Kurve in Abb. 4.5 A zeigt das Signalverhalten im Flusskanal unter Messspot 1 und die grüne Kurve unter Messspot 2. Nach einer Dissoziationsphase von 1580 s wurde die Messung abgebrochen und der Chip um 90° gedreht wieder in das Gerät eingelegt. Die blaue Kurve in Abb. 4.5 B zeigt das Signalverhalten auf einem zuvor mit Antikörpern belegtem OF-Abschnitt während die grüne Kurve das Signalverhalten auf dem unbelegten OF-Abschnitt abbildet. Zunächst wurde „The Blocking Solution“ (50  $\mu$ l, unverdünnt) appliziert und nach einer 4100 s dauernden Dissoziationsphase Leg1G-Zellen (50  $\mu$ l,  $4 \cdot 10^8$  Zellen/ml). Eine weitere solche Leg1G-Zellen-Injektion folgte nach einer Dissoziationsphase von 480 s.

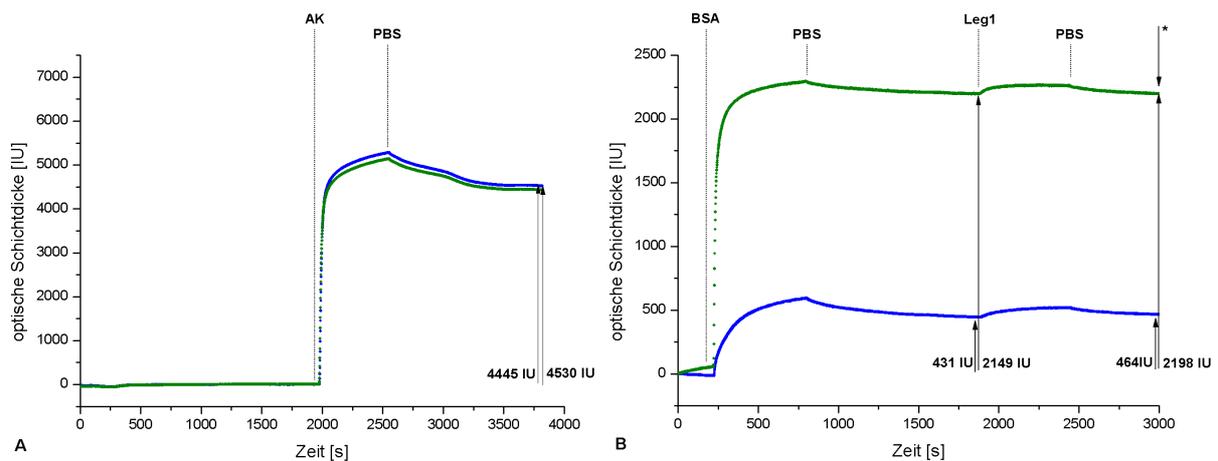
Die Antikörper-Immobilisierung ergab ein Signal von etwa 6630 IU über beiden Messspots. Nach dem Drehen und Applizieren von „The Blocking Solution“ stieg das Signal auf etwa 2000 IU an. In der folgenden Dissoziationsphase fiel das Signal auf 537 IU (Messspot1 – blau) bzw. 369 IU (Messspot 2 – grün). Die anschließenden zwei Injektionen von Leg1G-Zellen führten am Ende der Dissoziationsphasen (zum Zeitpunkt 9000 s) zu einer OSD von 643 IU (Messspot 1 – blau) bzw. 73 IU (Messspot 2 – grün). Das entspricht einem Nettosignalzuwachs von 106 IU (Messspot 1 – blau) bzw. 73 IU (Messspot 2 – grün).



**Abb. 4.5 Blockierungstest mit „The Blocking Solution“.** A – Antikörper-Immobilisierung: AK - Antikörper; Abbruch. B – „The Blocking Solution“-Effekt und Kontroll-Experiment: TBS - „The Blocking Solution“, Dissoziation 4100 s; Leg1 - Leg1G-Zellen nach 500 s „Hold“-Schritt für 180 s ( $\rightarrow$  die Injektion samt Strom über die OF wurde unterbrochen); \* Ende der Dissoziationsphase.

Bovines Serum Albumin (BSA)

Ein ähnliches Experiment wurde mit BSA unternommen. Ein Antikörper wurde immobilisiert (50 µl, 500 µg/ml), die Messung abgebrochen, der Chip dem Gerät entnommen und um 90° gedreht wieder in das Gerät eingelegt. Dann erfolgte die Applikation von BSA (50 µl, 2000 µg/ml). Zuletzt wurden nach einer Dissoziationsphase von 1080 s Leg1G-Zellen injiziert.



**Abb. 4.6 Blockierungstest mit BSA.** **A** – Antikörper-Immobilisierung: AK – Antikörper; Abbruch. **B** – BSA-Effekt und Kontroll-Experiment: BSA - BSA (50 µl, 2000 µg/ml); Leg1 - Leg1G-Zellen (50 µl, 4\*10<sup>8</sup> Zellen/ml); \* Ende der Dissoziationsphase.

Wie Abb. 4.6 A zeigt ergab die Antikörper-Immobilisierung am Ende der Dissoziationsphase ein Signal von 4445 IU über Messspot 1 (blau) bzw. von 4530 IU über Messspot 2 (grün). Die BSA-Injektion nach dem Drehen führte unter Messspot 1 am Ende der Dissoziationsphase nach der Injektion (1080 s) zu einem Signalanstieg 431 IU (Messspot 1 – blau) bzw. 2149 IU (Messspot 2 – grün). Die Applikation von Leg1G-Zellen führte nach der Dissoziationsphase von 600 s zu keinem Nettosignalanstieg unter Messspot 1 und zu einem Anstieg von 49 IU unter Messspot 2.

**Zwischenergebnis 1**

BSA scheint sich auf den verwendeten Oberflächen am besten als Blockierungsreagenz zu eignen, da es effektiv unspezifische Bindestellen blockiert und die anschließenden Dissoziationsphasen schnell beendet sind. Im Folgenden wird daher mit BSA als Blockierungsreagenz gearbeitet.

## 4 | ERGEBNISSE

### 4.1.1.3.2 BSA-Blockierung gegenüber Antikörpern

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse präsentiert, welche die Frage nach der adäquaten Blockierung von unspezifischen Bindestellen klären sollten. Auf in PBS-Puffer äquilibrierten OTS-Chip wurden folgende Messungen durchgeführt (Abb. 4.7):

Nach 300 s Basislinien-Aufnahme wurde BSA (80  $\mu$ l) unterschiedlicher Konzentration immobilisiert. Nach einer Dissoziationsphase von 600 s erfolgte die Injektion eines Antikörpers (80  $\mu$ l, 500  $\mu$ g/ml). Abb. 4.8 zeigt die Bindungskurven der entsprechenden Experimente. Die Sensorgramme zeigen ein konzentrationsabhängiges BSA-Signal.

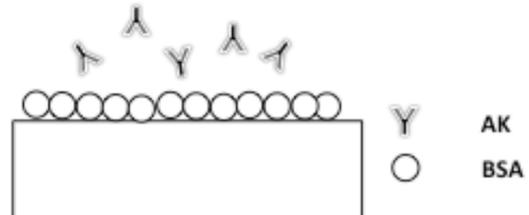


Abb. 4.7: BSA-Blockierung gegenüber AK

Außerdem zeigt jedes Sensorgramm eine Bindung des Antikörpers. Abbildung 4.9 zeigt eine Gegenüberstellung der gemessenen BSA-Signale am Ende einer 600 s-Dissoziationsphase und der entsprechenden Antikörper-Signale in Abhängigkeit der BSA-Konzentration. Wie sich zeigte, sind die Antikörper-Signale zwischen BSA-Konzentrationen von 500-2000  $\mu$ g/ml sehr ähnlich (rote Kreise). Der OSD-Mittelwert bei BSA-Konzentrationen  $\geq$ 500  $\mu$ g/ml beträgt 295,7 IU (StDev 46,9 IU).

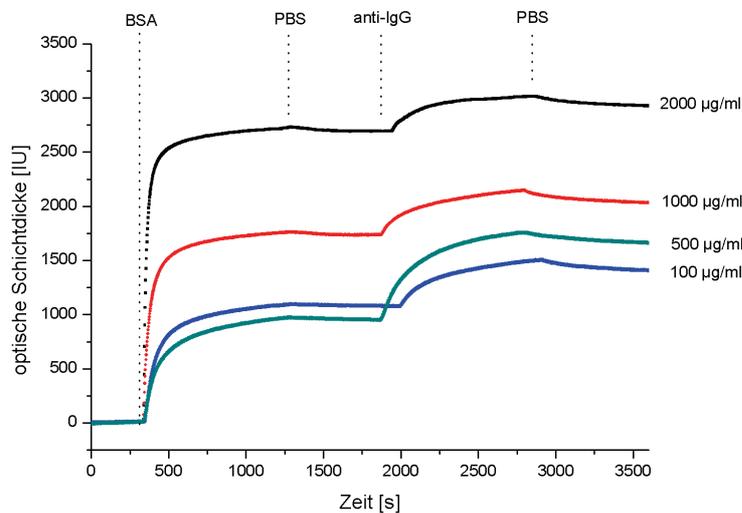
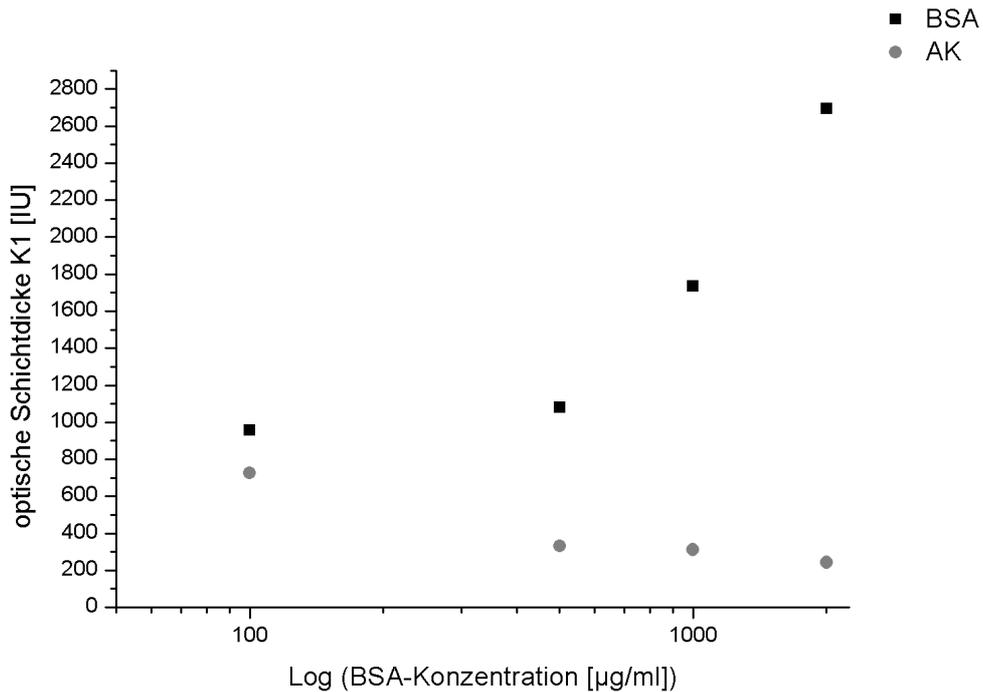


Abb. 4.8: Blockierungsexperimente auf OTS-OF mit BSA und anti-IgG b-Antikörpern. BSA – Blockierer, unterschiedliche Konzentration (angegeben am rechten Rand); anti-IgG – Antikörper anti-IgG b; Werte von Messspot 1.

Bei 100  $\mu$ g/ml BSA ist das Signal mit 727 IU weit höher als dieser Mittelwert. Im Folgenden wird daher davon ausgegangen, dass die Oberfläche durch Applikation von 80  $\mu$ l BSA der Konzentration 500  $\mu$ g/ml vollständig blockiert werden kann.

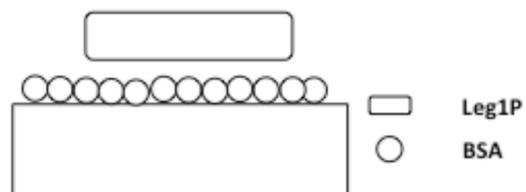


**Abb. 4.9:** Vergleich der BSA-Signale und der anti-IgG b-Signalen in Abhängigkeit der BSA-Konzentration am Ende einer 600s-Dissoziationsphase (in halblogarithmischer Auftragung). AK - anti-IgG b-Antikörper.

#### 4.1.1.3.3 Blockierung gegenüber ganzen *L. pneumophila*-Zellen

Außerdem muss im Hinblick auf Experimente im Direct-Assay-Format die adäquate BSA-Konzentration festgestellt werden, um die OTS-Oberfläche gegenüber ganzen Legionella-Zellen zu blockieren. Zu diesem Zweck wurden folgende Experimente durchgeführt: Nach 300 s Basislinienstabilisierung wurden 80 µl BSA unterschiedlicher Konzentration injiziert. Nach 600 s Dissoziationsphase wurden jeweils Proben von Leg1G-Zellen (150 µl,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) appliziert (Abb. 4.9). Die entsprechenden Bindungskurven sind in Abb. 4.10 dargestellt.

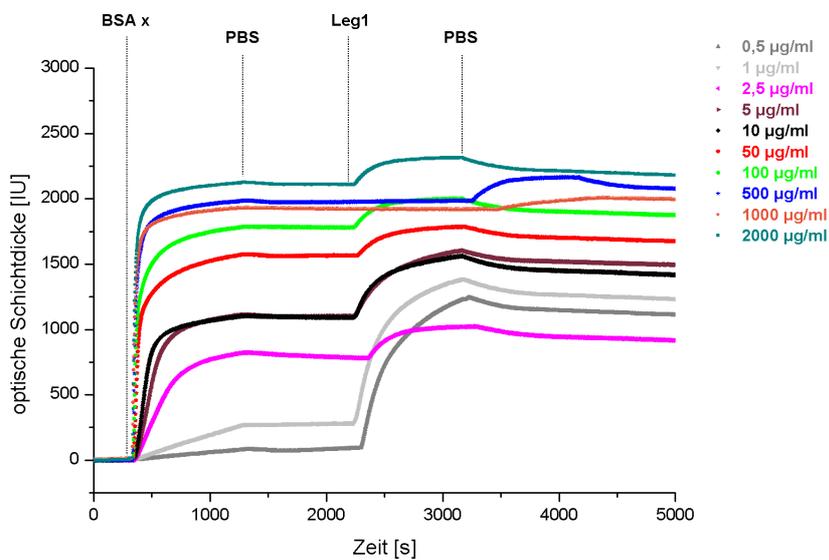
In Abb. 4.11 A sind die BSA-Bindekurven nochmals im Detail dargestellt und in Abb. 4.11 B die entsprechenden Leg1-Bindungskurven im Detail. Abbildung 4.11 D zeigt eine halblogarithmische Auftragung der BSA-Konzentration gegenüber den BSA-Signalen bzw. der Leg1G-Zellen-Signale am



**Abb. 4.9:** BSA-Blockierung gegenüber Legionellen-Zellen (Leg1P).

## 4 | ERGEBNISSE

Ende von jeweils einer 600 s-Dissoziationsphase. Wie aus A hervorgeht, ergeben BSA-Applikationen ab 1 µg/ml deutlich von der Basislinie zu unterscheidende Bindungskurven. Bei BSA-Konzentrationen  $\geq 500$  µg/ml liegt das Signal bei etwa 2000 IU. B zeigt die auf Leg1-Zellen referierenden Bindekurven. In C wurden die in B farblich dargestellten Bindungskurven in einer vergrößerten Darstellung abgebildet, um einen besseren Überblick zu gewähren. Für die BSA-Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml sind deutliche Leg1-Zellen-Bindungskurven zu erkennen. Die Leg1G-Zellen-Bindungskurven für BSA-Konzentrationen größer als 10 µg/ml und die BSA-Konzentration von 2,5 µg/ml ergeben am Ende der Dissoziationsphase von 1800 s Signale unterhalb von 200 IU.



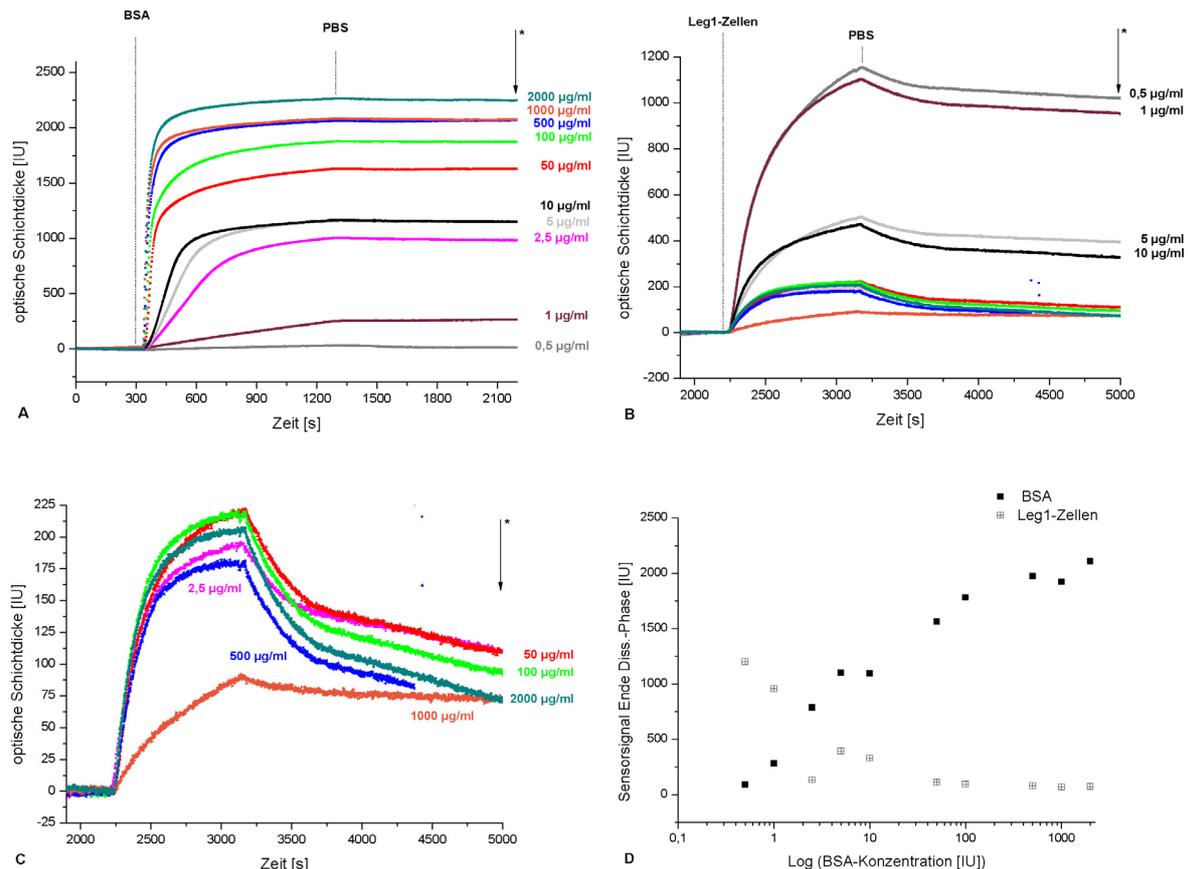
**Abb. 4.10: Bindungskurven von Experimenten zur Blockierung der OTS-OF gegenüber ganzen Leg1-Zellen.** BSA – Blockierer, unterschiedliche Konzentration (angegeben in Legende am rechten Rand); Leg1 – Leg1G-Zellen.

Aus D ist zu entnehmen, dass die Signale nach Leg1G-Zellen-Applikation für BSA-Konzentrationen  $< 50$  µg/ml anfangen zu steigen. Die Sensorsignale am Ende der Leg1G-Dissoziationsphase liegen bei BSA-Konzentrationen zwischen 50 µg/ml und 2000 µg/ml zwischen 71 IU und 111 IU. Der Mittelwert der Signale in diesem Bereich beträgt 85,6 IU (StDev=16,73 IU).

**Tab. 4.4: Deskriptive, statistische Parameter bezüglich der Blockierungsexperimente gegenüber ganzen *L. pneumophila*-Zellen.** \* Stichprobe von Leg1G-Zellen-Experimenten ohne den potentiellen Ausreißer; \*\* Stichprobe von Leg1G-Zellen-Experimenten mit dem potentiellen Ausreißer; N – Anzahl der Messungen; OSD<sub>MW</sub> – Mittelwert der optischen Schichtdicke; StDev – Standardabweichung; SPW – Spannweite; Dk – Test-Statistik Kolmogorov-Smirnov-Test ( $\alpha=0,05$ ); G – Test-Statistik Grubbs Test ( $\alpha=0,05$ ).

	Leg1G-Zellen-Signal*	Leg1G-Zellen-Signal**
<b>N</b>	5	6
<b>OSD<sub>MW</sub> [IU]</b>	85,6	126,33
<b>StDev [IU]</b>	16,73	100,89
<b>SPW [IU]</b>	40	259
<b>Dk</b>	0,20834	0,39373
<b>G</b>	14,61	

Außerdem geht aus diesem Experiment hervor, dass Leg1G-Zellen auf BSA-belegten OF ein unspezifisches mittleres Signal von im Mittel etwa 85 IU (StDev=16,73 IU) erzeugen, wenn man die fünf Messungen bei 50, 100, 500, 1000 und 2000 µg/ml (N=5) zu Grunde legt. Signale nach Applikation von Leg1G-Zellen auf BSA gesättigte OTS-OF, die im Bereich bis 136 IU (85,6 IU + 3\*16,73 IU aufgerundet) liegen, sollten als unspezifische Signale angesehen werden.



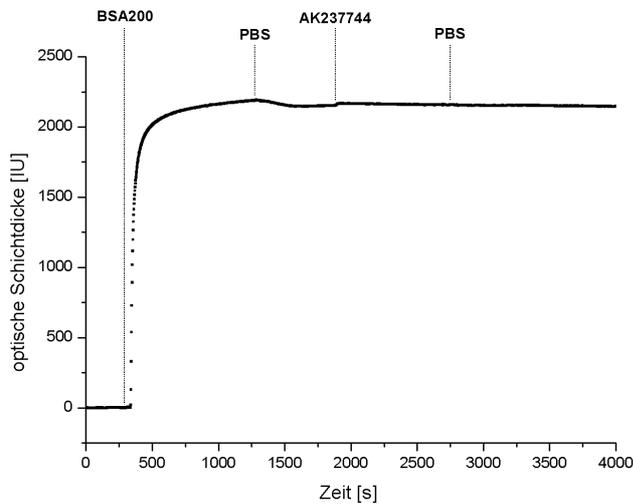
**Abb. 4.11: Detail Darstellungen der Blockierungstests bezüglich der Blockierung mit BSA gegenüber Leg1G-Zellen (Detail aus Abb. 4.10).** A – Detail der BSA-Bindungskurven (Gesamtheit der aufgenommenen Bindungskurven). B – Detail der Leg1-Zellen-Bindungskurven (Signal zum Zeitpunkt der Injektion auf „null“ gesetzt). C – Vergrößerung der in B farbig dargestellten Leg1G-Zellen-Bindungskurven. D – Halblogarithmische Auftragung der BSA- bzw. Leg1G-Zellen-Signale am Ende einer 600 s-Dissoziationsphase (BSA) bzw. 1800 s-Dissoziationsphase (Leg1G-Zellen) gegen die logarithmierte BSA-Konzentration. \*Ende der Dissoziationsphase. Notiz: Leg1G-Zellen-Diss.-Phase bei BSA 500 µg/ml nur 1252 s (wegen eines Artefakts gekürzt).

#### 4.1.1.3.4 AK237744-Wechselwirkung mit BSA

Da mit AK237744 weiter gearbeitet werden sollte, musste nun noch ermittelt werden, ob der Antikörper eine Affinität zu BSA hat, welches als Blockierungsreagenz zum Ausschluss von unspezifischen Bindestellen verwendet werden sollte. Ein Experiment wurde durchgeführt, in dem zuerst 80 µl BSA einer Konzentration von 2000 µg/ml immobilisiert wurden und anschließend 80 µl AK237744 einer Konzentration von 200 µg/ml. Abbildung 4.12 zeigt das entsprechende Sensorgramm, aus dem her-

## 4 | ERGEBNISSE

vorgeht, dass der Antikörper AK237744 minimal an BSA-gesättigte OF bindet, jedoch durch den Pufferstrom wieder weitgehend entfernt wird.



**Abb. 4.12: AK237744-Verhalten auf BSA gesättigter OTS-OF.** Basislinie 300 s; BSA – (80 µl; 2000 µg/ml); Dissoziation 600 s; AK237744 – fAK (80 µl; 200 µg/ml); Flussrate 5 µl/min; Puffer PBS pH 7,3.

### Zwischenergebnis 2

Die Blockierungsexperimente präsentiert in den Kapiteln 4.1.1.3.1, 4.1.1.3.2, 4.1.1.3.3 und 4.1.1.3.4 ergaben, dass BSA ein adäquates Blockierungreagenz ist und bei Konzentrationen von 500 µg/ml die OTS-OF gegenüber IgG-Antikörper blockiert und ab einer Konzentration von 50 µg/ml gegenüber Ganzzell suspensionen von Leg1G-Zellen. Die mittlere unspezifische Bindung von Leg1G-Zellen auf BSA-passivierten OTS-OF nach 1800 s beträgt 168,71 IU (StDev=134,12 IU). Außerdem zeigt das Experiment präsentiert in Kapitel 4.1.1.3.4, dass der für die folgenden Experimente gewählte Antikörper AK237744 nicht mit BSA (jedenfalls mit auf OTS-OF immobilisiertem BSA) interagiert.

### 4.1.1.4 Experimente mit Fängerantikörper AK237744

Mit den Ergebnissen, welche in Kapitel 4.1.1.3.1, 4.1.1.3.2 und 4.1.1.3.4 präsentiert worden sind, wurden Experimente durchgeführt, welche den „Proof of Principle“ zur Legionellen-Detektion im „Sandwich-Assay-Format“ liefern sollten.

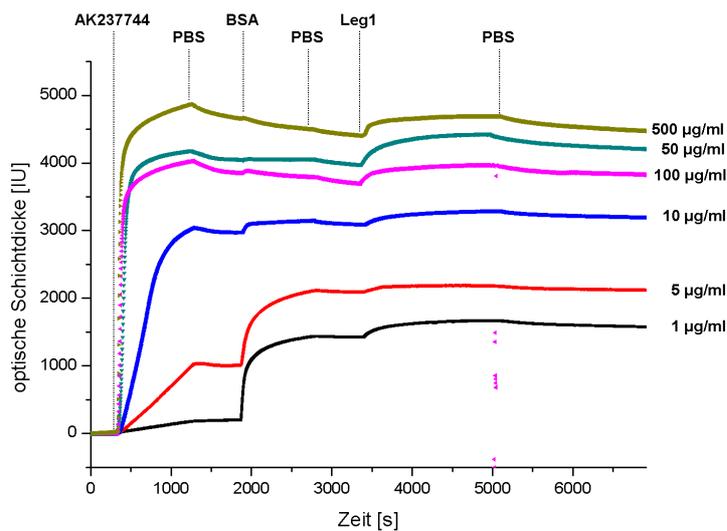
Zunächst wurde nur das „Capturing“ mit polyklonalen Antikörpern als fAK getestet. Dazu wurden

AKs des Typs AK237744 auf der OTS-OF immobilisiert. Da die adäquate Konzentration von für ein erfolgreiches Capturing erst bestimmt werden musste, wurden die AKs in unterschiedlichen Experi-



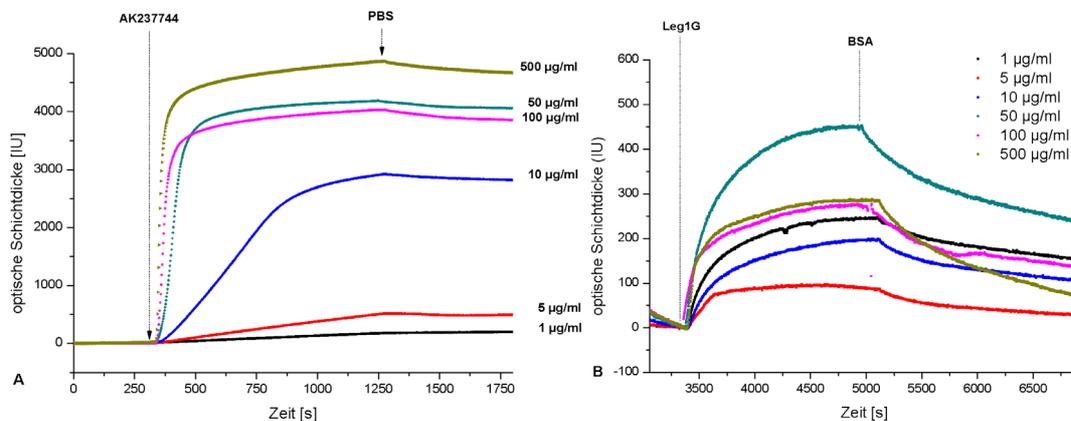
**Abb. 4.13: Schema des Experiments im Sandwich-Assay Format .**

menten in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (80 µl). Anschließend wurden mit BSA (80 µl, 50 µg/ml → s. 4.1.1.3.2) unspezifische Bindungsstellen auf der OTS-OF blockiert und letztlich Leg1G-Zellen (150 µl,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) appliziert. Abbildung 4.13 zeigt das Schema und Abb. 4.14 die Bindungskurven des gesamten Experiments. Die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper betragen zwischen 1 µg/ml und 500 µg/ml. Die BSA-Signale unterhalb von 10 µg/ml AK237744 fallen noch hoch aus, ab 10 µg/ml betragen sie nur noch wenige IU. In Abb. 4.15 A und B sind Details der Experimente dargestellt. Abb. 4.15 A zeigt die Bindungskurven von AK237744 auf der OTS-OF.



**Abb. 4.14:** Bindungskurven zum „Proof of Principle“-Experimenten zur Bestimmung der fAK-Konzentration. AK237744 – fAK; BSA – Blockierer; Leg1 – Leg1G-Zellen; fAK Konzentrationen am rechten Rand angegeben. Artefakt in Bindungskurve bzgl. 100 µg/ml korrigiert (s. Anhang)

In Abb. 4.15 B sind die Bindungskurven, die nach Leg1G-Zellen-Applikation gemessen wurden, im Detail abgebildet, wobei die Signale zum Zeitpunkt der Injektion der besseren Übersicht wegen „auf null“ gesetzt worden sind. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Leg1G-Zellen-Signale am Ende der Dissoziationszeit von 1800 s nicht größer als 200 IU ausfallen. Lediglich das Signal bei einer AK237744-Konzentration von 50 µg/ml fällt mit etwa 250 IU größer aus.



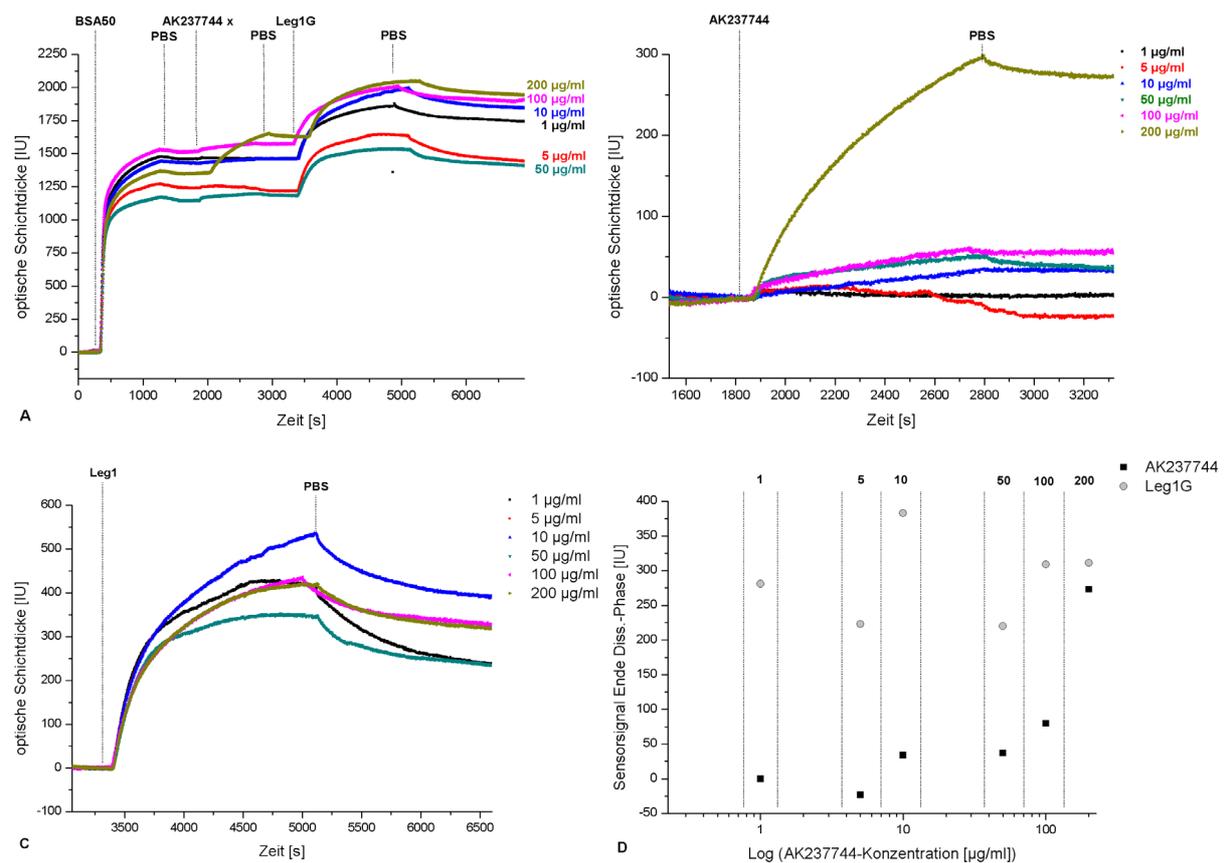
**Abb. 4.15:** Details der Bindungskurven zu den „Proof of Principle“-Experimenten zur Bestimmung der fAK-Konzentration. A – Detail AK237744-Bindung; B – Detail Leg1G-Zellen-Bindungskurven (Signal zum Zeitpunkt der Leg1G-Zellen-Injektion auf „null“ gesetzt).

## 4 | ERGEBNISSE

Im Vergleich zu den unspezifischen Signalen, welche in Kapitel 4.1.1.3.3 für unspezifische Signale von Leg1G-Zellen auf BSA-blockierten OF ermittelt worden sind, konnte hier im besten Fall eine spezifische Bindung von etwa 114 IU (=250 IU-136 IU) von Leg1G-Zellen an AK237744 festgestellt werden. Aufgrund der sehr geringen spezifischen Bindung wurde auf die Applikation eines Detektionsantikörpers verzichtet.

### 4.1.1.5 Experimente mit dem Fängerantikörper AK237744 mit vorhergehender BSA-Applikation

Die in diesem Kapitel präsentierten Experimente folgen dem Schema in Abb. 4.13 des vorhergehenden Kapitels, mit dem Unterschied, dass zunächst BSA so immobilisiert worden ist, dass keine BSA-Sättigung erreicht wird und danach erst der fAK. Der Idee zufolge wurde angenommen, dass zwischen den BSA-Molekülen noch freie OTS-OF verfügbar sei, um in den Lücken zwischen den BSA-Molekülen Antikörper zu „parken“.



**Abb. 4.16:** „Proof of Principle“-Experiment mit AK237744-Immobilisierung auf BSA-vorbehandelter OTS-OF.

**A** – Bindungskurven: BSA – Blockierer; AK237744 – fAK; Leg1 – Leg1G-Zellen; **B** – AK237744-Detail (Signale zum AK-Injektionszeitpunkt auf „null“ gesetzt); **C** – Leg1G-Detail (Signale zum Leg1G-Injektionszeitpunkt auf „null“ gesetzt); **D** - halblogarithmische Darstellung der Leg1G-Signale (am Ende einer 2056 s-Diss.-Phase) vs. AK237744-Signal (am Ende einer 600 s-Diss.-Phase), AK237744-Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  über den Spalten angegeben. Artefakt in A bzgl. Bindungskurve für 1  $\mu\text{g/ml}$  korrigiert (s. Anhang).

Der Antikörper sollte so in einer günstigeren Ausrichtung stabilisiert werden. In den Experimenten, deren Ergebnisse im Folgenden präsentiert werden, wurden nach 300 s Basislinien-Aufnahme 80 µl BSA einer Konzentration von 50 µg/ml immobilisiert.

Darauf folgte jeweils eine Injektion von AK237744 (80 µl) bei unterschiedlichen Konzentrationen und schließlich die Applikation von Leg1G-Zellen (150 µl,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml). Abbildung 4.16 zeigt die entsprechenden Ergebnisse in Form von Sensorgrammen. Die Injektionen von

**Tab. 4.5: Statistische Parameter bezüglich der BSA-, Leg1G- und AK237744-Sensorsignale am Ende der entsprechenden Dissoziationsphasen.** N – Anzahl der Messungen; StDev - Standardabweichung; SPW – Spannweite; Dk Test-Statistik Kolmogorov-Smirnov-Test ( $\alpha=0,05$ ).

	BSA	AK237744	Leg1G
<b>N</b>	6	5	6
<b>Mittleres Signal IU</b>	1354	25,6	289,33
<b>StDev [IU]</b>	133,36	39,3	59,6

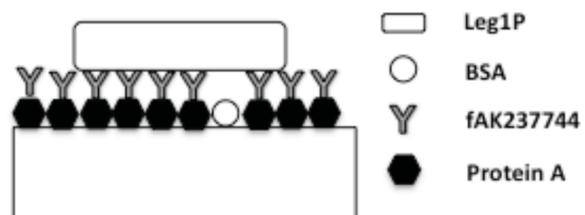
BSA ergab ein mittleres Signal von 1354 IU. Die darauf folgende Applikation von AK237744 als fAK führte für die Konzentrationen 1 µg/ml bis 100 µg/ml am Ende der Dissoziationsphase (600 s) zu einem mittleren Signalanstieg von 25,6 IU. Erst die Injektion von 80 µl einer AK237744-Probe von 200 µg/ml ergab einen deutlich Signalanstieg von 273 IU. Die anschließende Leg1G-Zellen-Injektion resultierte am Ende der Dissoziationsphase (2056 s) in einem mittleren Signal von 289,3 IU. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Unter keinen der getesteten Bedingungen wurde eine deutliche Erhöhung des Leg1G-Zellen-Signals festgestellt. Daher wurde auf die Applikation eines Detektionsantikörpers verzichtet.

**Anmerkung:** Die Chips, welche in Kapitel 4.1.1.4 und 4.1.1.5 verwendet worden sind, wurden im ersten Schritt der OTS-Funktionalisierung mit technischem Aceton gereinigt. Für die Chips, welche in den folgenden Experimenten verwendet worden sind, wurde Aceton für Gaschromatographie verwendet (sofern nicht anders angegeben).

**4.1.2 Antikörper-Immobilisierung auf OTS/Protein A-Oberfläche**

Arbeiten mit Protein A auf Oberflächen bedienen sich meist kovalenter Kopplungsverfahren. Hier wurde getestet, ob sich Protein A auch auf hydrophoben Oberflächen unter Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen immobilisieren lässt.

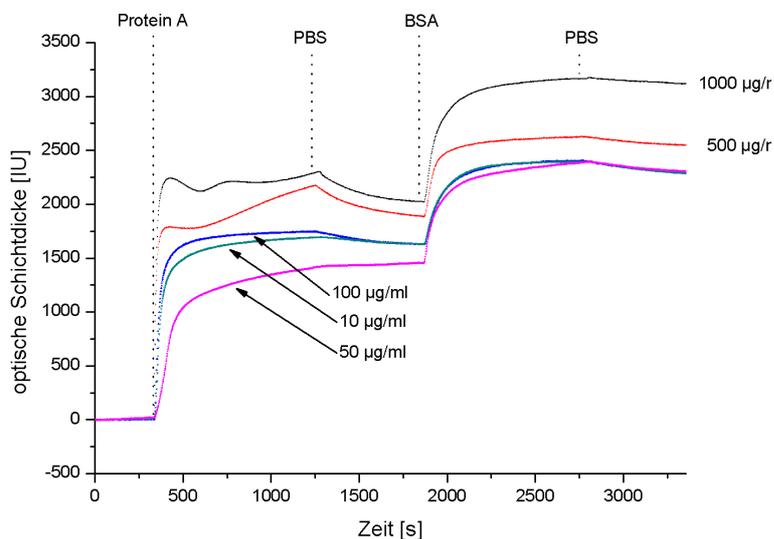
Außerdem wurde getestet, ob sich Legionellen-Zellen durch Antikörper, welche auf der Protein A-ausgestatteten OF immobilisiert worden sind, besser binden lassen als in den vorhergehenden Experimenten. Die angestrebte Strategie ist in Abb. 4.17 schematisch dargestellt.



**Abb. 4.17: Schema des Experiments mit Protein A als Linker zwischen OTS-OF und fAKs.**

## 4 | ERGEBNISSE

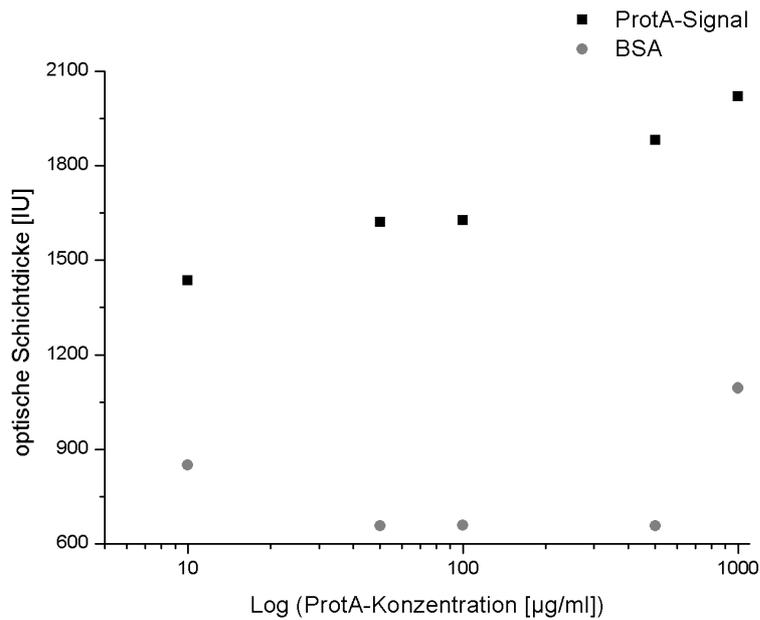
Zuerst wurden unterschiedliche Konzentrationen von Protein A auf eine C18-OF appliziert und freie Stellen, an die unspezifische Anbindungen von anschließend applizierten Antikörpern möglich wären, mit BSA (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 80  $\mu\text{l}$ ) blockiert. Die Sensorgramme in Abb. 4.18 zeigen die Ergebnisse dieser Experimente. Für jede nächst höhere Konzentration wird nach 600 s Dissoziationsphase auch ein höheres Signal gemessen, wobei die Signale der drei niedrigsten Konzentrationen nur geringfügig unterschiedlich ausfallen. Für die Konzentrationen 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein A ein Signal von 1621 IU bzw. 1627 IU (nach 600 s Dissoziationsphase). Bei der Gabe von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhält man ein etwas kleineres Signal von 1435 IU. Die beiden höchsten Konzentrationen zeigen einen für Assoziationsphasen sehr untypischen Signalverlauf, mit Phasen der Signalverminderung und des Anstiegs. Abb. 1.19 stellt die Nettosignale der Protein A-Bindephase und die Nettosignale, die bei der Applikation von BSA gemessen wurden, einander gegenüber.



**Abb. 4.18:** Sensorgramme einer Protein A-Verdünnungsreihe auf einer OTS-OF. Protein A - x  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (80  $\mu\text{l}$ ); BSA - Blockierer; (Messungen auf Chips, bei denen die Funktionalisierung mit nicht wasser-freiem Toluol als Lösungsmittel stattgefunden hat!)

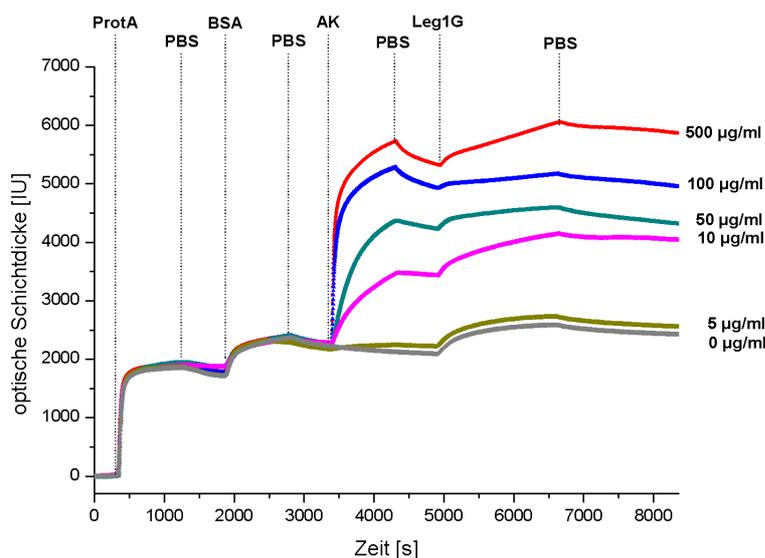
Das kleinste BSA-Signal erhält man bei Applikation von 80  $\mu\text{l}$  einer 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -konzentrierten Protein A-Lösung. Die beiden BSA-Nettosignale unterscheiden sich mit 657 IU bzw. 659 IU nicht von einander. Das gleiche gilt für die entsprechenden Protein A-Signale.

Aufgrund dieser Daten wurde davon ausgegangen, dass die OF bereits bei Applikation von 80  $\mu\text{l}$  einer Lösung mit einer Protein A-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gesättigt ist. In der Annahme, dass unter diesen Bedingungen die Antikörperbindekapazität maximal sei, wurde mit dieser Konzentration weiter gearbeitet.



**Abb. 4.19: Gegenüberstellung der Antikörper- und BSA-Nettosignale.** Rot: BSA-Nettosignal (Differenz von Signalhöhe zum Zeitpunkt der Protein A-Injektion und Signalhöhe nach 600 s Dissoziations-phase). Schwarz: Protein A-Nettosignal (Differenz von Signalhöhe zum Zeitpunkt der BSA-Injektion und Signalhöhe nach 600 s Dissoziationsphase)

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Antikörperkonzentration adäquat ist, um möglichst effektiv Legionellen auf der OF einzufangen. In diesen Experimenten wurden zunächst 80 µl Protein A einer Konzentration von 50 µg/ml injiziert, mit 80 µl BSA (500 µg/ml) blockiert und anschließend der Antikörper AK237744 in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (80 µl). Danach wurden 150 µl einer Legionellen-Suspension der Konzentration  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml zugegeben. Die resultierenden Bindungskurven zeigt Abb. 4.20.



**Abb. 4.20: Sensorgramme der AK237744-Verdünnungsreihe auf einer OTS/Protein A-OF.** Prot A - 50 µg/ml, 80 µl; BSA - Blockierer; AK - AK237744 x µg/ml, 80 µl; Leg1G - Leg1G-Zellen. Daten erhoben auf Messspot 1. (Messungen auf OTS-Chips, bei denen die Funktionalisierung in wasserfreiem Toluol stattfand.) AK-Konzentration s. rechter Rand

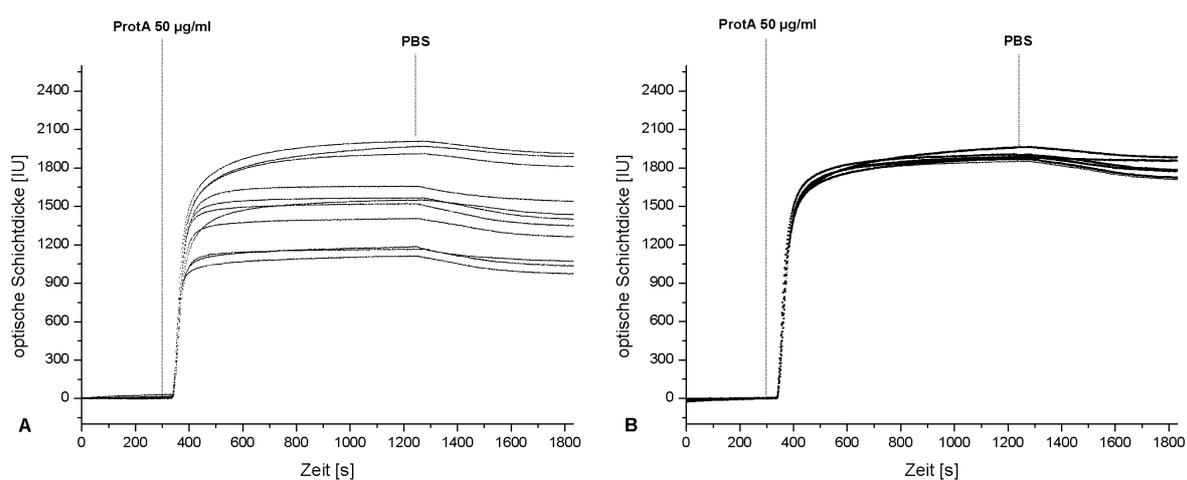
Die Sensorsignale nach Zugabe von 80 µl Protein A-Lösung der Konzentration 50 µg/ml ergaben nach 600 s Dissoziation eine durchschnittliches Signal von 1788,5 IU (N=6) mit einer Standardabweichung von 69,26 IU. Nach Gabe von 80 µl BSA der Konzentration 500 µg/ml und 600 s Dissoziation ergab

## 4 | ERGEBNISSE

sich ein durchschnittliches Signal von 456 IU (N=6) mit einer Standardabweichung von 47,38 IU (Tab. 4.6). Ohne die Applikation von AK237744 fällt das Sensorsignal über den Zeitraum, welcher der Injektion eingeräumt wird und den 600 s Dissoziation, um 131 IU (Abb. 1.20; Sensorgramm bezüglich 0 µg/ml). Die Applikation von 80 µl AK237744 der Konzentration 5 µg/ml ergibt lediglich ein Signaltzuwachs von 48 IU. Erst ab 10 µg/ml wurden Signale gemessen, die größer als 1000 IU sind.

Die Zugabe von 150 µl Legionellen-Suspension einer Konzentration von  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml ergab für die AK237744-Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml sehr kleine Signale von 83 IU bzw. 16 IU. Bei 0 µg/ml AK237744 wurde noch ein Signal von 336 IU gemessen. Für 5 µg/ml AK237744 lag das Signal mit 342 IU unwesentlich höher. Für 10 µg/ml und 500 µg/ml wurden jedoch Signale von 602 IU (10 µg/ml AK237744) bzw. 528 IU (500 µg/ml AK237744) gemessen. Aufgrund dieser Daten wurden die Arbeiten mit AK237744 auf Protein A-OF eingestellt (s. Diskussion).

**Zusatz:** Während der Experimente mit Protein A wurde eine neue Charge OTS-Chips hergestellt. Diese Charge wurde unter Verwendung getrockneten Toluols funktionalisiert. Die Ergebnisse der Protein A-Immobilisierung auf OTS-Chips, die mit wasserfreiem Toluol funktionalisiert worden sind, unterschieden sich deutlich von den Ergebnissen der Protein A-Immobilisierung, auf Chips, die in nicht-wasserfreiem Toluol funktionalisiert worden sind. Im Folgenden werden die Ergebnisse, die mit beiden Chargen erzielt worden sind, vergleichend dargestellt. Die Experimente wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 4.21 A zeigt Protein A-Bindungskurven auf OTS-Chips, die in nicht-wasserfreiem Toluol funktionalisiert worden sind und B die Ergebnisse der entsprechenden Experimente auf OTS-Chips, welche in wasserfreiem Toluol hergestellt worden sind.



**Abb. 4.21:** Vergleich der Protein A-Bindungskurven auf Chips, die in wasserfreiem bzw. nicht-wasserfreiem Toluol OTS-funktionalisiert worden sind. A – OTS-Funktionalisierung in nicht-wasserfreiem Toluol (11 Experimente); B – OTS-Funktionalisierung in wasserfreiem Toluol (6 Experimente).

Tabelle 4.6 zeigt zum besseren Vergleich einige deskriptive Parameter. Beide Datensets sind laut Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ;  $SW(nwf)=0,92424$ ;  $SW(wf)=0,93463$ ). Ein F-Test zum Vergleich der Varianzen zeigt, dass die Varianzen signifikant unterschiedlich sind ( $\alpha=0,05$ ;  $F=23,5394$ ). Schließlich zeigte ein t-Test, dass die Mittelwerte beider Datensets signifikant unterschiedlich sind ( $\alpha=0,05$ ;  $t=-3,45923$ ). Die Ergebnisse der Protein A-Immobilisierung sind also signifikant verschieden. Die Statistik untermauert die Entscheidung zukünftig die OTS-Funktionalisierung der Chips in wasserfreiem Toluol vorzunehmen.

**Tab. 4.6: Statistische Parameter zum Vergleich der OTS-OF, die in nicht-wasserfreiem (nwf) bzw. in wasserfreiem (wf) Toluol hergestellt worden sind.** Protein A-Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase von 600 s; N - Anzahl der Messungen;  $OSD_{MW,600s}$  – mittlere optischen Schichtdicke am Ende der Dissoziationsphase von 600 s ; StDev – Standardabweichung; Max - Maximalwert; Min – Minimalwert; SPW – Spannweite.

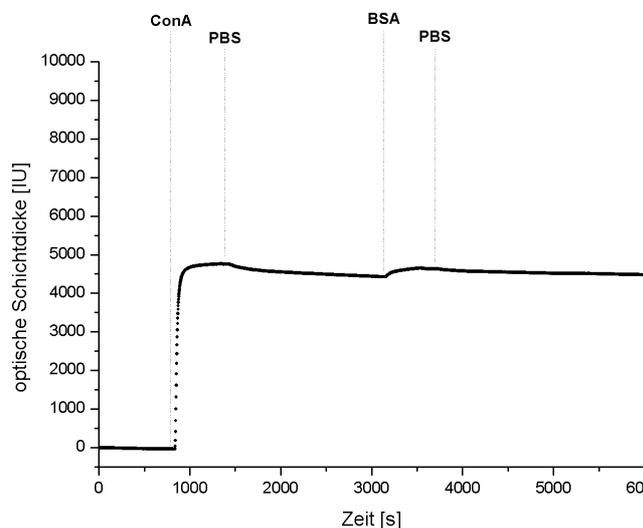
Protein A	N	$OSD_{MW,600s}$ [IU]	StDev [IU]	Min [IU]	Max [IU]	SPW [IU]
nwfChips	11	1424,6	336,02	974	1911	937
wfChips	6	1788,5	69,26	1707	1882	175

### 4.1.3 ConA-SAv als Linker zwischen OTS-OF und Legionellen-Antikörpern

#### 4.1.3.1 Vorversuche

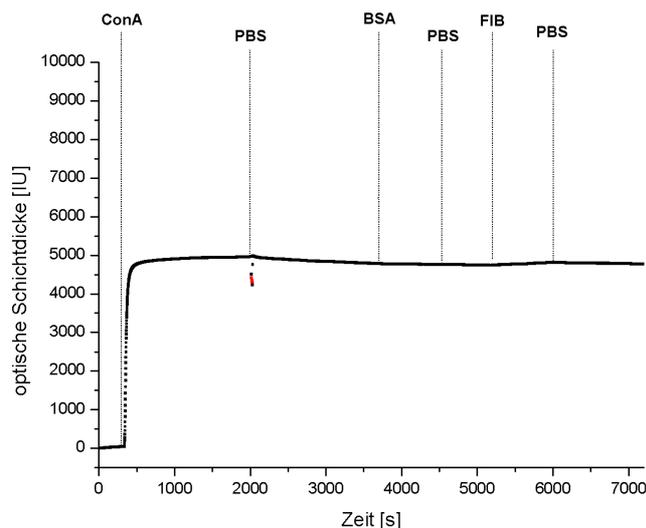
##### 4.1.3.1.1 ConA-Immobilisierung auf OTS-funktionalisierten Glaschips

Das folgende Experiment verfolgte zunächst nicht das ursprünglich angestrebte Ziel, Legionellen auf einer OF zu immobilisieren. Das Ergebnis zusammen mit den Ergebnissen der folgenden Abschnitte dieses Kapitels führt aber direkt auf dieses Ziel zurück (s. Diskussion Kapitel 5.1.3). Es wurde getestet, ob ConA auf der OTS-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkung zu immobilisieren ist.



**Abb. 4.22: Bindungskurve nach ConA-Applikation auf OTS-OF.** ConA – Concanavalin A 1000 µg/ml; BSA Blockierer 1000 µg/ml.

Mit einer derartigen Oberfläche könnte es gelingen Proteine mit mannosehaltigen Zuckerseitenketten oder Bakterien mit Mannose-Einheiten in den Lipopolysacchariden auf der Zelloberfläche aus einer komplexen Matrix heraus selektiv auf der Chip-OF einzufangen. Um die Bindefähigkeit von ConA nach gelungener Immobilisierung zu testen, wurde Fibrinogen verwendet, ein Glykoprotein das aufgrund von Mannose-Einheiten im Zuckeranteil an ConA binden sollte (Diaz-Mauriño et al., 1984). Nach der Äquilibrierung eines OTS-Glaschips und nach 300 s Basislinienaufnahme wurde ConA (50 µl; 1000 µg/ml) injiziert, gefolgt von BSA (50 µl; 1000 µg/ml) nach 1738 s Dissoziation. Aus den Bindungskurven in Abb. 4.22 geht hervor, dass ConA mit einem Signal von 4465 IU an die OTS-funktionalisierte OF bindet. BSA-Injektion führte zu einem Signalzuwachs von 92 IU. Aufgrund dieses Befunds wurde in einem weiteren Experiment zunächst ConA (1000 µg/ml, 150 µl) immobilisiert, anschließend mit BSA (1000 µg/ml; 50 µg/ml) unspezifische Bindestellen blockiert und schließlich Fibrinogen (80 µl; 50 µg/ml) appliziert (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: Bindungskurve von Fibrinogen auf ConA-OTS-OF.** ConA – Concanavalin A 1000 µg/ml; BSA – Blockierer; FIB -Fibrinogen;

Wie sich zeigte, konnte Fibrinogen nicht an die Oberfläche binden.

#### 4.1.3.1.2 Streptavidin-Immobilisierung auf OTS funktionalisierten Glaschips

In diesen Experimenten wurde getestet, ob sich Streptavidin auf einer OTS-funktionalisierten Glasoberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisieren lässt. Auf derartigen vorbereiteten Oberflächen könnte man biotinylierte Antikörper immobilisieren (Diamandis & Christopoulos, 1991). Ein OTS-Chip wurde äquilibriert und nach der Aufnahme einer Basislinie über 300 s wurde SAv (80 µl; 1000 µg/ml) injiziert. Abb. 4.24 zeigt die resultierende Bindekurve. Das Experiment zeigte, dass SAv unter diesen Bedingungen nicht an die OF bindet.

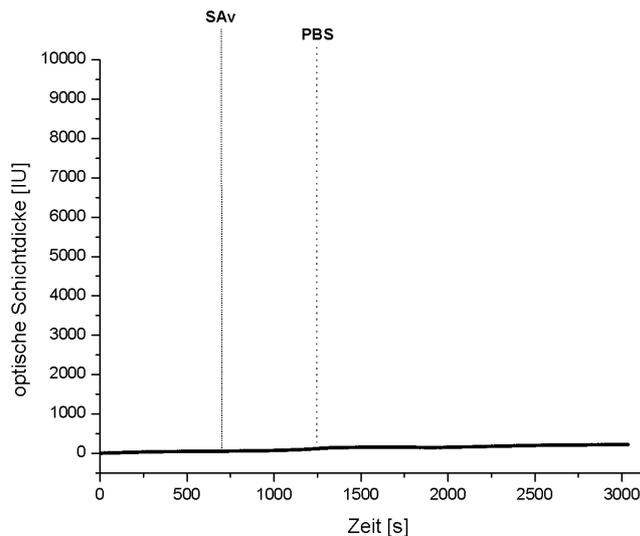


Abb. 4.24: Bindungskurve von Streptavidin auf OTS-OF. SAv – Streptavidin 1000 µg/ml;

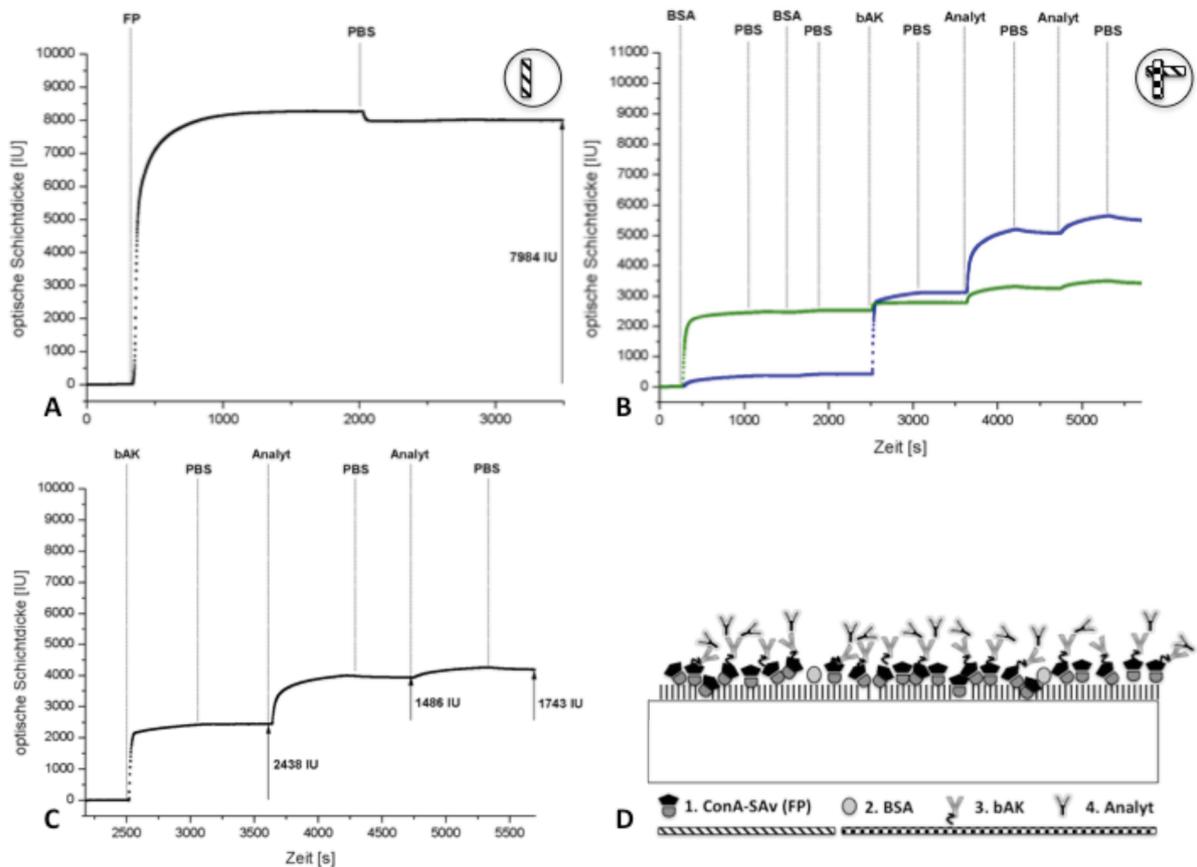
#### 4.1.3.2 ConA-SAv-Fusionsprotein-Immobilisierung auf OTS-funktionalisierten Glaschips

Aufgrund des Befundes, dass sich ConA in PBS pH 7,3 auf OTS-OF immobilisieren lässt, SAv unter den gleichen Bedingungen jedoch nicht, wurde die Bindungsfähigkeit des ConA-SAv-Fusionsproteins auf einer OTS-OF getestet. Die Abbildungen 4.25 A-C zeigen die Bindekurven, welche aus diesem Experiment hervorgegangen sind.

Die folgenden Experimente sind unter Verwendung der in Kapitel 3.2.4.5 beschriebenen Möglichkeit zu Kontrollexperimenten durchgeführt worden (Messstrategie 1). In Abb. 4.25 A ist die Bindungskurve dargestellt, welche über Messspot 2 bei Applikation von ConA (80 µl; 1000 µg/ml) gemessen wurde. Es ergab sich ein Nettosignal von 7984 IU. Der Chip wurde anschließend um 90° gedreht und wieder in das Gerät eingelegt. Zweimalige Passivierung mit BSA (80 µl, 2000 µg/ml und 50 µl, 2000 µg/ml) führte unter Messspot 1 (blau; ConA-SAv belegt) zu einem geringen Signalanstieg von insgesamt (d.h., beiden BSA-Applikationen zusammen) 409 IU (Abb. 4.25 B). Über Messspot 2 (grün, freie OTS-OF) dagegen wurde am Ende der Dissoziationsphase (also dem Zeitpunkt der bAK-Injektion) ein Signal von 2323 IU gemessen.

Die anschließende Zugabe von bAK (50 µl, 500 µg/ml) führte zu einem Signalzuwachs um 2891 IU unter Messspot 1 (blau, ConA-SAv belegt und BSA-blockiert) und um 253 IU unter Messspot 2 (grün, BSA-blockiert). Bei dem Antikörper handelte es sich um den biotinylierten Sekundär-AK „anti-IgG b-Antikörper“, welcher sich gegen den Primär-AK „anti-Ig-fraction Antikörper“ richtet. Letzterer wurde als Analyt verwendet. Die zweimalige Injektion des Analyten (jeweils 50 µl; 1000 µg/ml) führte insgesamt zu einem weiteren Netto-Signalanstieg von 2394 IU auf Messspot 1 (blau) bzw. 645 IU auf Messspot 2 (grün) (nach 390 s Dissoziation nach der 2. Analyt-Injektion). Abb. 4.25 C zeigt die Differenz der Signale, die unter Messspot 1 und Messspot 2 gemessen wurden (Signal(Messspot1)-Signal(Messspot2)).

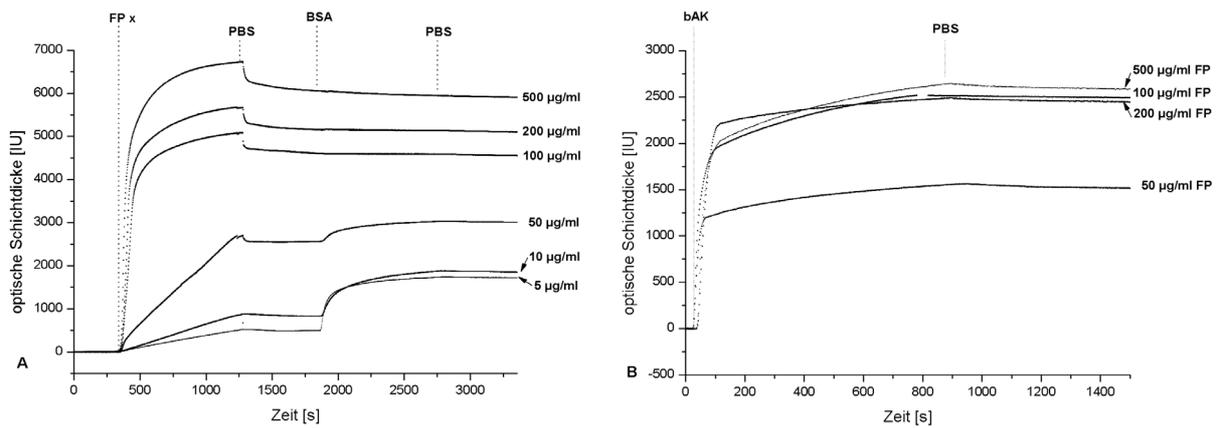
## 4 | ERGEBNISSE



**Abb. 4.25: Experimente auf OTS-OF.** A) Immobilisierung vor Drehen: FP – ConA-SAv-Fusionsprotein. B) Immobilisierungen nach Drehen: BSA – Blockierer (2x); bAK – anti-IgG b-Antikörper; Analyt - anti-Ig-fraction Antikörper (2x 50  $\mu$ l, 1000  $\mu$ g/ml); C) Differenz von Signal(Messspot1) und Signal(Messspot2) ab bAK-Immobilisierung. D – Schema des Versuchs.

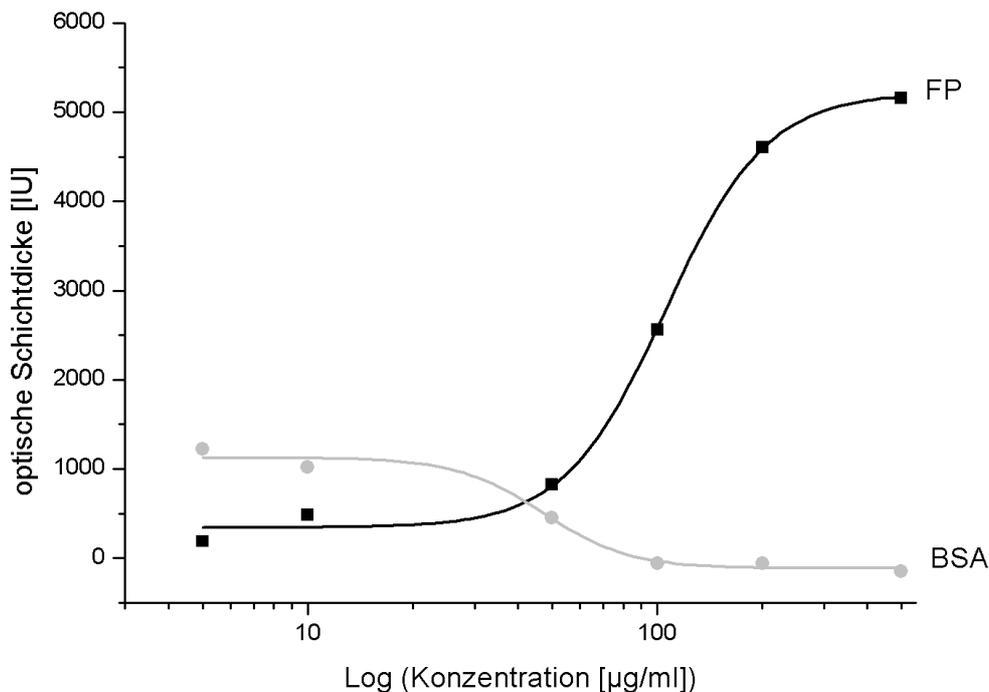
Die Möglichkeit, bAKs auf OTS-Oberflächen mittels ConA-SAv zu immobilisieren, wurde genutzt um Legionellen-Experimente durchzuführen. Zunächst wurde getestet, bei welcher ConA-SAv-Konzentration die Oberfläche gesättigt vorliegt. Den ConA-SAv-Applikationen (jeweils 80  $\mu$ l) unterschiedlicher Konzentration folgte die Gabe von BSA (50  $\mu$ g/ml; 80  $\mu$ l). Abb. 4.26 zeigt die gemessenen Signale.

Höhere ConA-SAv-Signale ergaben auch höhere Sensorsignale. Bei den FP-Konzentrationen ab 100  $\mu$ g/ml wurden keine BSA-Signale mehr gemessen (Abb. 4.26 A). Der biotinylierte Antikörper wurde im selben Experiment auf die OF gegeben jedoch aus Gründen besserer Übersichtlichkeit als Detaildarstellung in Abb. 4.25 B dargestellt.



**Abb. 4.26: A) Bindungskurven FP-Verdünnungsreihe + B) Bindungskurven von bAK -Detail.** A) FP – ConA-SAv x µg/ml, 80 µl; BSA – Blockierer; B) bAK – biotinylierter Antikörper.

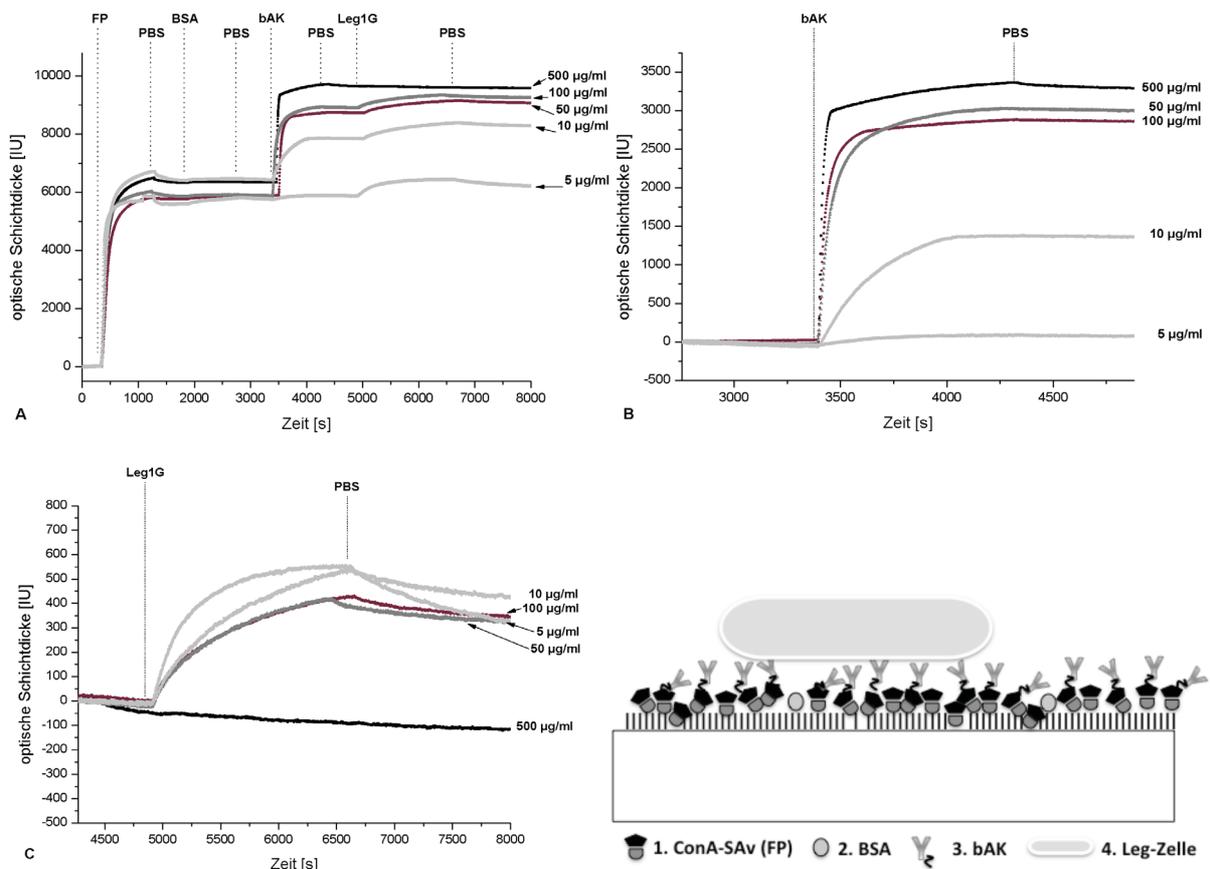
Bei einer Konzentration von 50 µg/ml fällt das bAK-Signal geringer aus als bei den FP-Konzentrationen ab 100 µg/ml. Es gibt keine großen Signalunterschiede bei bAK-Konzentrationen ab 100 µg/ml. Abbildung 4.27 zeigt eine halblogarithmische Auftragung der Konzentrationen von FP und BSA gegen die entsprechend gemessenen Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase. Diese Darstellung veranschaulicht den Befund, dass die OTS-OF ab einer ConA-SAv-Konzentration von 100 µg/ml (80 µl) so belegt ist, dass kein BSA mehr gebunden werden kann. Trotzdem scheint die OF erst bei 200-500 µg/ml ConA-SAv gesättigt zu sein.



**Abb. 4.27: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrationen von ConA-SAv und BSA aufgetragen gegen die gemessenen Netto-Signale.** Nettosignale nach jeweils 600 s Dissoziation; Daten wurden mit einem sigmoidalen Fitting-Model gefittet. FP – ConA-SAv-Fusionsprotein.

#### 4.1.3.3 Legionellen-Experimente auf ConA-SAv-belegter OTS-Oberfläche

Die Chips, die in den folgenden Experimenten verwendet worden sind, unterscheiden sich von den Chips in den Experimenten, über die zuvor berichtet wurde. Zur Herstellung der hier verwendeten Chips wurde mit trockenem Toluol gearbeitet. Für die Experimente wurden zunächst jeweils 300 s Basislinie aufgenommen bevor ConA-SAv (200 µg/ml; 80 µl) injiziert wurde. Nach 600 s wurde mit BSA (50 µg/ml; 80 µl) passiviert und nach weiteren 600 s jeweils ein biotinylierter Antikörper gegen Legionellen (AK237746) von unterschiedlicher Konzentration (80 µl) appliziert. Anschließend erfolgte eine Injektion von Leg1G-Zellen ( $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml; 150 µl). Es sollte festgestellt werden, bei welcher bAK-Konzentration sich Legionellen am besten auf der OF binden lassen. Die Abbildungen 4.28 A-C zeigen die entsprechenden Bindungskurven. Abb. 4.28 A zeigt alle Bindungskurven der vollständigen Experimente. Die Abbildungen B und C zeigen Details der bAK-Bindung und der Legionellen-Bindung aus A. Die Signale in den Detail-Abbildungen wurden so dargestellt, dass der Netto-Signalwert an der Y-Achse abgelesen werden kann. Wie aus der Detailabbildung B hervorgeht unterscheiden sich die Legionellen-Signale bei bAK-Injektionen von 50 µg/ml nicht stark voneinander.



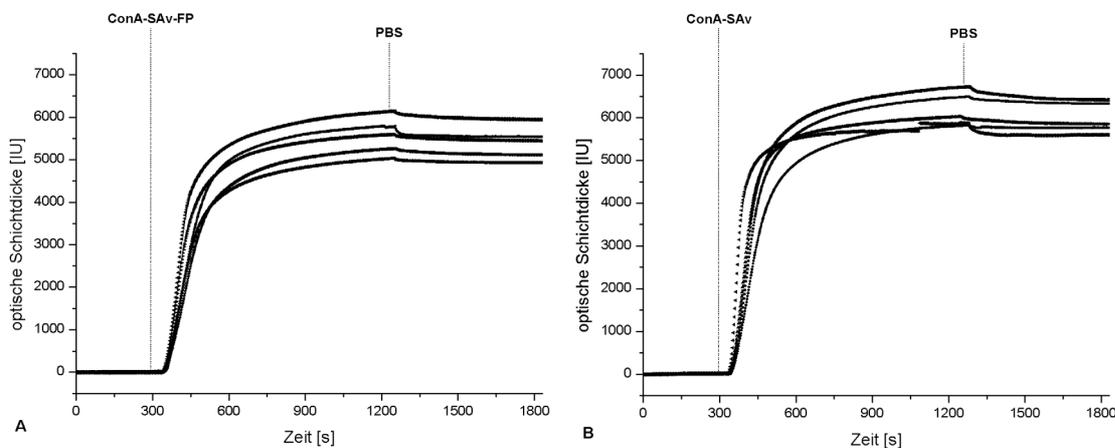
**Abb. 4.28: Legionellen-„Capturing“-Experimente auf ConA-SAv-belegter OTS-Oberfläche.** A ) Vollständige Bindungskurven. B) Detail-Darstellung der bAK-Bindekurven (zum besseren Vergleich der bAK-Nettowerte wurden die Signale zum Zeitpunkt der bAK-Injektion (y-Achse-Wert) gleich 0 gesetzt). C) Detail-Darstellung der Legionella-Signale. D) Applikations-Schema des Experimentes; FP – ConA-SAv; BSA – Blockierer; bAK - biotinylierter Antikörper (AK 237746) x µg/ml; 80 µg/ml; Leg1G – *L. pneumophila* SG1 (Gießen)  $1,5 \cdot 10^8$  Z/ml.

Konzentrationen darunter führten zu wesentlich kleineren Signalen. Detailabbildung C zeigt die Netto-signale nach Legionellen-Applikation. In dem Experiment, in welchem 500 µg/ml bAK injiziert wurden, binden die Legionellen gar nicht. Für alle anderen bAK-Konzentrationen ergeben sich Signale 300 IU und 450 IU (Tab. 4.7). Die hier dargestellten Ergebnisse wurden auf OTS-Chips durchgeführt, bei denen die OTS-Funktionalisierung mit trockenem Toluol vorgenommen wurde. Davor erfolgte schon eine Messung mit Chips, die in nicht trockenem Toluol funktionalisiert worden sind.

**Tab. 4.7: Nettosignale nach Legionellen-Applikation auf eine OTS-OF auf der zuvor** 1. ConA-SAv (200 µg/ml; 80 µl), 2. BSA (50 µg/ml; 80 µl) und 3. bAK (AK 237746; x µg/ml; 80 µl) immobilisiert wurden.

bAK-Konzentration [µg/ml]	Optische Schichtdicke [IU]
5	325
10	426
50	325
100	343
500	-117

Wie in Kapitel 4.1.2 berichtet, stellte sich heraus, dass Messungen mit Protein A auf Chips, die mit trockenem Toluol funktionalisiert worden sind, besser reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Da auch für die ConA-SAv-FP-Strategie Daten bezüglich der FP-Immobilisierung vorliegen, werden sie hier vorgeführt (Abb. 4.29).



**Abb. 4.29: Vergleich der ConA-SAv-Immobilisierung auf OTS-Chips.** A) OTS-Funktionalisierung in nicht-trockenem Toluol (Detail-Darstellung des gleichen Experimentes wie das in B, bevor bekannt wurde, dass trockenes OTS-Funktionalisierung in trockenem Toluol zu besser reproduzierbaren Ergebnissen mit Protein A führt); B) OTS-Funktionalisierung in trockenem Toluol (Detail-Darstellung der ConA-SAv-Immobilisierung, die für die in Abb. 4.28 dargestellten Experimente durchgeführt wurde).

Die Abbildungen 4.29 A und B zeigen, dass die Netto-Signale auf nwChips (A) mit 5396,4 IU etwas niedriger ausfallen als die bei wChips (B) mit 5949,6 IU. Tabelle 4.8 versammelt die mittleren Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase (600 s), Standardabweichungen Minimal- und Maximalwerte sowie die Spannweite der Sensorsignale. Die Mittelwerte der wfChips haben eine leicht höhere Standardabweichung als die nwfChips, wobei die Spannweiten recht ähnlich ausfallen.

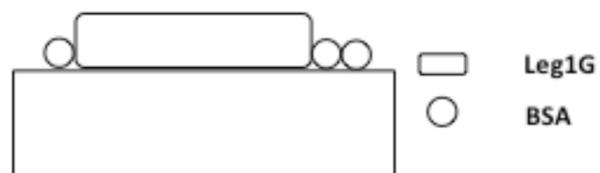
**Tab. 4.8: Netto-Signal-Vergleich von ConA-SAV-Signalen gemessen auf nwfChips und wfChips.** nwfChips – Chips funktionalisiert in nicht-wasserfreiem Toluol; wfChips – Chips funktionalisiert in wasserfreiem Toluol; N – Anzahl der Messungen;  $OSD_{MW,600}$  – mittlere optische Schichtdicke am Ende der Dissoziationsphase von 600 s; StDev – Standardabweichung; Min – Minimalwert; Max – Maximalwert; SPW – Spannweite (Max-Min).

	N	$OSD_{MW,600}$ [IU]	StDev [IU]	Min [IU]	Max [IU]	SPW [IU]
<b>nwfChips</b>	5	5396,4	391,69	4929	5943	1014
<b>wfChips</b>	5	5949,6	413,64	5407	6401	994

#### 4.1.4 *Legionella pneumophila*-Immobilisierung auf OTS-Oberfläche (Direct-Assay-Format)

Aufgrund der fehlgeschlagenen Experimente im Sandwich-Assay-Format wurde ein anderes Format getestet: das Direct-Assay-Format. In dem Experiment wurden nach erfolgter Basislinienstabilisierung 150 µl Leg1G-Zellen unterschiedlicher Konzentration auf die freie OTS-OF appliziert. Abbildung 4.30 zeigt das Schema der Versuche und Abb. 4.31 A die Resultate der Experimente in Form von Sensorgrammen. Auf die Applikation von AK237744 als dAK wurde verzichtet, da eine brauchbare Interaktion mit den Antigenen inzwischen ausgeschlossen wurde. In diesen Experimenten sollte festgestellt werden, ob

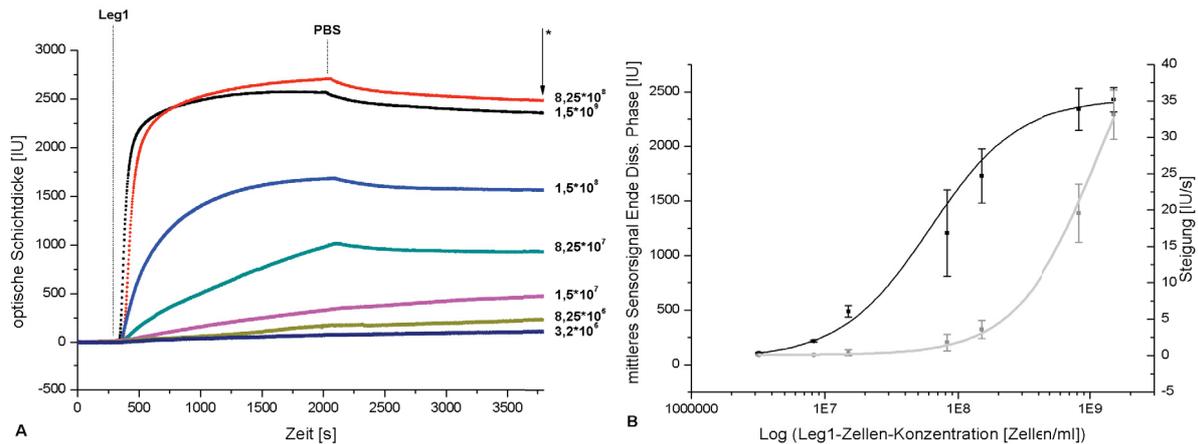
sich bei Immobilisierung von Zellen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen größere Signale messen lassen und, wenn das der Fall ist, welche Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze sich dadurch ergibt. Immerhin bestand die Hoffnung, dass, sollte ein adäquater Antikörper gefunden werden, sich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen noch weiter hin zu geringeren Zellkonzentrationen verschieben lassen. Offensichtlich lassen sich Leg1G-Zellen gut auf der OTS-OF durch hydrophobe Interaktion immobilisieren.



**Abb. 4.30: Schema der Experimente im Direct-Assay-Format.**

sich bei Immobilisierung von Zellen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen größere Signale messen lassen und, wenn das der Fall ist, welche Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze sich dadurch ergibt. Immerhin bestand die Hoffnung, dass, sollte ein adäquater Antikörper gefunden werden, sich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen noch weiter hin zu geringeren Zellkonzentrationen verschieben lassen. Offensichtlich lassen sich Leg1G-Zellen gut auf der OTS-OF durch hydrophobe Interaktion immobilisieren.

Wie aus Abb. 4.31 B hervorgeht, lässt sich mit Hilfe eines sigmoiden Fitting-Modells ein sigmoider Zusammenhang von Leg1G-Zellen-Konzentration und Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase (1758 s) herstellen. Eine Sättigung bzw. obere Nachweisgrenze wird durch das Fitting-Modell für Leg1G-Zellen-Konzentrationen für den Bereich  $\geq 8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml angedeutet, während die untere Nachweisgrenze zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Zellen/ml zu liegen scheint. Ein linearer Bereich, in dem eine Quantifizierung möglich ist (=dynamischer Bereich), könnte zwischen  $6 \cdot 10^7$  Zellen/ml und  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml liegen. Außerdem wurde die Steigung der Bindungskurven in den ersten 20 s der Legionellen-Assoziation auf der OF berechnet.



**Abb. 4.31:** „Proof of Principle“-Experimente im Direct-Assay-Format. A) Bindungskurven des Experiments: Leg1 – Leg1G-Zellen (150 µl; x Zellen/ml). B) Halblogarithmische Auftragung der Leg1-Zellen-OSD am Ende der Dissoziationsphase (schwarz) und der Steigungen in den ersten 20 s der Assoziation (grau) gegen die Leg1G-Zellen-Konzentration (Fitting mit einem sigmoiden Model). \* Ende der Dissoziationsphase (1758 s).

In diesem Zeitintervall entwickelte sich das Signal linear. Die Steigungen wurden ebenfalls gegen den Logarithmus der Legionellen-Konzentration aufgetragen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Auftragung im Bereich zwischen  $10^7$  Zellen/ml und  $10^8$  Zellen/ml. Eine obere Nachweisgrenze lässt sich nicht angeben. Der Beginn eines dynamischen Bereichs lässt sich nicht sicher angeben. Möglicherweise liegt er im Bereich um  $8 \cdot 10^8$  Zellen/ml.

**Anmerkung:** Die Experimente, welche in diesem Kapitel dargestellt worden sind, sind auf Chips durchgeführt worden, die vor der Funktionalisierung mit technischem Aceton gereinigt worden sind.

#### 4.1.5 Experimente mit Leg1G3- bzw. Leg1E6-Antikörpern und Leg1P-Zellen auf OTS-OF

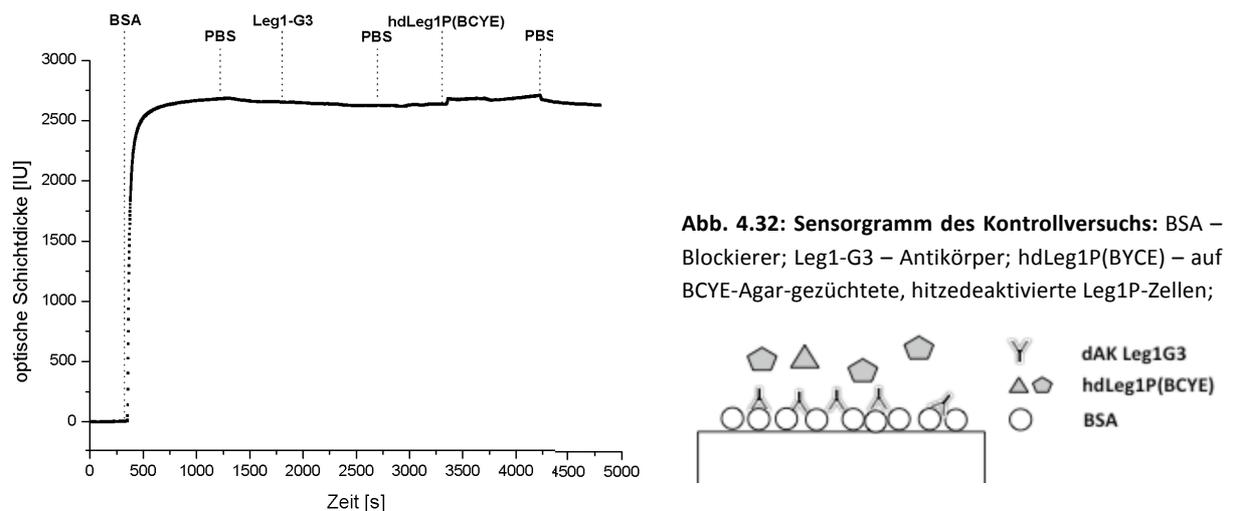
Die Antikörper Leg1G3 und Leg1E6 wurden von Frau Andrea Helming (FzmB) hergestellt. Sie verwendete dazu aus Wasser extrahierte *L. pneumophila* der Serogruppe 1, Stamm Philadelphia (im Folgenden als Leg1P bezeichnet). Für die folgenden Arbeiten wurden sowohl die Antikörper Leg1G3 und Leg1E6 als auch ganze Leg1P-Zellen von Frau Helming zur Verfügung gestellt. Sie führte auf dem ELISA-Prinzip basierende Experimente durch, deren Ergebnisse eine enorm hohe Affinität des Antikörpers zu präparierten Lipopolysacchariden von Leg1P-Zellen zeigten. Die ganzen Zellen wurden nach dem in Kapitel 3.2.2.2 vorgestellten Protokoll hergestellt.

Diese Antikörper-Antigen-Paare wurden eingesetzt, um weitere Experimente durchzuführen, welche die Möglichkeiten des BIAffinity zur Detektion ganzer Zellen aufzeigen sollten. Die Antikörper wurden dementsprechend als fAK adsorptiv auf eine hydrophobe OTS-OF aufgebracht. Außerdem wurde getestet, ob sie auch als dAK verwendbar sind.

## 4 | ERGEBNISSE

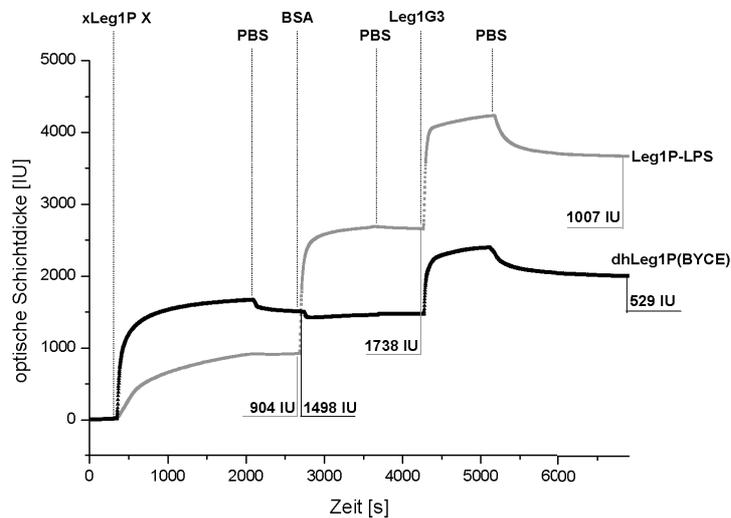
### 4.1.5.1 Vorversuche

Im Rahmen einiger Vorversuche wurde getestet, ob der Antikörper Leg1G3 auch im BIAffinity®-Setup gute Ergebnisse zeitigte. Zunächst wurde die Bindungsfähigkeit des Antikörper Leg1G3 und von hitze-deaktivierten *L. pneumophila*-Zellen auf einer BSA-gesättigten OF getestet. Zu diesem Zweck wurde nach 300 s Basislinienaufnahme BSA (2000 µg/ml, 80 µl, immobilisiert und anschließend Leg1G3 (200 µg/ml, 80 µl). Wie aus Abb. 4.32 zu entnehmen ist, ist nach der Antikörper-Applikation keine Signalveränderung gemessen worden. Nach weiteren 600 s Dissoziation wurden hitze-deaktivierte Legionellen-Zellen (unverdünnt, 80 µl) injiziert. Das Signal ändert sich kurz darauf ein wenig, kehrt aber nach Beendigung der Injektion auf das Signalniveau zurück, welches vor der Injektion bestand. Als nächstes wurde die Bindungsfähigkeit des Antikörpers unter BIAffinity®-Bedingungen getestet. Zuerst wurde für 300 s das Basislinien-Signal aufgezeichnet und anschließend eine Probe einer Antigen-Präparationen (150 µl) und von hitzedeaktivierten Zellen appliziert. Nach einer Dissoziationsphase von 600 s wurden mit BSA (2000 µg/ml, 80 µl) eventuelle, unspezifische Bindungsstellen blockiert, an die der darauffolgende Antikörper Leg1G3 (200 µg/ml, 80 µl) hätte binden können. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Form von Sensorgrammen in Abb. 4.33 zu sehen.



Wie sich zeigte, binden beide Antigen-Präparationen (hitzedeaktivierte Zellen von BCYE-Anzucht und LPS-Präparation von hitzedeaktivierten Zellen aus einer BCYE-Anzucht) an die freie OTS-OF. Die hitzedeaktivierten BCYE-Zellen lieferten nach 600 s Dissoziation mit einem Signal von 1498 IU ein höheres Signal gegenüber der LPS-Präparation mit 904 IU. Die Applikation von BSA führt bei den immobilisierten BCYE-Zellen zu einem Nettoabfall des Signals von 38 IU und bei der LPS-Präparation zu einem Nettosignalzuwachs von 1738 IU (Dissoziation 600 s). Injektion des Antikörpers Leg1G3 erhöhte das Signal im Falle der BCYE-Zellen um weitere 529 IU und im Falle der LPS-Präparation um 1007 IU (Dissoziation 600 s).

Auf diese Weise wurde festgestellt, dass der Antikörper mit beiden Antigen-Darreichungen auch unter den Bedingungen der RfS brauchbare Ergebnisse liefert. Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass der Antikörper spezifisch an die Antigene gebunden hat.



**Abb. 4.33: Sensorgramme der Vorversuche.** xLeg1P X (unverdünnt, 150 µl) – Entweder hdLeg1P(BYCE) (Anzucht von *L. pneumophila*, SG1, Stamm Philadelphia auf BYCE, ganze Zellen, hitzedeaktiviert) oder Leg1P-LPS (Lipopolysaccharid-Präparation von *L. pneumophila*, SG1, Stamm Philadelphia auf BYCE gezüchtet); BSA – Blockierer 2000 µg/ml; Leg1G3 – Antikörper

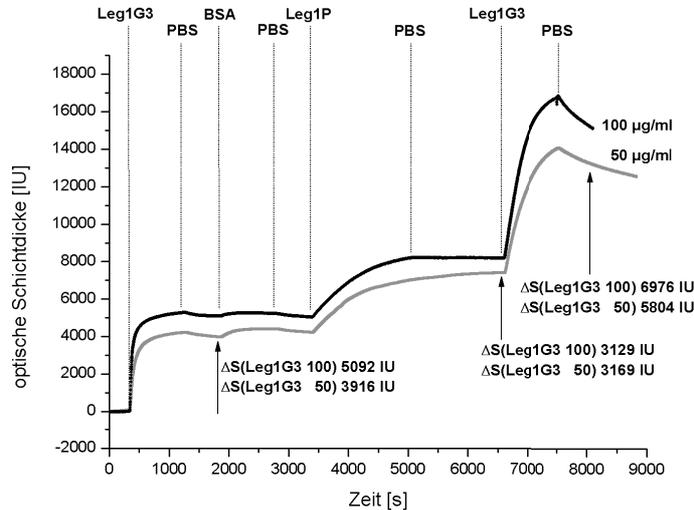


#### 4.1.5.2 Experimente mit Leg1G3-Antikörpern als Fänger-/Detektor-Antikörper im „Sandwich-Assay-Format“

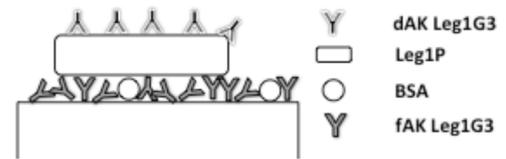
Die im vorhergehenden Abschnitt angeführten Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die fehlgeschlagenen Experimente, die in Kapitel 4.1.1.4 präsentiert worden sind, mit einem Ungenügen der Bindung des erworbenen Antikörpers mit dem Wildtyp-Stamm der verwendeten Zellen (*L. pneumophila*, SG1, Wildtyp-Isolat Gießen) zu tun haben könnte. Um diese Frage zu klären, wurden die Experimente aus Kapitel 4.1.1.4 mit dem Antikörper-Antigen-Paar Leg1G3 (Antikörper) und den Leg1P-Zellen wiederholt. Für diese Experimente lieferte das FzmB Legionella-Zellen, welche gemäß des Protokolls getötet worden sind, das auch vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH) in Gießen angewendet wurde. Zunächst wurden Experimente unternommen, um die adäquate Antikörperkonzentration festzustellen. Abb. 4.34 zeigt die Sensorgramme von Experimenten mit Leg1G3 (50 µg/ml und 100 µg/ml, 80 µl) als Fänger-Antikörper, welche nach 300 s Basislinien-Aufnahme appliziert worden sind. Nach einer Dissoziationsphase von 600 s mit PBS wurde mit BSA (80 µl; 500 µg/ml) blockiert. Anschließend wurde eine Leg1P-Probe ( $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml; 150 µl) injiziert. Darauf folgten eine Dissoziationsphase von 1500 s und anschließend eine weitere Injektion von Leg1G3-Antikörper (80 µl, 100 µg/ml). Applikation von Leg1G3-AK auf eine leere OTS-OF führt bei einer AK-Konzentration von 100 µg/ml zu einem Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase von 5092 IU und bei 50 µg/ml von 3916 IU bei. Bei beiden Signalen ist

## 4 | ERGEBNISSE

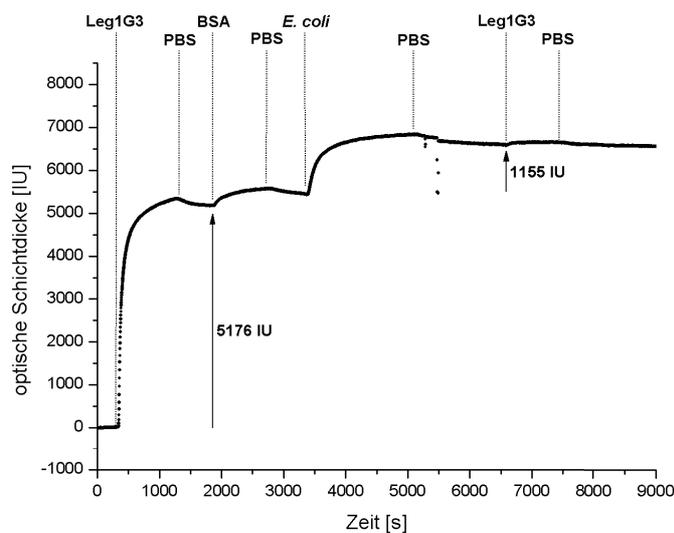
nur wenig Dissoziation in der Dissoziationsphase zu erkennen. Bei 100 µg/ml Leg1G3 ist kein Netto-BSA-Signal zu verzeichnen, im Fall von 50 µg/ml Leg1G3 ist es sehr niedrig. Die anschließende Applikation der Zellen lieferte ein Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase von 3129 IU (bei 100 µg/ml Leg1G3) bzw. 3169 IU (bei 50 µg/ml Leg1-G3).



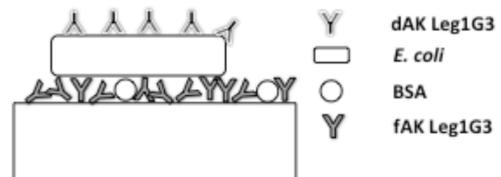
**Abb. 3.34: Experimente mit Leg1G3 als fAK bei Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml:** Leg1G3 – Leg1G3 als fAK x µg/ml; BSA - Blockierer; Leg1P - Leg1P-Zellen; Leg1G3 – Leg1G3 als dAK.



Zu bemerken ist, dass das Signal der Zellen bei dem 100 µg/ml-Experiment mit dem Einsetzen des Puffers konstant bleibt, während es im 50 µg/ml-Experiment weiter ansteigt. Eine weitere Leg1G3-Injektion (100 µg/ml) nach einer Dissoziationsphase von 1500 s ergab ein Nettosignal von 6076 IU (im 100 µg/ml-Leg1G3-Experiment) bzw. 5804 IU (im 50 µg/ml-Leg1G3-Experiment). Zur Kontrolle wurde folgendes Experiment durchgeführt: Nach 300 s Basislinien-Aufnahme wurde Leg1G3 (80 µl, 100 µg/ml) appliziert.



**Abb. 4.35: Kontrollexperiment mit *E. coli* und Leg1G3 als fAK.** Leg1G3 - Leg1G3 als fAK; BSA - Blockierer; *E. coli* – *E. coli*-Zellen; Leg1G3 – Leg1G3 als dAK;



Einer Dissoziationsphase von 600 s folgte eine BSA-Injektion (80 µl, 50 µg/ml) zum Blockieren eventuell freier unspezifischer Bindestellen und, nach einer weiteren Dissoziationsphase von 600 s, eine

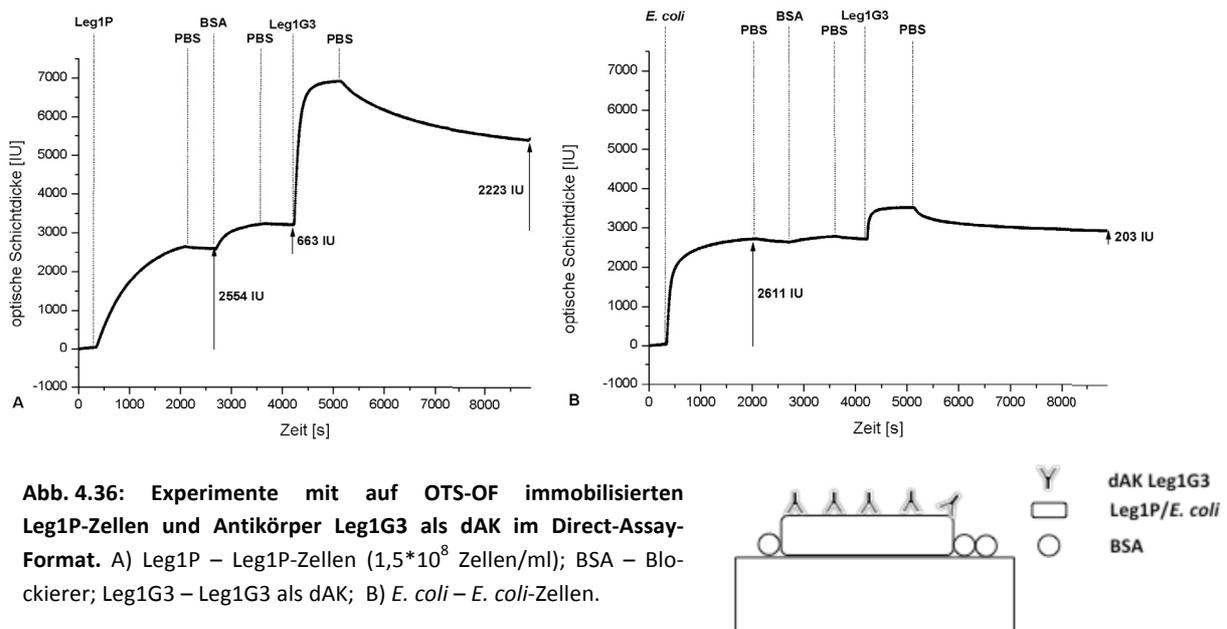
Applikation von *E. coli*-Zellen (150 µl, 1.5x10<sup>8</sup> Zellen/ml). Anschließend wurde nach weiteren 1500 s Dissoziationsphase erneut Leg1G3 (80 µl; 100 µg/ml) injiziert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Form von Sensorgrammen in Abb. 4.35 dargestellt. Die Immobilisierung des Antikörpers Leg1G3 auf der OTS-OF führte zu einem Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase von 5176 IU. BSA-Blockierung ergab eine sehr geringe Signaländerung. Die darauf folgende Leg1P-Zellen-Zugabe resultierte nach 1500 s Dissoziationsphase in ein Signal von 1155 IU. Eine weitere Applikation von Leg1G3-Antikörpern (80 µl, 100 µg/ml) ergab keinen Signalanstieg. In Tab. 4.9 sind die Sensorsignale nach Beendigung der Dissoziationsphase für die erste und zweite AK-Zugabe sowie die der Leg1P- bzw. *E. coli*-Applikation einander gegenübergestellt.

**Tab. 4.9: Vergleich der relevanten Signale der Experimente mit Leg1P und *E. coli*:** Leg1G3 (fAK) – Leg1G3 in der Rolle des fAK; Leg1G3 (dAK) – Leg1G3 in der Rolle des dAK.

	Leg1P	<i>E. coli</i>
<b>Leg1G3 (fAK)</b>	3129 IU	1155 IU
<b>Leg1G3(dAK)</b>	6976 IU	0 IU

**4.1.5.3 Experimente mit Leg1G3-Antikörper als dAK im Direct-Assay-Format**

In Kapitel 4.1.4 wurden Ergebnisse präsentiert, die sich auf den Direct-Assay-Format-Ansatz bezogen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Leg1G-Zellen gut aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Zellen und reiner OTS-OF immobilisieren lassen. Mit einem dAK wurde nicht gearbeitet, da kein passender AK zur Verfügung stand.



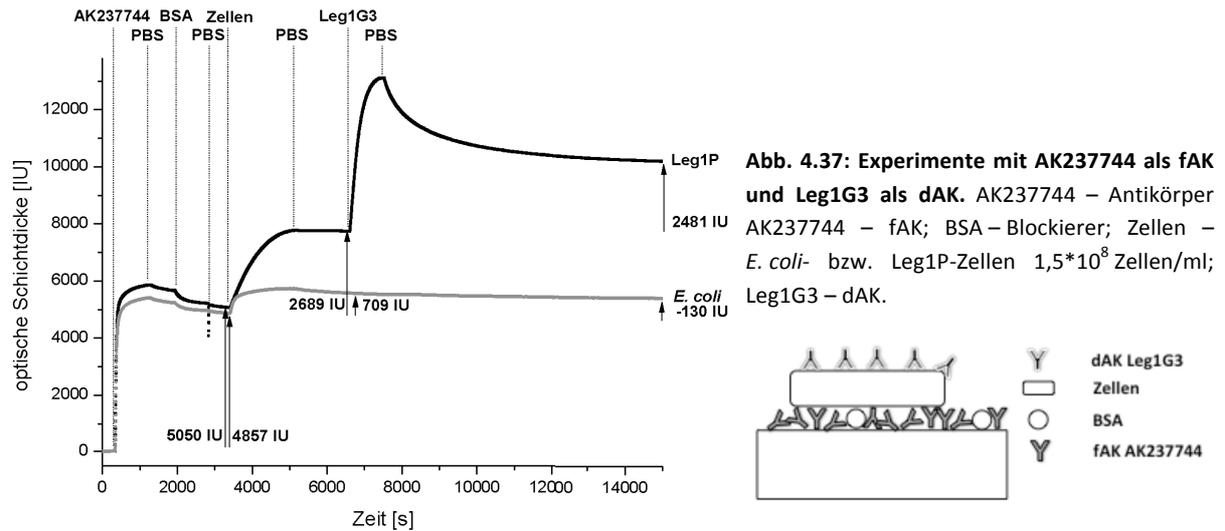
Nun wurde getestet, welche Möglichkeiten sich durch die Anwendung des Antikörper-Antigen-Paars Leg1G3-Leg1P im Direct-Assay-Format ergeben. Die Abbildungen 4.36 A und B zeigen die Sensorgramme des Direct-Assay-Format Experimentes und dem Kontrollexperiment mit *E. coli*. A zeigt die Bindungskurve, die nach der Applikation von Leg1P-Suspension (150 µl,  $1.5 \times 10^8$  Zellen/ml), gefolgt von BSA (80 µl, 500 µg/ml) und dem Antikörper Leg1G3 (80 µl, 100 µg/ml), aufgenommen wurde. Die Leg1P-Zellen auf der freien OTS-OF führten zu einem Nettosignal von 2554 IU. Die Injektion von BSA ergab einen weiteren Signalzuwachs von 663 IU. Die folgende Applikation des Antikörpers Leg1G3 ergab nach 3780 s Dissoziationsphase ein Detektionsnettosignal von 2223 IU. Das gleiche Experiment wurde zur Kontrolle mit *E. coli* BL21 DE3 statt *L. pneumophila*, SG 1, Stamm Philadelphia, unternommen. Abbildung 4.36 B zeigt das entsprechende Sensorgramm. *E. coli* ließ sich auf der OTS-OF immobilisieren und lieferte ein Signal von 2611 IU. BSA-Applikation ließ das Signal um 78 IU steigen. Die Injektion des Antikörpers Leg1G3 erhöhte das Signal um 203 IU.

### **4.1.5.4 Experimente mit Leg1P-Zellen und AK237744-Antikörper sowie Leg1E6**

Angesichts der Erfolge mit dem Antikörper-Antigen-Paar Leg1G3 – Leg1P wurde getestet, ob der bisher eingesetzte Antikörper AK237744, welcher die Leg1G-Zellen zwar im Mikrotiter-Platten-Test jedoch im Biosensor-Setup nicht binden konnte, die Leg1P-Zellen binden kann. Außerdem wurde ein weiterer Antikörper vom FzmB, Leg1E6, als Fänger- und Detektionsantikörper getestet.

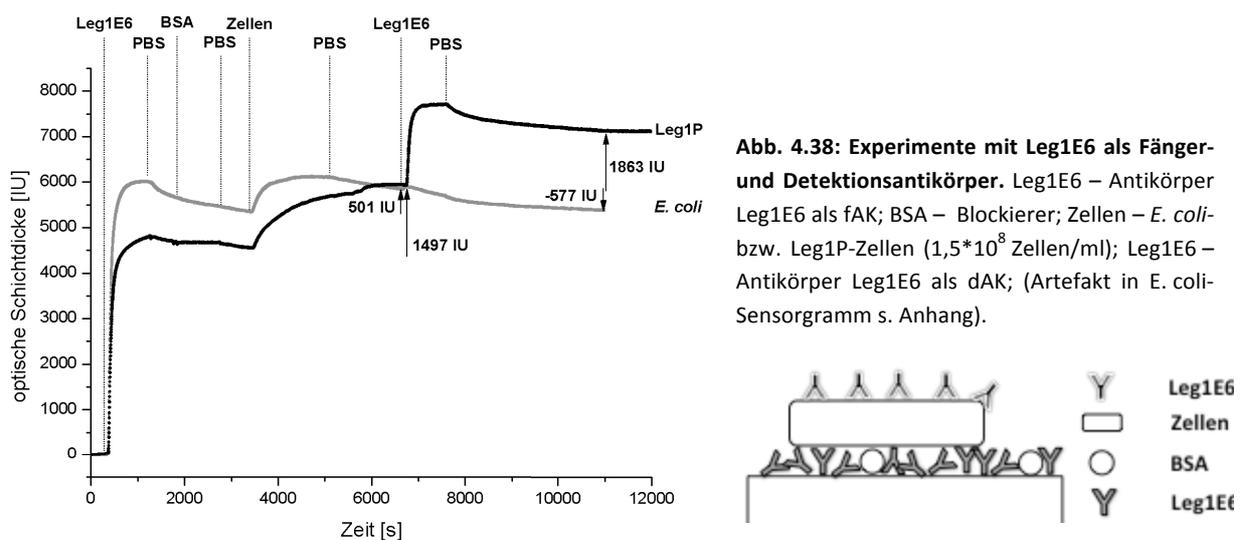
#### 4.1.5.4.1 Verwendung von AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK

Dazu wurde AK237744 (80 µl, 100 µg/ml) auf einer OTS-funktionalisierten OF immobilisiert, eventuell freie, unspezifische Bindestellen mit BSA (80 µl, 50 µg/ml) blockiert, Leg1P bzw. im Kontrollexperiment *E. coli* (jeweils 80 µl,  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml) injiziert und schließlich Leg1G3 (80 µl, 100 µg/ml) als dAK appliziert. Die entsprechenden Bindekurven sind in Abbildung 4.37 dargestellt. Die Zell-Immobilisierung ergab im Fall von *E. coli* ein Signal von 709 IU und im Fall von Legionellen ein fast 4-fach höheres Signal von 2689 IU. Leg1G3 als dAK führte zu einem weiteren Signalanstieg von 2481 IU für Legionellen und endete im Fall von *E. coli* mit einer Signalabnahme um 130 IU. Aufgrund der Ergebnisse wurde entschieden, dass mit AK237744 (80 µl, 100 µg/ml) als fAK und mit Leg1G3 (80 µl, 100 µg/ml) als dAK weitergearbeitet wird.



#### 4.1.5.4.2 Verwendung von Leg1E6 als fAK und dAK

Das FzmB stellte noch einen weiteren Antikörper zur Verfügung: Leg1E6. In zwei Experimenten wurden jeweils Leg1E6-Antikörper (80  $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml) mittels hydrophober Wechselwirkungen auf der OTS-OF immobilisiert. Danach folgten auf die Blockierung eventueller unspezifischer Bindestellen mit BSA (80  $\mu$ l, 50  $\mu$ g/ml) eine Injektion von Leg1P-Zellen (150  $\mu$ l,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) bzw. *E. coli*-Zellen (150  $\mu$ l,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml). Anschließend wurde der Antikörper Leg1E6 (80  $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml) als dAK appliziert. Abbildung 4.38 zeigt die entsprechenden Bindungskurven. Leg1E6-Immobilisierung führte zu Signalen von 4457 IU bzw. 5353 IU. BSA führte zu keinerlei Signalanstieg. Leg1P führte dagegen zu einem Nettoanstieg um 1497 IU und *E. coli* zu 501 IU.



Die Injektion von Leg1E6 als dAK ergab im Fall vorhergehender Leg1P-Immobilisierung einen Signalanstieg um 1863 IU. Im Fall des *E. coli*-Experiments war nach einer Dissoziationsphase von 3340 s ein

Signalrückgang um -577 IU festzustellen. In Tab. 4.10 sind die Signale der verschiedenen AKs bei Verwendung als Fänger- und Detektionsantikörper im Sandwich-Assay-Format zusammengefasst.

**Tab. 4.10: Vergleich Leg1P-Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase unter Verwendung verschiedener AKs im SAF:** <sup>+</sup> Daten aus 4.1.8.4.1; <sup>\*</sup> Daten aus 4.1.8.2; <sup>\*\*</sup> Daten aus 4.1.8.4.1 (in 4.1.8.2 Dissoziationszeit zu kurz zum Wertevergleich; <sup>#</sup> Daten aus 4.1.8.4.2; <sup>###</sup> Am Ende der Diss.-Phase! „0“ in Klammern bedeutet: Signal nach dAK-Injektion sinkt weiter. Signalrückgang nach dAK-Dissoziationsphase (negative Werte) mit „-“ = „keine Bindung“ gekennzeichnet. Nettosignale angegeben in IU.

	<b>AK237744</b> <b>fAK<sup>+</sup></b>	<b>AK237744</b> <b>dAK<sup>+</sup></b>	<b>Leg1G3</b> <b>fAK<sup>*</sup></b>	<b>Leg1G3</b> <b>dAk<sup>**</sup></b>	<b>Leg1E6</b> <b>fAK<sup>#</sup></b>	<b>Leg1E6</b> <b>dAK<sup>#</sup></b>
<b>Leg1P</b>	2689	-	3129	2481	1497	1863
<b>E. coli</b>	709	-	1155	-	501 (0) <sup>###</sup>	-

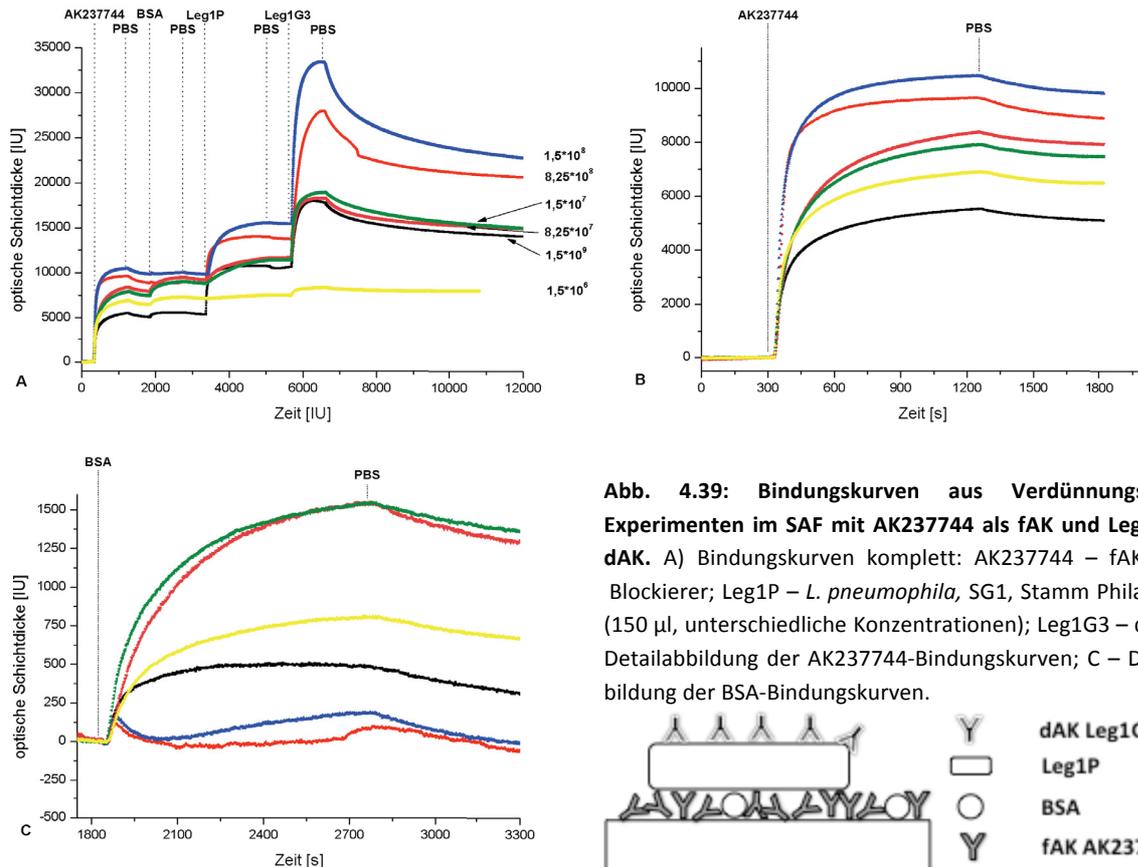
#### 4.1.5.5 Leg1P-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit AK237744 als fAK- und Leg1G3 als dAK

Im nächsten Schritt wurde untersucht, in welchem Konzentrationsbereich eine Quantifizierung von Leg1P mittels der RfS-Methode möglich ist. Zu diesem Zweck wurde eine serielle Verdünnungsreihe von Leg1P angefertigt und gemessen. Als fAK wurde zunächst AK237744 (80 µl, 50 µg/ml) auf der OTS-OF immobilisiert. Danach erfolgte eine Blockierung even-

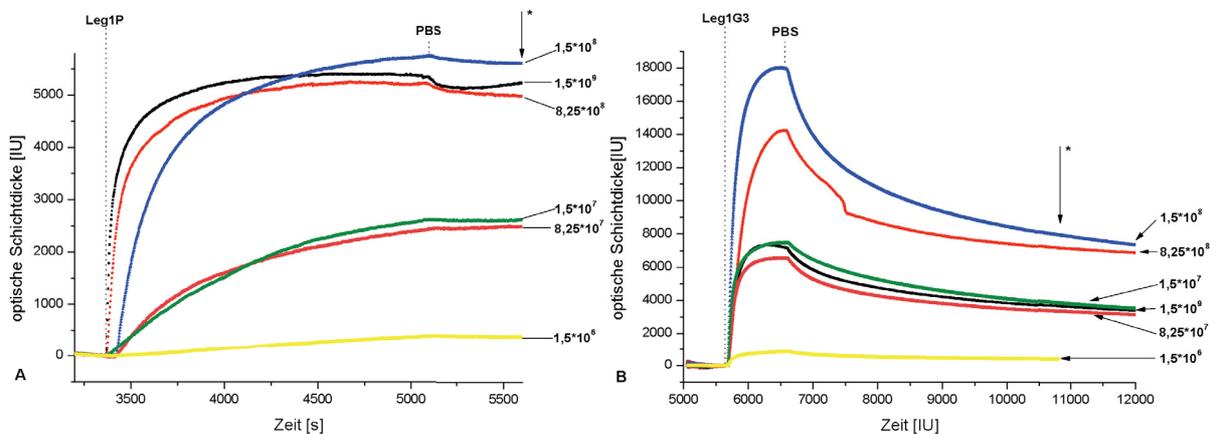
**Tab. 4.11: Sensorsignale am Ende der 600 s-Dissoziationsphase und Steigungen von AK237744- und BSA-Bindungskurven.** OSD<sub>600</sub> - Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase von 600 s; Steigung<sub>12</sub> - Steigungen der AK237744-Bindungskurven in den ersten 12 s; Steigung<sub>16</sub> - Steigungen der BSA-Bindungskurven in den ersten 16 s; N - Anzahl der Messungen; Ø - Mittelwert nach N Messungen; StDev - Standardabweichung; Max - Maximalwert; Min - Minimalwert; SPW - Spannweite.

	<b>AK237744</b>		<b>BSA</b>	
	OSD <sub>600</sub> [IU]	Steigung <sub>12</sub> [IU/s]	OSD <sub>600</sub> [IU]	Steigung <sub>16</sub> [IU/s]
<b>N</b>	6	6	6	6
<b>Ø</b>	7603,83	139,19	579,5	7,18
<b>StDev</b>	1684,53	48,75	627,92	3,25
<b>Max</b>	9804	201,59	1351	13,21
<b>Min</b>	5086	87,01	-83	4,69
<b>SPW</b>	4718	114,58	1438	8,52

tuell vorhandener, unspezifischer Bindestellen mittels BSA (80 µl, 50 µg/ml). Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von Leg1P (150 µl) injiziert.

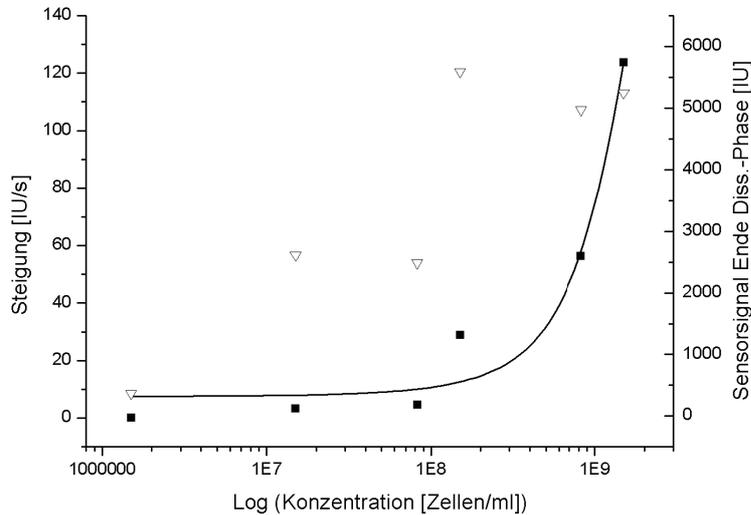


Zum Schluss wurde noch der Antikörper Leg1G3 (80 µl, 50 µg/ml) als dAK appliziert. Abbildung 4.39 A zeigt die kompletten Bindungskurven aller Experimente in einem Sensorgramm. Die Abbildungen 4.39 B und C zeigen die einzelnen Abschnitte der Experimente im Detail wobei die Signale zum Zeitpunkt der Injektion auf „0“ gesetzt worden sind. Die Mittelwerte der Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase von 600 s und die Steigungen bezüglich der AK237744- und BSA-Immobilisierung sind in Tabelle 4.11 zusammen mit einigen deskriptiven Parametern angegeben.



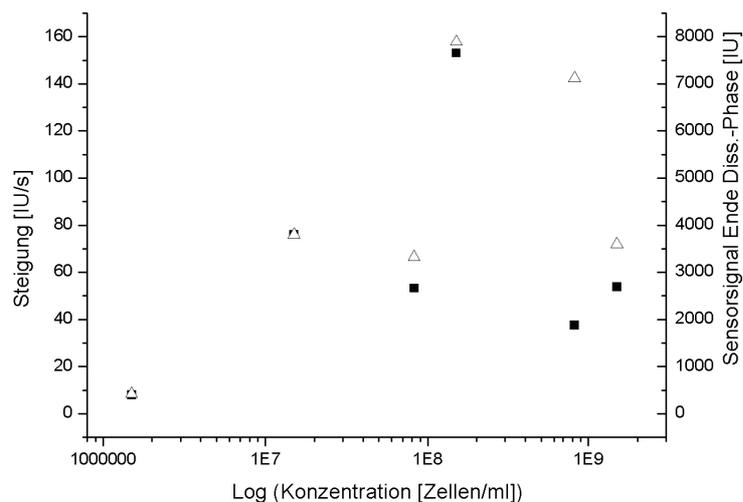
## 4 | ERGEBNISSE

In den Abbildungen 4.40 A und B sind die Bindekurven von Leg1P und dem Detektions-Antikörper Leg1G3 nochmals im Detail dargestellt, wobei die Kurven so angepasst wurden, dass das Signale zum Zeitpunkt der Injektion auf der y-Achse den Wert „0“ annimmt.



**Abb. 4.41: Steigung der Leg1P-Zellen-Bindungskurven vs. Sensorsignal am Endpunkt der Dissoziationsphase (halblogarithmische Darstellung):** schwarze Quadrate – Steigungen der Bindungskurven in Abhängigkeit von Leg1P-Konzentration; Fitting mit sigmoidem Fitting-Modell; weiße Dreiecke – Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase (600 s) in Abhängigkeit von Leg1P-Konzentration.

Die Leg1P-Nettosignale nach 600 s Dissoziation und die Leg1P-Steigungen sind in Abb. 4.41 graphisch dargestellt. Die Darstellung erfolgt halblogarithmisch. Im Fall der Verwendung der Steigungen lässt sich eine untere Nachweisgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml angeben. Eine obere Nachweisgrenze sowie ein dynamischer Bereich und damit die Bestimmungsgrenzen konnten durch die Steigung der Leg1P-Bindungskurven nicht ermittelt werden.



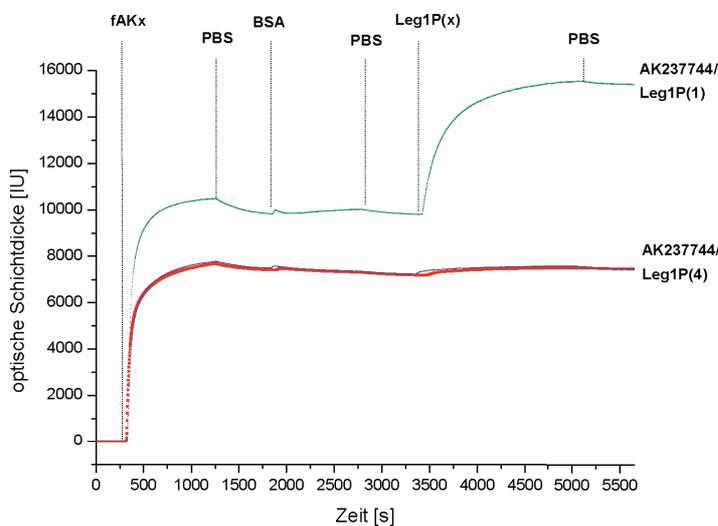
**Abb. 4.42: Steigung der Leg1G3-Kurven vs. Sensorsignal am Endpunkt der Dissoziationsphase (halblogarithmische Darstellung):** schwarze Quadrate – Steigungen der Leg1G3-Bindungskurven in Abhängigkeit von Leg1P-Konzentration; weiße Dreiecke – Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase (4246 s) nach Leg1G3-Injektion in Abhängigkeit von Leg1P-Konzentration.

In Abb. 4.42 findet sich die halblogarithmische Aufbereitung der Ergebnisse bezüglich der Verwendung des dAK. Dargestellt sind wiederum die optischen Schichtdicken nach 4246 s und die Steigungen, die sich aus den Leg1G3-Bindungskurven ergaben. Sowohl im Fall der Nettosignale als auch im

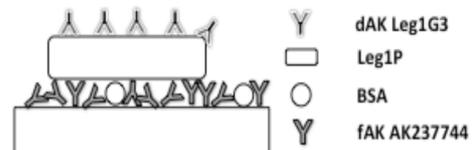
Fall der Steigungen ergab sich kein Zusammenhang mit der Zell-Konzentration bezüglich dessen man ein sinnvolles sigmoidales Fitting hätte vornehmen können.

**4.1.5.6 Leg1P-Zellen der Charge 4: Experimente mit AK237744 als fAK- und Leg1G3 als dAK**

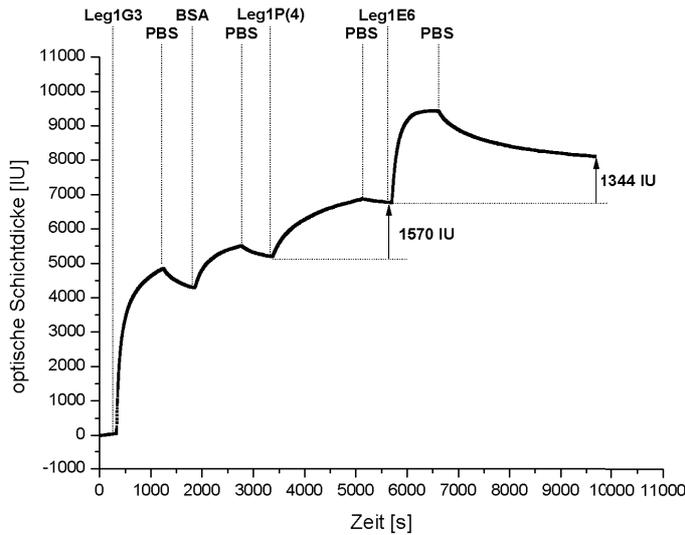
Für weitere Experimente mit Leg1P-Zellen musste auf eine neue Charge der Zellen zurückgegriffen werden, da die Zellen der ersten Charge aufgebraucht waren. Die Bindungssignale von Leg1P-Zellen der zweiten Charge an die immobilisierten AK237744-fAK fielen jedoch wesentlich niedriger aus als die Bindungssignale von Leg1P-Zellen der ersten Charge. Die Ergebnisse fielen auch nach zweimaligem Austausch der zweiten Charge gegen eine dritte und eine vierte Charge anders aus als mit der ersten Charge. Abbildung 4.43 zeigt eine Bindungskurve aufgenommen mit dem fAK AK237744 (80 µl; 50 µg/ml) und Leg1P-Zellen der ersten Charge (Leg1P(1)) (grün) (1,5\*10<sup>8</sup> Zellen/ml, 150 µl) im Vergleich zu zwei Bindungskurven, die mit dem fAK AK237744 (s.o.) und Zellen der vierten Charge (Leg1P(4)) (s.o.) aufgenommen worden sind (blau, rot). Die OSD am Ende einer Dissoziationsphase von 600 s betrug im Fall von Leg1P(1) 5590 IU und im Fall von Leg1P(4) ≈190 IU. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde schließlich anhand der vierten Charge getestet, ob der Einsatz eines anderen Antikörpers als des bisher verwendeten AK237744 als fAK bessere Ergebnisse erbringe. Die Abb. 4.44 zeigt die Ergebnisse von Experimenten mit Leg1G3 als fAK und Leg1E6 als dAK.



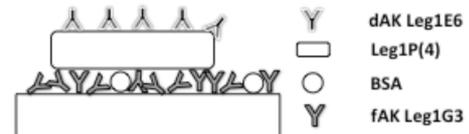
**Abb. 4.43: Vergleich von Bindungskurven unter Verwendung von Leg1P-Zellen 1. und 4. Charge: fAK<sub>x</sub> – AK237744; BSA – Blockierer; Leg1P(x) – Leg1P-Zellen der 1. Charge (x=1) bzw. der 4. Charge (x=4) (rechter Rand)**



Wie sich herausstellte, binden Leg1P-Zellen der vierten Charge (Leg1P(4)) mit 1570 IU wesentlich besser an immobilisierte Leg1G3-Antikörper als an AK237744. Leg1E6 lässt sich als dAK verwenden und liefert einen Signalzuwachs von 1344 IU.



**Abb. 4.44: Bindungskurven unter Verwendung von Leg1G3 als fAK und Leg1P-Zellen der 4. Charge (Leg1P(4)):** Leg1G3 – fAK; BSA – Blockierer; Leg1P(4) – Leg1P-Zellen der 4. Charge; Leg1E6 – dAK;



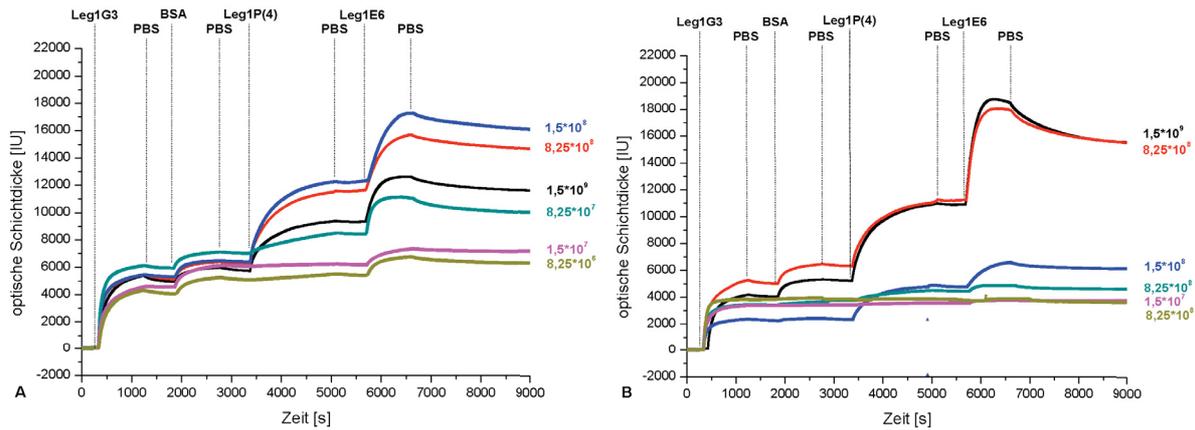
**4.1.5.7 Leg1P-Zellen (Charge 4): Leg1P(4)-Verdünnungsreihe mit Leg1G3 als fAK und Leg1E6 als dAK**

Aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts wurde eine weitere Leg1P-Verdünnungsreihe gemessen. Dazu wurde Leg1G3 als fAK und Leg1E6 als dAK verwendet. Die Leg1P-Zellen stammten aus der vierten Charge (Leg1P(4)). Die Abb. 4.45 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Messungen. Jede Konzentration der seriellen Verdünnungsreihe wurde zweimal gemessen. Insgesamt wurden zwölf Experimente durchgeführt (N=12). Die Immobilisierung des fAK fand in jedem Experiment unter gleichen Bedingungen statt, so dass der Mittelwert über die N=12 Messungen gebildet werden konnte. Die mittlere OSD nach der Immobilisierung des Antikörpers Leg1G3 am Ende der 600 s-Dissoziationsphase betrug 4290,83 IU (StDev=1019,44 IU) und die mittlere Steigung 70,13 IU/s (StDev=24,7 IU/s) (Tab. 4.12). Die Abb. 4.45 A und B zeigen für die beiden Sätze der Verdünnungsreihe sehr unterschiedliche Kurvenprofile.

**Tab. 4.12: Deskriptive Parameter bezüglich der Leg1G3-Immobilisierung (fAK):** OSD<sub>600</sub> – optische Schichtdicke am Ende der Dissoziations-Phase von 600 s; Steigung<sub>10</sub> – Steigung der Bindungskurven in den initialen 12 s; N – Anzahl der Daten; StDev – Standardabweichung; Min – minimaler Messwert; Max - maximaler Messwert; SPW – Spannweite (Max-Min).

	N	Mittelwert	StDev	Min	Max	SPW
<b>OSD<sub>600</sub> [IU]</b>	12	4290,83	1019,44	2197	5943	3746
<b>Steigung<sub>10</sub> [IU/s]</b>	12	70,14	24,7	32,95	117,55	84,6

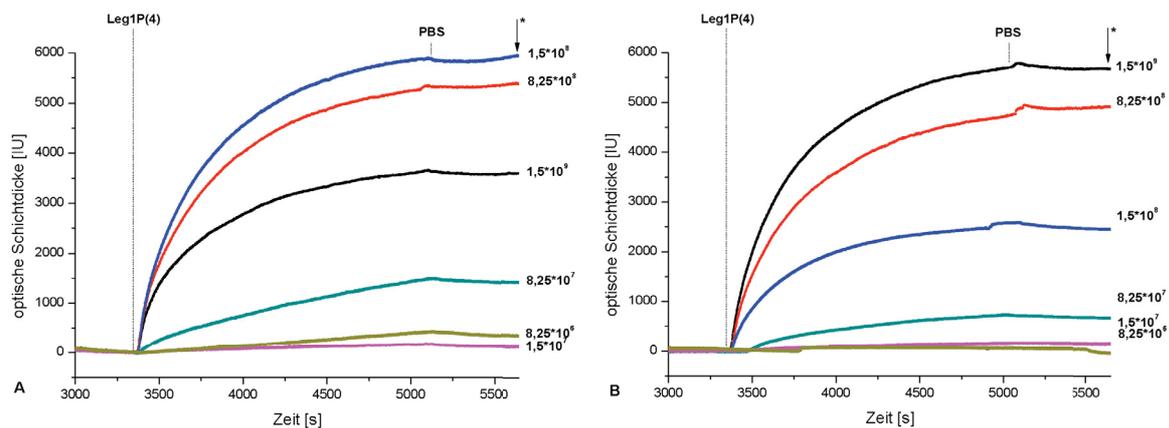
Um die Leg1P(4)-Bindekurven besser vergleichen zu können, werden sie in Abb. 4.46 A und B im Detail dargestellt. Die Bindungskurven in beiden Versuchsreihen decken in einem Konzentrationsbereich von  $8,25 \cdot 10^6$  Zellen/ml bis  $1,5 \cdot 10^9$  Zellen/ml einen Sensorsignalbereich bis etwa 6000 IU ab. In Abb. 4.47 sind die Steigungen der Kurven in den ersten 10 s der Bindungsphase und die OSD am Ende einer Dissoziationsphase von 600 s in halblogarithmischer Darstellung gegeben.



**Abb. 4.45: Vollständige Bindungskurven zu Leg1P(4)-Experimenten.**  
 A – 1. Versuchsreihe; B – 2. Versuchsreihe. Leg1G3 – fAK; BSA – Blockierer; Leg1P(4) – Leg1P-Zellen der 4. Charge; Leg1E6 – dAK

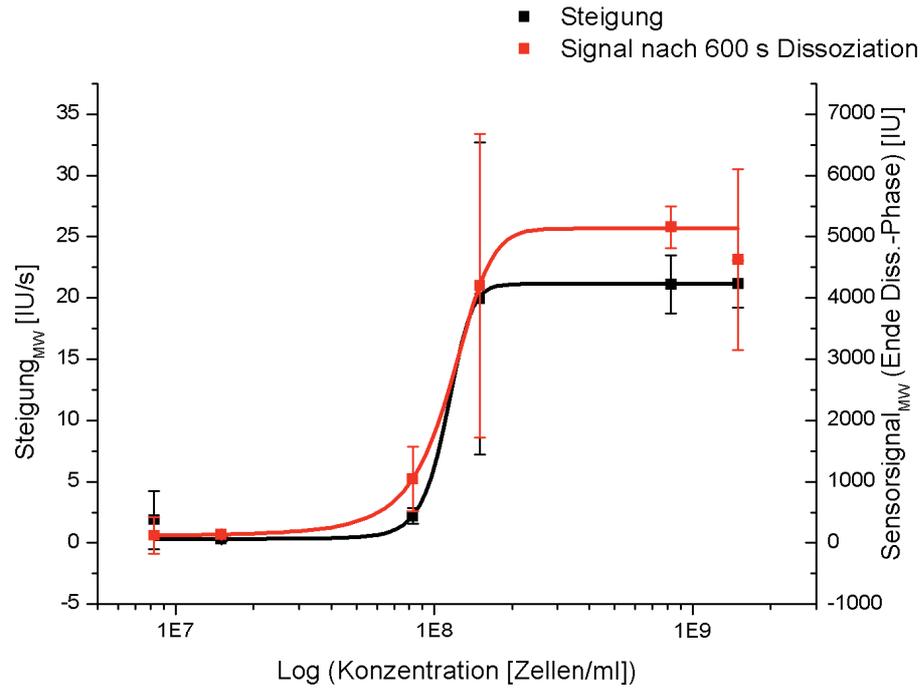


Wie Abb. 4.47 zu entnehmen ist, kann man auf die Daten sowohl im Fall der Steigungen als auch im Fall der OSD am Ende der Dissoziationsphase ein sigmoides Fitting-Model anwenden. Im Fall der OSD am Ende der Dissoziationsphase ergibt sich jedoch eine Art Treppensignal (rot), wobei die kleinsten Konzentrationen sogar negative Werte liefern. Die untere Nachweisgrenze kann demnach nur als  $<8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml angegeben werden und die obere als  $<1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Im Fall der Steigungen liegt die untere Nachweisgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml und die obere Nachweisgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml.



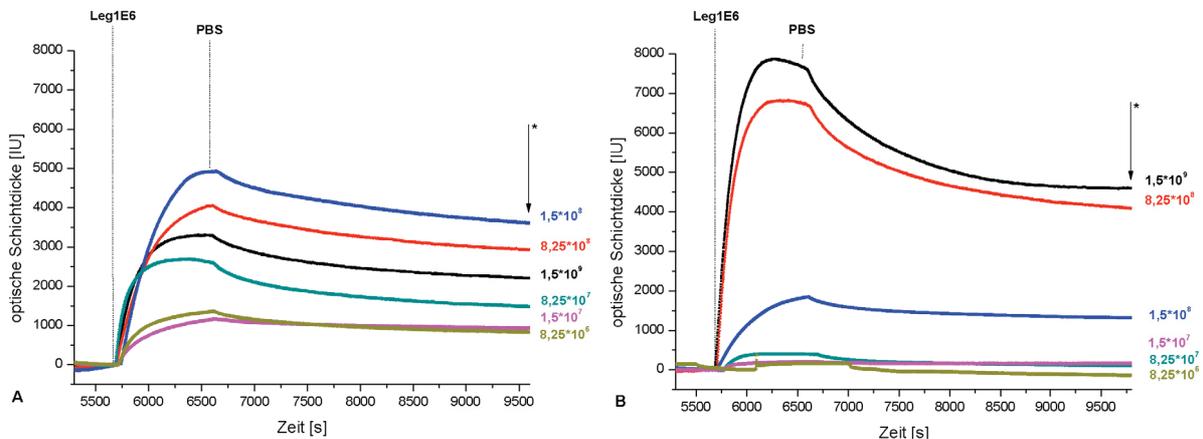
**Abb. 4.46: Detail der Leg1P(4)-Bindungskurven (aus Abb. 4.42 A und B).** A – 1. Versuchsreihe; B – 2. Versuchsreihe.  
 \* Ende der 600 s-Dissoziationsphase. (Werte zum Zeitpunkt der Injektion auf gleich „null“ gesetzt.)

Der dynamische Bereich, also der Bereich, in dem der Verlauf der Fitting-Kurve linear ist, fällt demnach sehr klein aus. Die Bestimmungsgrenzen liegen zwischen der oberen und der unteren Detektionsgrenze und markieren die Grenzen des dynamischen Bereichs.



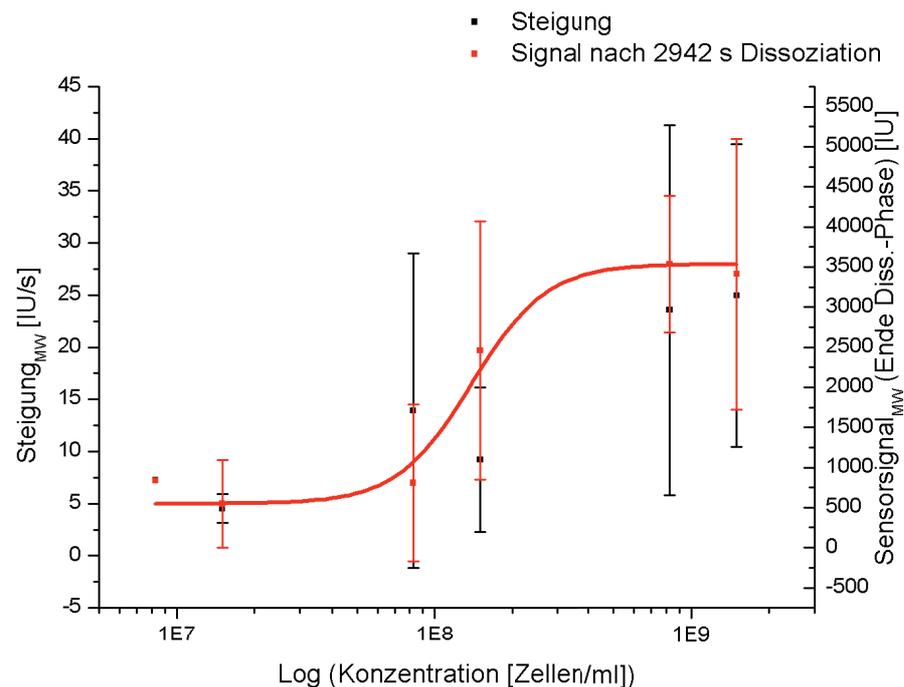
**Abb. 4.47: Mittlere Steigung der Leg1P(4)-Kurven vs. mittleres Sensorsignal am Endpunkt der Dissoziationsphase (halblogarithmische Darstellung):** schwarz – Steigungen der Bindungskurven in Abhängigkeit von Leg1P(4)-Konzentration; Fitting mit sigmoidem Fitting-Modell; rot – OSD am Ende der Dissoziationsphase (600 s) in Abhängigkeit von Leg1P(4)-Konzentration. MW – Mittelwerte (aus 2 Messungen).

Auch die Applikation von Leg1E6 ergab in beide Messreihen stark unterschiedliche Ergebnisse wie die Abb. 4.48 A und B zeigen. Bei der 1. Messreihe wurden OSD am Ende der Dissoziationsphase zwischen 1000 und 4000 IU gemessen. Im Fall der 2. Messreihe lagen die OSD zwischen 120 IU und 4600 IU. Bei der 2. Messreihe steigt die OSD folgerichtig mit steigender Zell-Konzentration. Für die Konzentrationen ab  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml sind die OSD im Vergleich zur 1. Messreihe sehr hoch ausgefallen während die Signale für  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml vergleichsweise niedrig ausfallen.



**Abb. 4.48: Detail der Leg1E6-Bindungskurven (aus Abb. 4.45 A und B).** A – 1. Versuchsreihe; B – 2. Versuchsreihe.  
\* Endpunkt der 2942 s-Dissoziationsphase. (Werte zum Zeitpunkt der Injektion auf gleich „null“ gesetzt.)

Das Verhalten der Signale in Abhängigkeit von der Konzentration der Leg1P(4)-Zellen ist in Abb. 4.49 in halblogarithmischer Darstellung abgebildet. Die Werte für die Steigungen ließen sich nicht gut sigmoid modellieren. Die Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase konnten sigmoid „gefittet“ werden. In der Abbildung sind die Mittelwerte aus beiden Messreihen dargestellt. Folgt man der Kurve, welche die OSD am Ende der Dissoziationsphase modelliert, wird eine untere Detektionsgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml nahegelegt und eine obere bei  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Ein linearer Bereich ergibt sich zwischen  $10^8$  und  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml.



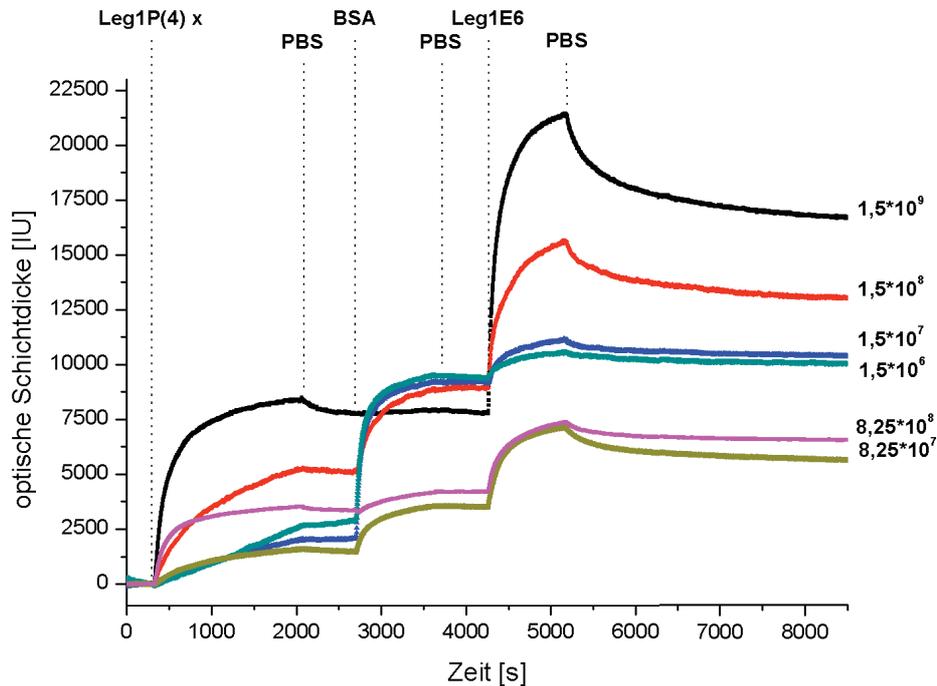
**Abb. 4.49: Mittlere Steigung der Leg1E6-Kurven vs. mittleres OSD am Endpunkt der Dissoziationsphase (halblogarithmische Darstellung):** schwarz – Steigungen der Bindungskurven in Abhängigkeit von Leg1P(4)-Konzentration; Fitting mit sigmoidem Fitting-Model; rot – OSD am Ende der Dissoziationsphase (600 s) in Abhängigkeit von Leg1P(4)-Konzentration. MW – Mittelwerte (aus 2 Messungen).

#### 4.1.5.8 Leg1P-Zellen (Charge 4): Leg1P(4)-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit Leg1E6 als dAK (DAF)

Mit den Zellen der Charge 4 wurde desweiteren eine Verdünnungsreihe auf einer OTS-OF durchgeführt. Ähnliche Experimente im Direct Assay Format wurden in Kapitel 4. 1.4 präsentiert. In jenen Experimenten sind Legionellen des Typs Leg1G (Zellen vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin des UKGM) verwendet worden. Eine Detektion konnte nicht durchgeführt werden, da kein passender dAK zur Verfügung stand. Die hier präsentierten Experimente wurden wie folgt durchgeführt: Nach 300 s Basislinienaufnahme wurden 150 µl Leg1P(4)-Zellen unterschiedlicher Konzentration auf eine freie OTS-OF appliziert. Darauf folgte nach 600 s Dissoziation die Injektion von BSA (500 µg/ml, 80 µl) und schließlich nach weiteren 600 s Dissoziation die Injektion von Leg1E6 (100 µg/ml, 80 µl) als dAK.

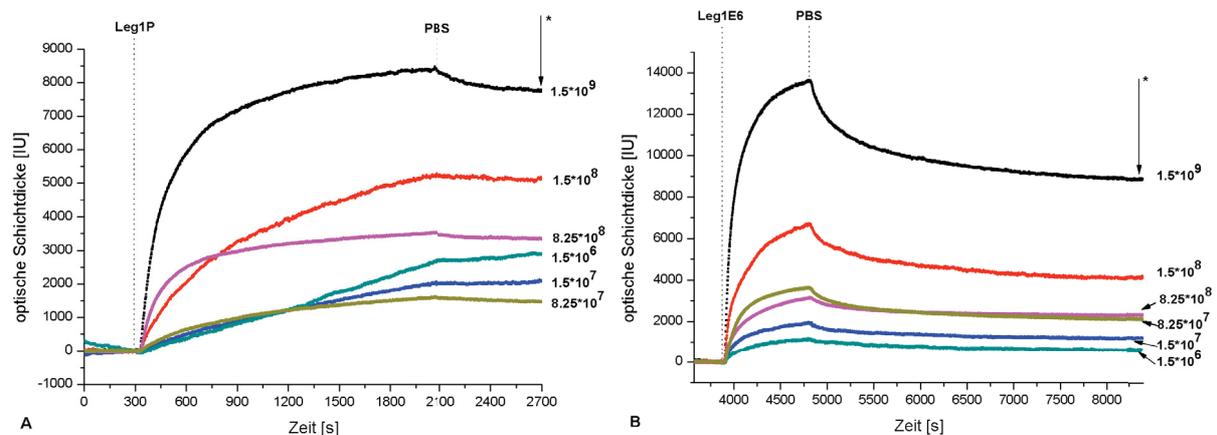
## 4 | ERGEBNISSE

Die resultierenden Bindungskurven sind in Abb. 4.50 dargestellt. Die Abbildungen 4.51 A und B zeigen die Detail der Leg1P(4)- bzw. Leg1E6-Bindungskurven.



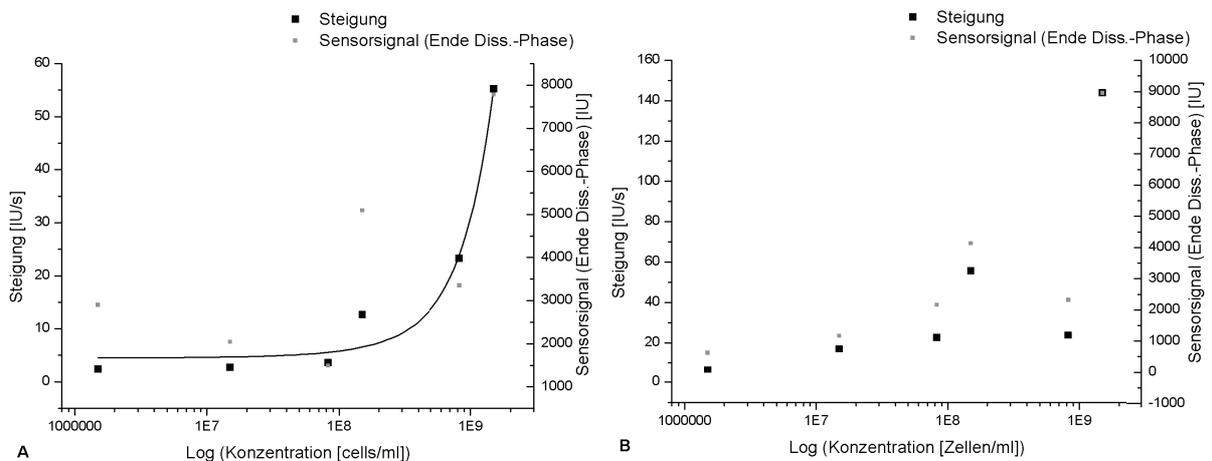
**Abb. 4.50: Vollständige Bindungskurven der Experimente im DAF mit Leg1P-Zellen der 4. Charge und Leg1E6 als dAK:** Leg1P(4) x – Leg1P-Zellen der 4. Charge von unterschiedlicher Konzentration; BSA – Blockierer; Leg1E6 – dAK; Zellkonzentrationen in Zellen/ml angegeben am linken Rand.

Aus den Detail-Abbildung 4.51 A geht schon hervor, was in der halblogarithmischen Darstellung der Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase gegen die Zellkonzentration deutlich wird (Abb. 4.52 A): Die Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase sind in keinen Zusammenhang zu bringen mit der Konzentration zu bringen, der es erlauben würde, ein sigmoides Model zum Fitting zu verwenden.



**Abb. 4.51: Bindungskurven-Details der Experimente:** A) Detail der Bindungskurven nach Leg1P(4)-Immobilisierung. B) Detail der Bindungskurven nach Leg1E6-Injektion; Zellkonzentrationen in Zellen/ml angegeben am linken Rand. \* Ende der Dissoziationsphase.

Die Steigungen dagegen entwickeln sich plausibel, d.h. höhere Konzentrationen führen zu größeren Steigungen in der Anfangsphase der Dissoziation. Die Steigungen konnten somit in einen sigmoiden Zusammenhang gebracht werden. Demnach liegt die Nachweisgrenze bei  $10^8$  Zellen/ml. Im Fall des Detektionsantikörpers entwickeln sich sowohl die Steigungen als auch die Signale am Ende der Dissoziationsphase (3200 s) zunächst wie erwartet. Die Konzentration von  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml fällt aber deutlich zu niedrig aus. In einem Kontrollexperiment wurde das entsprechende Signal jedoch bestätigt. Daher konnten weder die Steigungen noch die Signale am Ende der Dissoziationsphase in einen sigmoiden Zusammenhang gebracht werden.



**Abb. 4.52: Halblogarithmische Auftragung der Steigungen bzw. Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase gegen die Zellkonzentration:** A) Semilogplot bzgl. Leg1P(4)-Immobilisierung. B) Semilogplot bzgl. der Leg1E6-Detektion.

#### 4.1.6 Experimente mit Lektinen als Fänger oder Detektor für Legionellen-Zellen

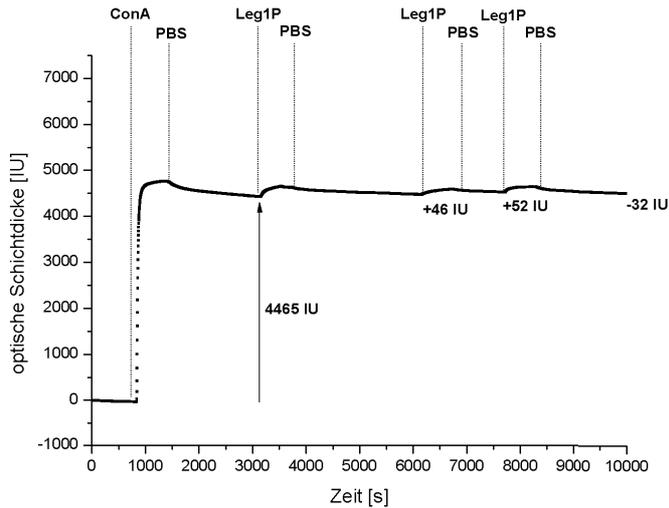
In den folgenden Experimenten wurden Lektine als Fänger verwendet, die im Sandwich-Assay den fAK ersetzen sollten. Lektine reagieren manchmal spezifisch mit den Polysaccharid-Anteilen von Bakterien-LPS (Slifkin & Doyle, 1990). Es sollte getestet werden, ob der Einsatz von Lektinen als Fänger bessere Ergebnisse liefert als es beim Einsatz von Antikörpern der Fall ist.

##### 4.1.6.1 Lektine als Ersatz für Fängerantikörper

###### 4.1.6.1.1 ConA als Fänger von Leg1P(1)-Zellen

Zunächst wurde ConA als Fänger verwendet. Die Abb. 4.53 zeigt die Ergebnisse eines Experiments, im Zuge dessen als erstes ConA (50 µl, 100 µg/ml) gefolgt von BSA (50 µl, 50 µg/ml) appliziert worden ist, gefolgt von drei Injektionen von Leg1P(1)-Zellen (je 50 µl,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml).

## 4 | ERGEBNISSE

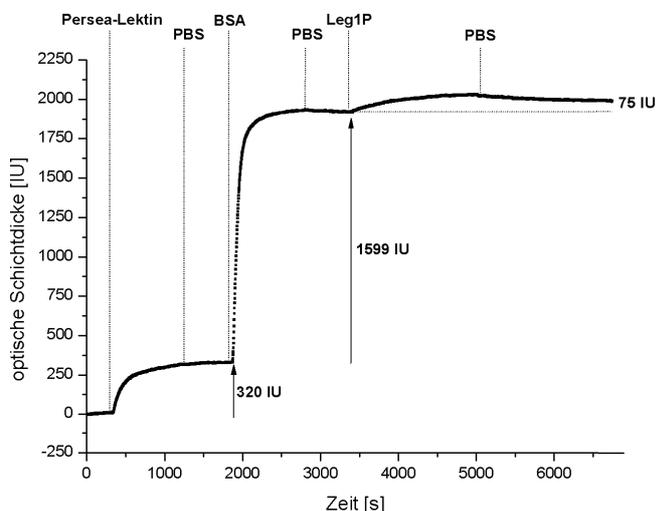


**Abb. 4.53: ConA als „Fänger“ von Leg1P-Zellen:** ConA – Lektin als Fängerprotein; Leg1P – Leg1P-Zellen.

Die ConA-Applikation lieferte ein Signal von 4465 IU. Die drei Leg1P(1)-Injektionen dagegen führten in den ersten beiden Injektionen zu einem OSD-Anstieg von 46 IU bzw. 52 IU und bei der letzten Injektion zu einer OSD-Abnahme von 32 IU.

### 4.1.6.1.2 Persea-Lektin als Fänger von Leg1P(1)

Außerdem wurde ein *Persea americana*-Lektin getestet, das Doyle et. al. zufolge *L. pneumophila*-Zellen der Serogruppe 1, Stamm Philadelphia, binden kann (Doyle et al., 1982). Der Immobilisierung des *Persea*-Lektins (80  $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml) folgte die Blockierung eventuell noch freier Bindestellen mit BSA (80  $\mu$ l, 500  $\mu$ g/ml). Danach wurde eine Probe Leg1P(1)-Zellen injiziert (150  $\mu$ l,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml). Abb. 4.54 zeigt das entsprechende Sensorgramm. Bei dem Experiment kam es zwischen 5000 s und 5500 s zu einem Signalsprung, welcher manuell korrigiert worden ist. Das Originalsensorgramm ist als Bild im Bild in die korrigierte Darstellung des Sensorgramms eingefügt worden.

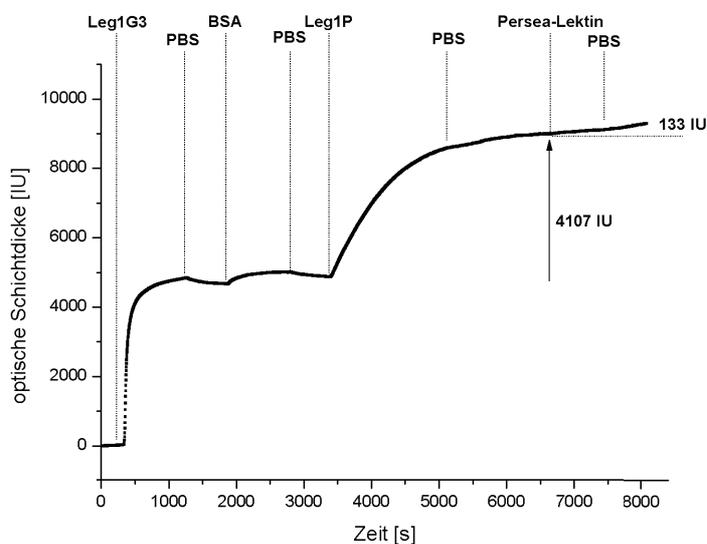


**Abb. 4.54: *Persea*-Lektin als „Fänger“ von Leg1P-Zellen (korrigiert):** *Persea*-Lektin – Fängerprotein; BSA - Blockierer; Leg1P – Leg1P-Zellen (Charge 1); Artefakt korrigiert (s. Anhang).

Die *Persea*-Lektin-Immobilisierung ergibt ein Signal von 320 IU. BSA führte zu einem weiteren Anstieg um 1599 IU. Die Injektion der Zellen führte zu einem weiteren Ansteigen des Signals um 75 IU.

#### 4.1.6.2.1 *Persea*-Lektin als Ersatz für Detektionsantikörper

Das *Persea*-Lektin wurde auch als Ersatz für einen dAK getestet. In diesem Experiment wurde Leg1G3 (80 µl, 100 µg/ml) und anschließend BSA (80 µl, 50 µg/ml) injiziert. Dann wurden Leg1P(1)-Zellen (150 µl,  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) injiziert und letztlich das *Persea*-Lektin (80 µl, 100 µg/ml). Das dazugehörige Sensorgramm zeigt Abb. 4.55.



**Abb. 4.55: *Persea*-Lektin als „Detektor“ von Leg1P-Zellen:** Leg1G3 – fAK; BSA - Blockierer; Leg1P – Leg1P-Zellen (Charge 1); *Persea*-Lektin – Detektionsprotein;

Während der *Persea*-Lektin-Assoziationsphase stieg das Signal um 133 IU an. In der darauf folgenden Dissoziationsphase kam es zu einem weiteren leichten Anstieg.

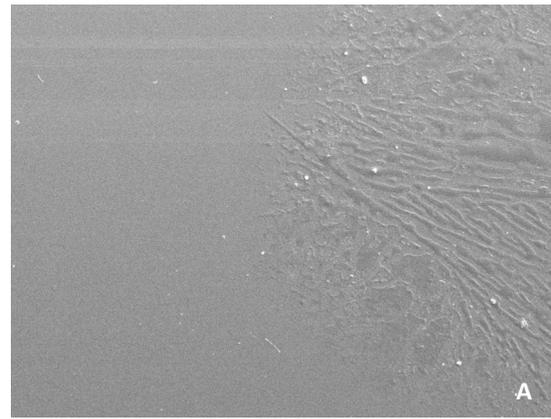
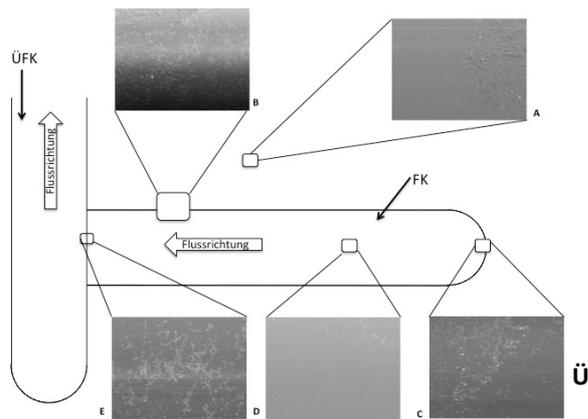
#### 4.1.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Chips mit immobilisierten Legionellen (SAF)

Bisher wurde über Experimente berichtet, bei denen mittels verschiedener Strategien ganze Zellen (*L. pneumophila*) auf Glaschips immobilisiert worden sein sollen. Bisher fehlten jedoch Nachweise, dass es tatsächlich ganze Zellen sind, die auf der Oberfläche gebunden werden. Zu diesem Zweck wurden Kontrollexperimente mittels Rasterelektronenmikroskopie REM durchgeführt, welche zeigen sollten, ob das der Fall ist oder nicht. Die REM-Aufnahmen wurden nach dem Biosensor-Experimenten freundlicherweise von Boris Strehlow (AK Bakowsky, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Philipps-Universität Marburg) gemacht.

### 4.1.7.1 Sandwich Assay Format mit Leg1P(4) Zellen und Leg1G3 als fAK

Für das Experiment wurde auf einem OTS-Chip der Fängerantikörper Leg1G3 immobilisiert (80 µl, 50 µg/ml), danach mit BSA (80 µl, 50 µg/ml) blockiert und anschließend Leg1P-Zellen der vierten Charge (150 µl,  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml) appliziert. Zum Schluss wurde der Detektionsantikörper Leg1E6 (80 µl, 50 µg/ml) injiziert und anschließend das „Sandwich“ für 2942 s der Dissoziation überlassen. Nach dem Biosensorexperiment wurde der Chip dem Gerät entnommen. Auf der Oberfläche ist dort, wo durch die Flusszelle der Flusskanal zu liegen kommt, ein Streifen Flüssigkeit zu erkennen. Auf diesem Streifen wurden während des Experiments Proteine immobilisiert und vermutlich auch Zellen immobilisiert. Dadurch wird der Chip an diesen Stellen hydrophil, während alle anderen Chipbereiche hydrophob bleiben. Die Kontur des Flüssigkeitsstreifens wurde auf der Rückseite des Chips mit einem dünnen Stift nachgezeichnet, damit auf den Ort der Immobilisierungen nach dem Trocknen zugegriffen werden konnte. Innerhalb dieser Markierung wurden mittels REM einige Aufnahmen gemacht. Abbildung 4.56 Ü zeigt eine Übersicht des Kanals und der Orte an denen REM-Bilder aufgenommen worden sind. Bildausschnitt A zeigt eine Stelle, die im Experiment außerhalb des Flusskanals lag (Kontrollaufnahme). Die Bilder B und C wurden am Übergang des durch den Kanal definierten Immobilisierungsbereich und dem Bereich aufgenommen, der von den Immobilisierungen durch die Begrenzung durch die Flusszelle nicht betroffen war. Die Ausschnitte D und E betreffen Stellen, die sich mittig innerhalb des Flusskanals befanden. Alle Bilder sind in den Abbildungen 5.56 A-E in größerer Ausführung dargestellt.

Wie in Abb. 5.56 A zu erkennen ist, ist die OF außerhalb der vom Flusskanal definierten OF so gut wie frei von Zellen. Zwei Strukturen sind zu erkennen, die wie Zellen aussehen: oben, links und unten in der Mitte. Abb. 5.56 B ist in der Nähe des rechten Randes der Flusszellenbegrenzung (in Flussrichtung) aufgenommen worden. An dieser Stelle liegen etliche fädchenartige Strukturen von bis zu 20 µm Länge vor. Gerade im unteren Teil des Bildes besitzen sie eine deutliche Links-/Rechts-Ausrichtung. Abb. C zeigt die Situation an der rechten Spitze des Flusskanals. Auch hier liegen diese Strukturen vor, allerdings weniger geordnet. Auf der rechten Seite im Bild werden die Zellen immer weniger. Abb. D zeigt einen Ausschnitt aus der Mitte des Flusskanals. Hier liegen kaum Zellen vor. Abb. E dagegen ist sehr weit rechts im Flusskanal in der Mitte aufgenommen worden. Hier liegen viele dieser Strukturen vor, die kleine häufchenartige Ansammlungen bilden. Abbildung 5.57 A zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 5.56 C. Man erkennt, dass die Strukturen sich teilweise überlappen. Größere Bereiche der OF sind nicht mit Zellen bedeckt. Außerdem scheinen auch andere Partikel auf der OF vorzukommen, was sich auch in Abb. 5.56 C schon zeigte. Von Abb. 5.56 D liegt ebenfalls ein vergrößerter Ausschnitt vor. Man erkennt, dass sich in D am unteren Rand einige Strukturen abzeichnen. Wegen der 50x-Vergrößerung lassen sie sich schlecht erkennen. Abb. 5.57 B zeigt eine 300x-Vergrößerung dieser Region. Auch hier liegen die gleichen Strukturen vor.



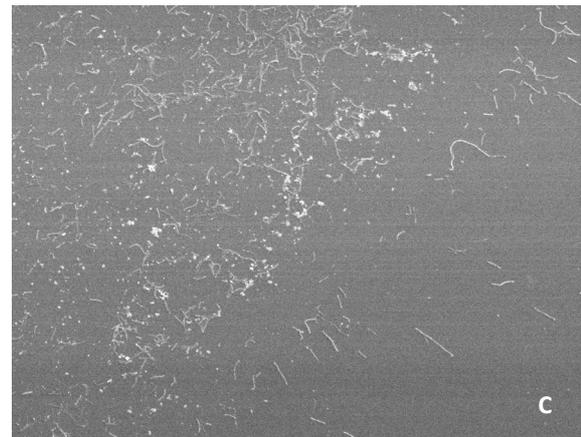
16.12.13 Chip Legionellen Außen 600x 5kV

40 µm



16.12.13 Chip Legionellen Rechts 600x 5kV

40 µm



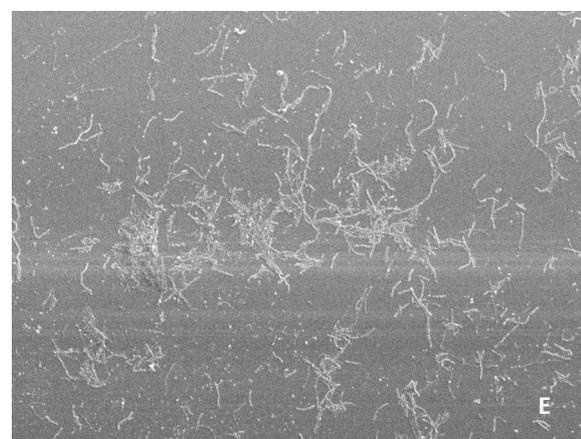
16.12.13 Chip Legionellen UBoden 600x 5kV

40 µm



16.12.13 Chip Legionellen UMitte 50x 5kV

500 µm

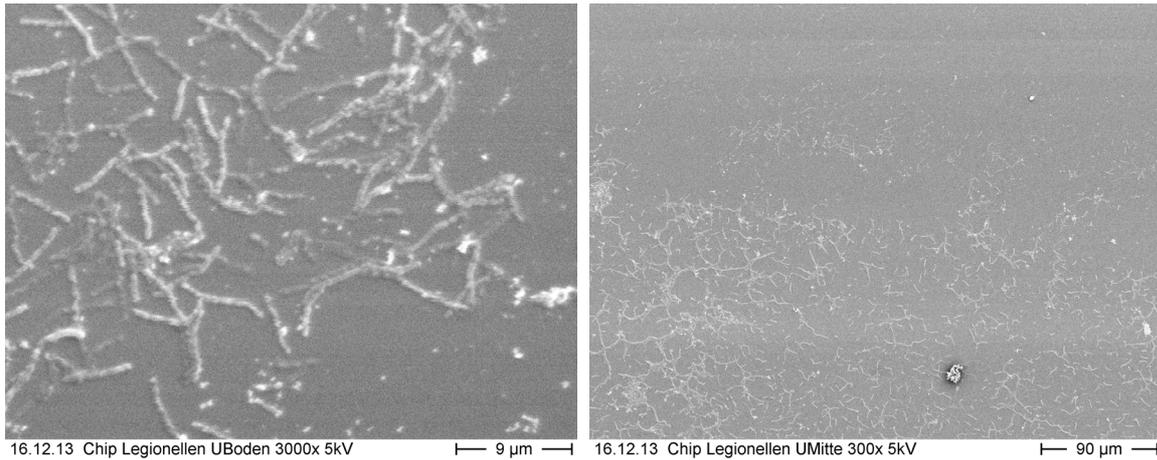


16.12.13 Chip Legionellen USpitze 800x 5kV

30 µm

**Abb. 4.56: REM-Aufnahmen von Oberfläche mit im Sandwich-Assay-Format immobilisierten Zellen:** Ü – topografisch Übersicht über den Flusskanal; FK=Flusskanal; ÜFK=überkreuzender Flusskanal (FK von vorhergehendem Experiment → Chip wurde nach dem Experiment um 90 ° gedreht). A – außerhalb des FK (Kontrolle). B – am rechten Rand (in Flussrichtung); C – am Anfang des FK; D – in der Mitte des FK; E – am Ende des FK Rand;

Anhand der Abb. 4.57 A wurde die Länge der Zellen bestimmt. Dazu wurden nur Zellen herangezogen, deren Zellkörper gut von anderen Zellkörpern zu unterscheiden waren. Der Stichprobenumfang beträgt N=15 Zellen. Es wurde eine Länge von durchschnittlich 5 µm festgestellt. Nur 13,3 % der Zellen sind kleiner oder gleich 3 µm lang.



**Abb. 4.57: Details der Abbildungen 4.56 C und D.** A – vergrößerter Bereich aus Abb. 4.53 C; B – vergrößerter Bereich aus Abb. 4.53 D.

#### 4.1.7.2 Sandwich Assay Format mit Leg1P(1) Zellen und AK237744 als fAK

Auch wurden REM-Bilder von Leg1P(1)-Zellen (also Zellen der 1. Charge) auf einer OF aufgenommen. Die OF wurde zunächst im BIAffinity mit AK237744 (50 µg/ml, 80 µl) ausgestattet und mit BSA (50 µg/ml, 80 µl) blockiert. Darauf folgte die Injektion von Leg1P(1)-Zellen ( $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml, 150 µl). Die Abb. 5.58 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Bereichs, der im Flusskanal nahe der Mitte liegt.

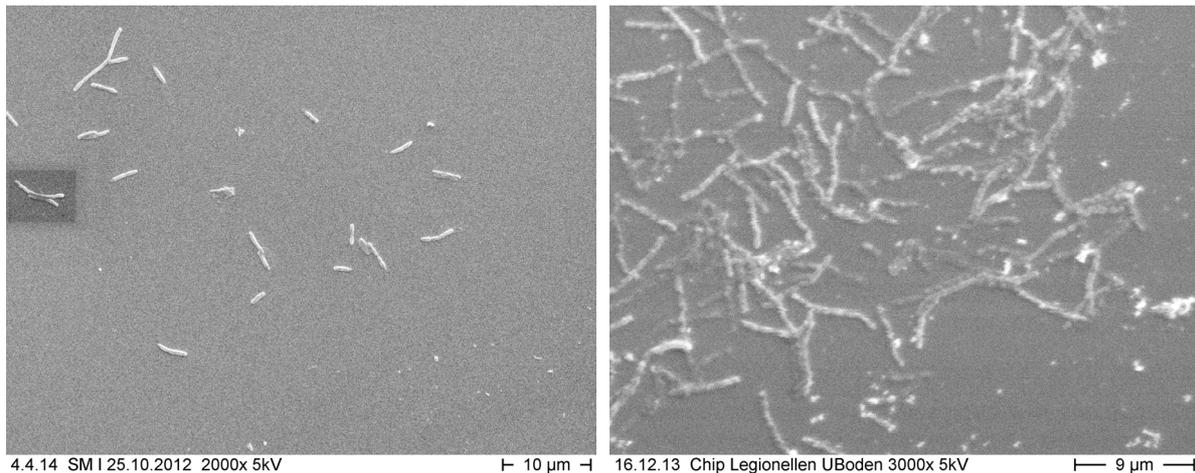


**Abb. 4.58: REM-Aufnahme einer Oberfläche mit Leg1P(1)-Zellen.** Die Zellen wurden auf eine mit AK237744 ausgestattete und anschließend mit BSA behan-

Es sind Zellen zu erkennen, jedoch ist die Dichte nicht sehr hoch. Außerdem scheinen die Zellen deutlich kleiner zu sein als jene der Charge 4.

**4.1.7.3 Vergleich der Zellgrößen von Leg1P(1) und Leg1P(4)**

Anhand der Abb. 4.59 wurden die Längen der Leg1P(1)- und Leg1P(4)-Zellen bestimmt.



**Abb. 4.59: REM-Aufnahmen mit deren Hilfe die Länge der Zellen bestimmt worden ist.** Links – zur Längen-Bestimmung von Leg1P(1)-Zellen. Rechts - zur Längen-Bestimmung von Leg1P(1)-Zellen.

Die Bestimmung ergab für die durchschnittliche Länge von Leg1P(1)-Zellen einen Wert von 3 µm, wobei 65 % der Zellen weniger oder gleich 3 µm lang waren. Für Leg1P(4)-Zellen betrug der entsprechende Durchschnittswert 5 µm, wobei 13,3 % der Zellen weniger oder gleich 3 µm lang waren. In Tab. 4.13 sind einige deskriptive Parameter zusammengefasst.

**Tab. 4.13: Parameter bezüglich der Zelllängen-Bestimmung.** Leg1P(1) – L. pneumophila SG1, Philadelphia der 1. Charge (FzmB); Leg1P(4) – L. pneumophila SG1, Philadelphia der 4. Charge (FzmB); MW – Mittelwert der bestimmten Zelllängen; StDev – Standardabweichung; Min - Minimum; Max – Maximum; ≤ 3 µm – Anzahl der Zellen in Prozent, die weniger oder gleich 3 µm lang sind; > 3 µm - Anzahl der Zellen in Prozent, die größer

3 µm sind.	N	MW [µm]	StDev [µm]	Min [µm]	Max [µm]	≤ 3 µm	> 3 µm
<b>Leg1P(1)</b>	20	3	1	2	6	65 %	35 %
<b>Leg1P(4)</b>	15	5	1,5	2,2	7,2	13,3 %	86,7 %

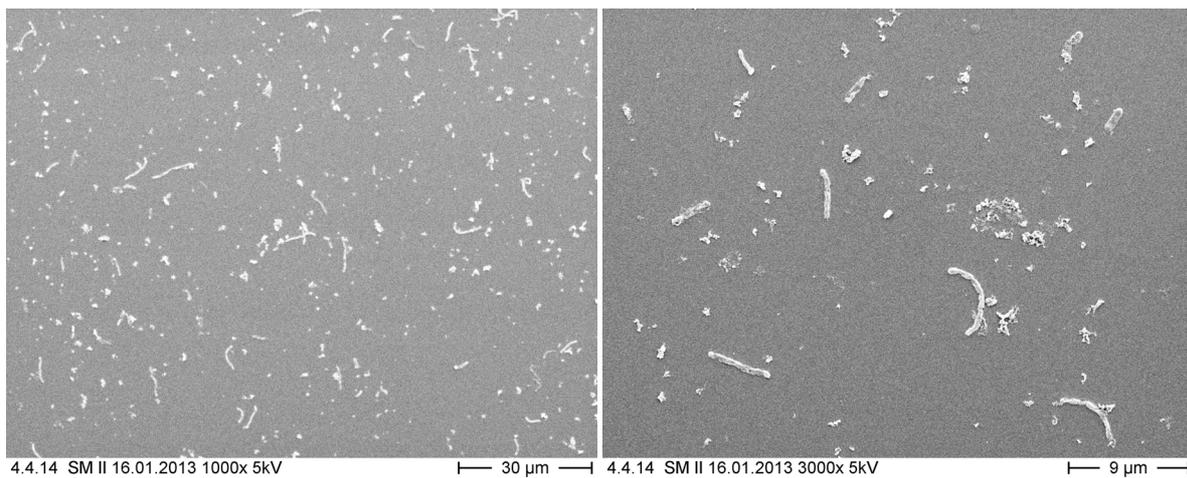
Die Häufigkeit von vorgefundenen Zell-Längen für verschiedene Intervalle ist in Tab. 4.14 dargestellt. Zellen, deren Dimensionen von einer oberen Intervallgrenze getroffen werden, sind noch in das entsprechende Intervall eingeschlossen worden.

**Tab. 4.14: Häufigkeit der gefundenen Längen in einem Intervall von 1  $\mu\text{m}$ .** Zellen, deren Länge die obere Intervall-Grenze trifft, wurden in das entsprechende Intervall eingeschlossen.

	1-2 $\mu\text{m}$	2-3 $\mu\text{m}$	3-4 $\mu\text{m}$	4-5 $\mu\text{m}$	5-6 $\mu\text{m}$	6-7 $\mu\text{m}$	7-8 $\mu\text{m}$
<b>Leg1P(1)</b>	2	11	5	1	1	0	0
<b>Leg1P(4)</b>	0	2	3	3	3	2	2

#### 4.1.7.4 Direct Assay Format mit Leg1P(1) Zellen

Es wurden auch Aufnahmen von einer OF gemacht, auf der Leg1P(4)-Zellen ( $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml, 150  $\mu\text{l}$ ) im RfS-Experiment im Direct Assay Format immobilisiert worden sind. Abbildung 4.60 zeigt die entsprechenden Aufnahmen.



**Abb. 4.60: Leg1P(4)-Zellen im Direct-Assay-Format immobilisiert auf einer freien OTS-OF.**

Auf den Bildern sind neben einigen Zellen auch sehr viele andere Strukturen zu erkennen, die auf den Bildern zu den Experimenten im Sandwich Assay Format nicht auftraten.

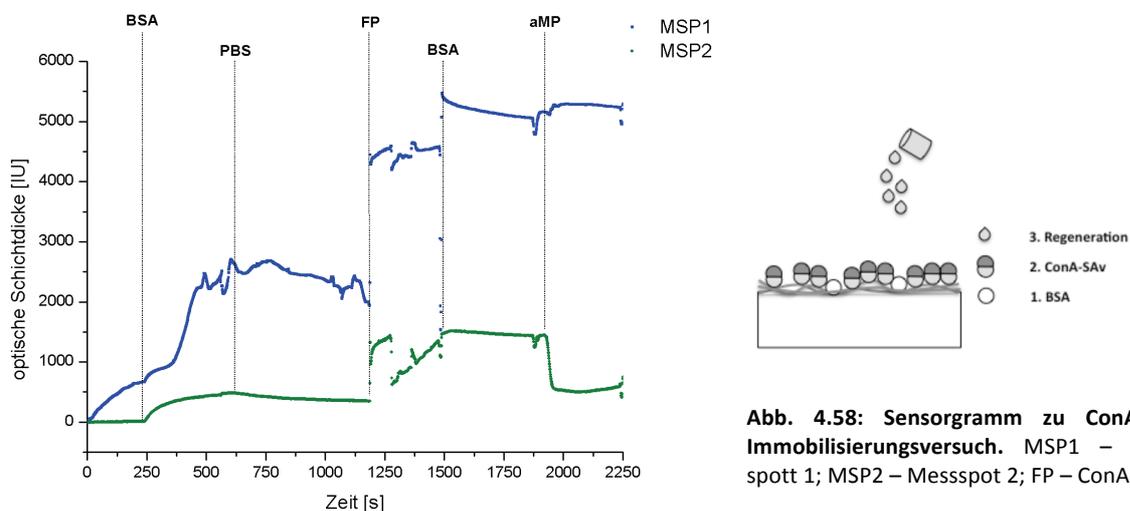
## 4.2 Experimente mit dem rekombinanten Fusionsprotein ConA-SAv auf Mannan-OF

### 4.2.1 Ergebnisse FP-Mannan-Experimente (RIFS)

#### 4.2.1.1. Mannan I: Mannan-Funktionalisierung nach Hartmann und Vornholt

Die Experimente, die in diesem Kapitel präsentiert werden, wurden auf Sensorchips durchgeführt, die zuvor gemäß dem Protokoll funktionalisiert worden sind, welche in den Dissertationen von Markus Hartmann und Wolfgang Vornholt dargelegt sind. Hartmann arbeitete auf Mikroskopierdeckgläschen mit Spektralphaseninterferenz-Spektroskopie (SPI) und Vornholt auf Goldprismen mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR). Das verwendete Protokoll wurde auf die Sensorchips von Analytik Jena übertragen.

Da es in den Experimenten zu vielfältigen Problemen kam, wird an dieser Stelle eine Auswahl an Experimenten vorgestellt, die beispielhaft für die Vielfalt der festgestellten Phänomene sind. So wurde ein Mannanchip eingelegt und ein erster Versuch mit dem ConA-SAv-FP in PBS-Puffer pH 7,3 unternommen. Zunächst wurde mit 40 µl BSA (2000 µg/ml) blockiert, um unspezifische Bindestellen zu minimieren. Danach wurden 30 µl des ConA-SAv-FP (50 µg/ml) appliziert und letztlich 35 µl α-Methylmannopyranosid (=aMP) (10% in PBS pH 7,3). Das Resultat ist in Abb. 4.58 dargestellt.

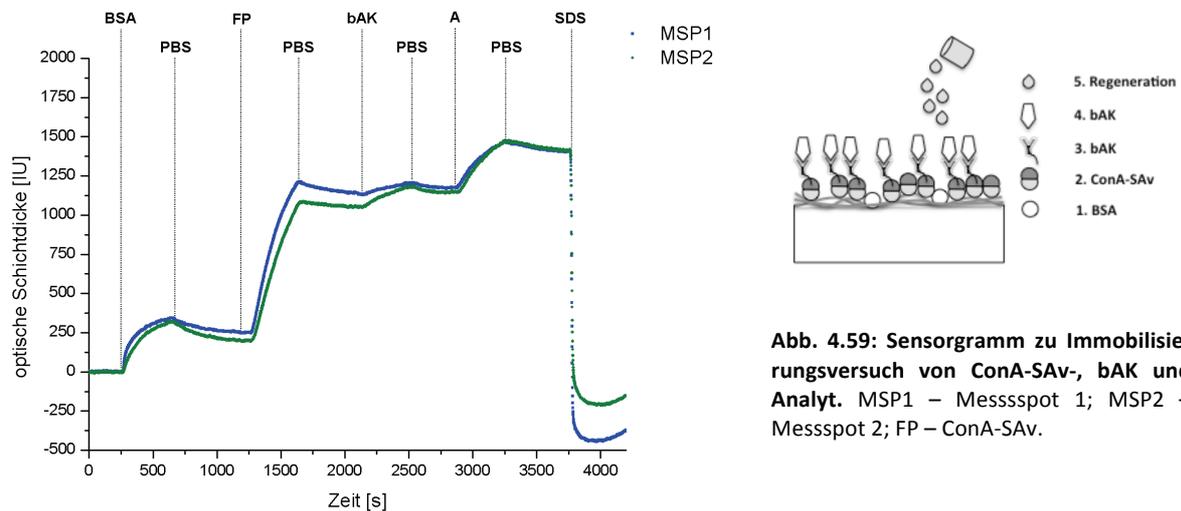


**Abb. 4.58:** Sensorgramm zu ConA-SAv-Immobilisierungsversuch. MSP1 – Messspott 1; MSP2 – Messspott 2; FP – ConA-SAv.

BSA führt unter Messspott 2 (MSP2) zu einem Signalanstieg von 337 IU. Unter MSP1 kommt es zu einem unerwarteten Verlauf, für den keine sinnvolle Interpretation möglich ist. Nach ConA-SAv-Injektion kommt es zu einem weiteren Anstieg um 1107 IU. Der Verlauf wird jedoch von einem Artefakt bei 1300 s unterbrochen, setzt aber den Anstieg kurz darauf fort. Wie hoch das Signal unter normalen Umständen ausgefallen wäre, ist nicht ganz klar. Das Signal steigt nach dem „Signaleinbruch“ bis zum Ende der Injektion noch um weitere 840 IU an, so dass man einen Gesamtanstieg von 1940 IU annehmen kann. Injektion von aMP führt zu einer Regeneration von 48,8%.

## 4 | ERGEBNISSE

Der Chip wurde anschließend mit 2% SDS behandelt, um die Proteine von der OF zu entfernen. Danach wurde ein Proof of Principle-Experiment durchgeführt, welches zeigen sollte, dass sich durch ConA-SAv auf Mannan immobilisiert, ein biotinylierter Antikörper immobilisieren lässt, der wiederum einen Analyten bindet. Das Gesamtkonstrukt sollte wieder durch aMP von der OF entfernt werden. Auch hier wurde zunächst mit 40 µl BSA (2000 µg/ml) blockiert und danach 30 µl des ConA-SAv-FP (50 µg/ml) appliziert. Außerdem wurden 30 µl eines biotinylierten primären Antikörpers (50 µg/ml) (anti-IgG b-Antikörper) und eines Analyten (50 µg/ml) (anti-Ig-fraction Antikörper), der in diesem Fall aus einem primären Antikörper bestand, injiziert. Der biotinylierte Sekundärantikörper und der als Analyt gewählte Primärantikörper wurden vom Hersteller als komplementäres Antigen-Antikörperpaar deklariert. Letztlich wurde mit 35 µl SDS (2%, in PBS pH 7,3) regeneriert. Das Resultat ist in Abb. 4.59 dargestellt.



**Abb. 4.59:** Sensorgramm zu Immobilisierungsversuch von ConA-SAv-, bAK und Analyt. MSP1 – Messspot 1; MSP2 – Messspot 2; FP – ConA-SAv.

Die Passivierung mittels BSA ergibt unter beiden Messspots ein Signal von 250 IU bzw. 205 IU. Die Immobilisierung von ConA-SAv ergibt am Ende der Dissoziationsphase einen weiteren Signalanstieg von 879 IU bzw. 851 IU, die Immobilisierung von bAK einen Signalanstieg um 45 IU bzw. 96 IU und die Zugabe des Analyten um 227 IU bzw. 264 IU. Die Regeneration mit SDS fällt zu 131,4% bzw. 115% aus.

Nun wurde auf der gleichen Oberfläche ein ganzer Zyklus von Experimenten durchgeführt. Nach einer Regeneration mit SDS wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben zunächst BSA (2000 µg/ml) immobilisiert und anschließend ConA-SAv-FP einer bestimmten Konzentration. Danach wurde wieder mit SDS regeneriert, so dass ein weiteres Experiment des gleichen Musters mit anderer ConA-SAv - Konzentration erfolgen konnte. Abbildung 4.60 zeigt sämtliche Bindekurven, die unter Messspot 2 aufgenommen worden sind, in einer einzigen Darstellung.

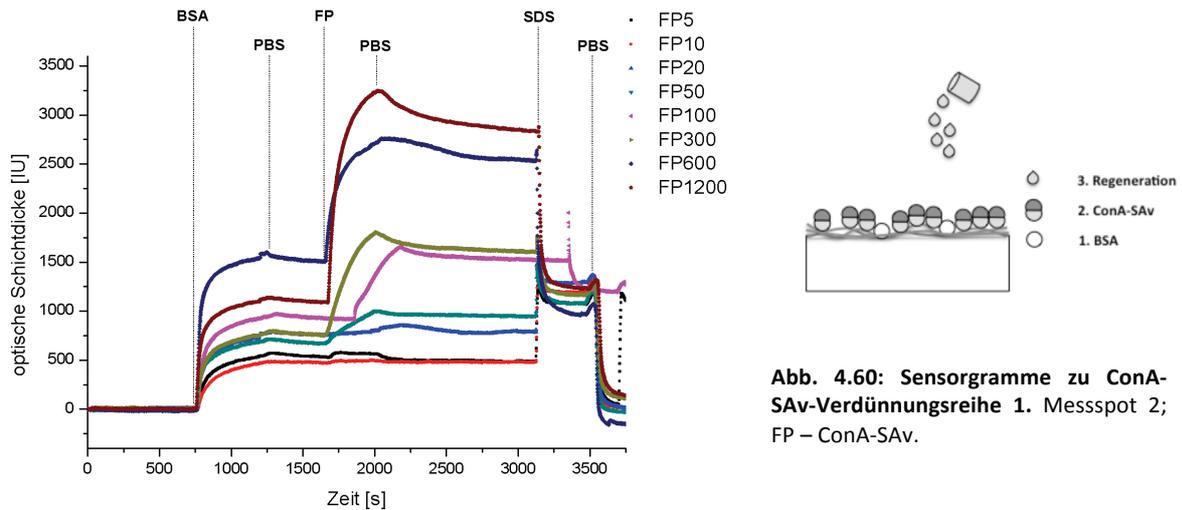


Abb. 4.60: Sensorgramme zu ConA-SAv-Verdünnungsreihe 1. Messspot 2; FP – ConA-SAv.

Die BSA-Signale und die ConA-SAv-Signale am Ende der jeweiligen Dissoziationsphasen (BSA: 360 s; FP: 1080 s) werden in Abb. 4.61 A in einer halblogarithmischen Auftragung gegen die ConA-SAv - Konzentrationen dargestellt und in Abb. 4.461 B in der Reihenfolge, in der die Experimente durchgeführt worden sind.

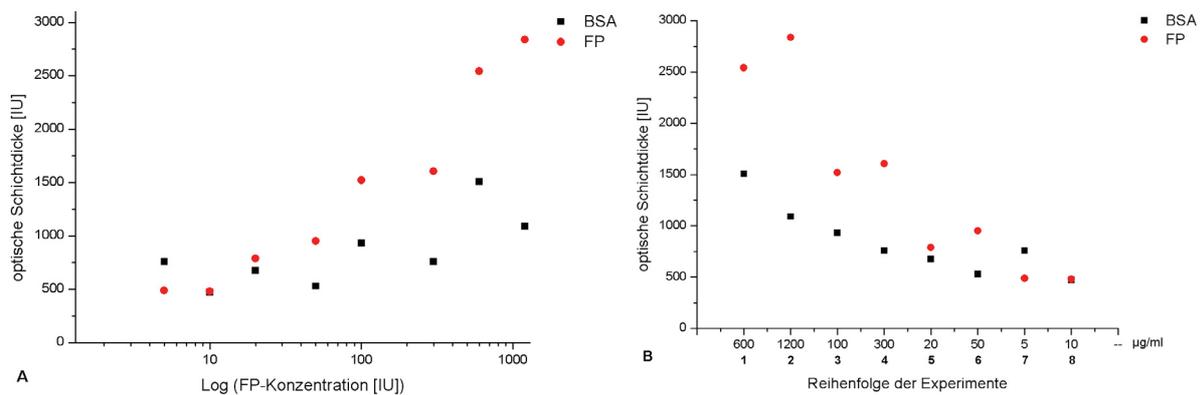
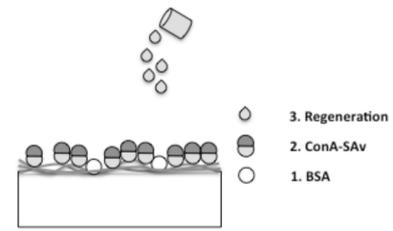
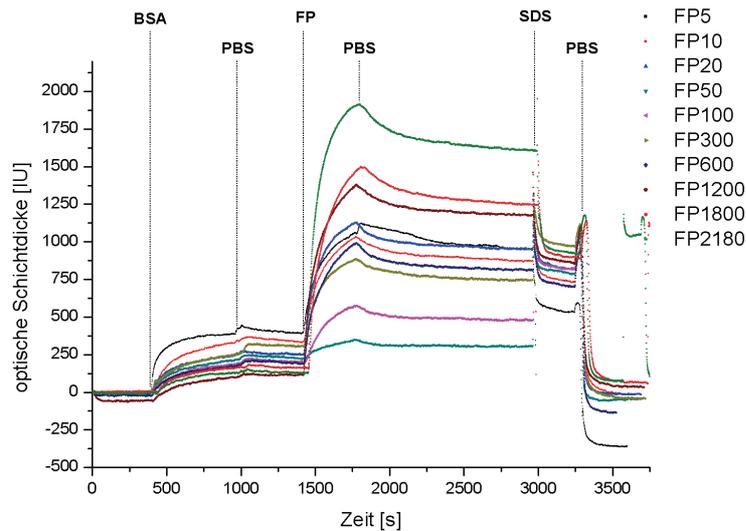


Abb. 4.61: Auswertung der optischen Schichtdicken in ConA-SAv-Verdünnungsreihe 1. BSA - je 2000 µg/ml; ConA-SAv - verschiedene Konzentrationen; Regeneration - SDS(2%). A) Halblogarithmische Auftragung der optischen Schichtdicken von ConA-SAv und BSA. B) Auftragung der BSA- und ConA-SAv-Messwerte in der Reihenfolge der durchgeführten Experimente.

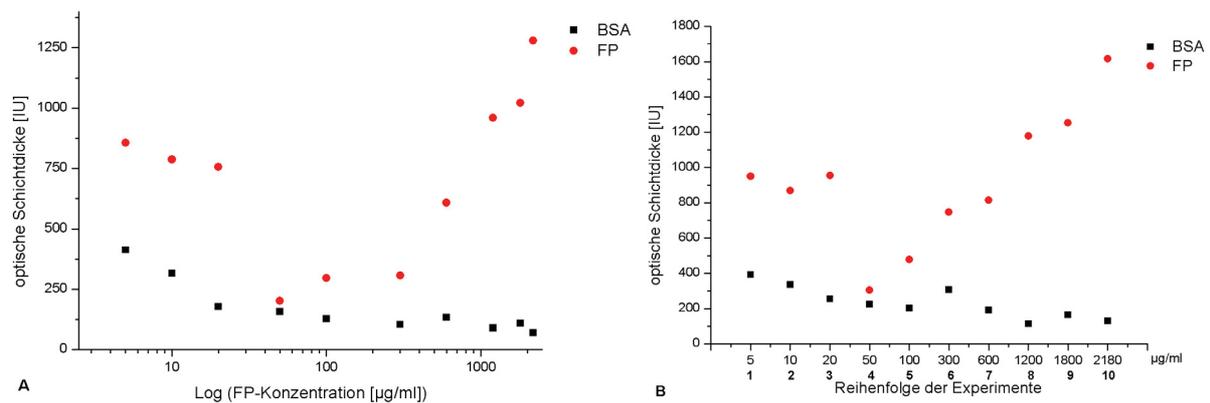
In Abb. 4.61 A lässt die Entwicklung der Signale mit steigender Konzentration des ConA-SAv-FP auf einen sigmoiden Zusammenhang schließen. Die BSA-Signale fallen recht unterschiedlich aus. In Abb. 4.61 B sind die ConA-SAv -Konzentrationen auf der x-Achse in der Reihenfolge aufgetragen, in der die entsprechenden Experimente tatsächlich stattfanden. Die Signale, die aufgrund der einzelnen BSA-Auftragungen gemessen worden sind, nahmen im Laufe des Experimentalzyklus immer weiter ab. Der Chip wurde um 180° gedreht und die Messreihe wiederholt. Die Resultate sind zusammen in Abb. 4.62 dargestellt.

## 4 | ERGEBNISSE



**Abb. 4.62: Sensorgramme zu ConA-SAv-Verdünnungsreihe 2.** Messspot 2; FP – ConA-SAv.

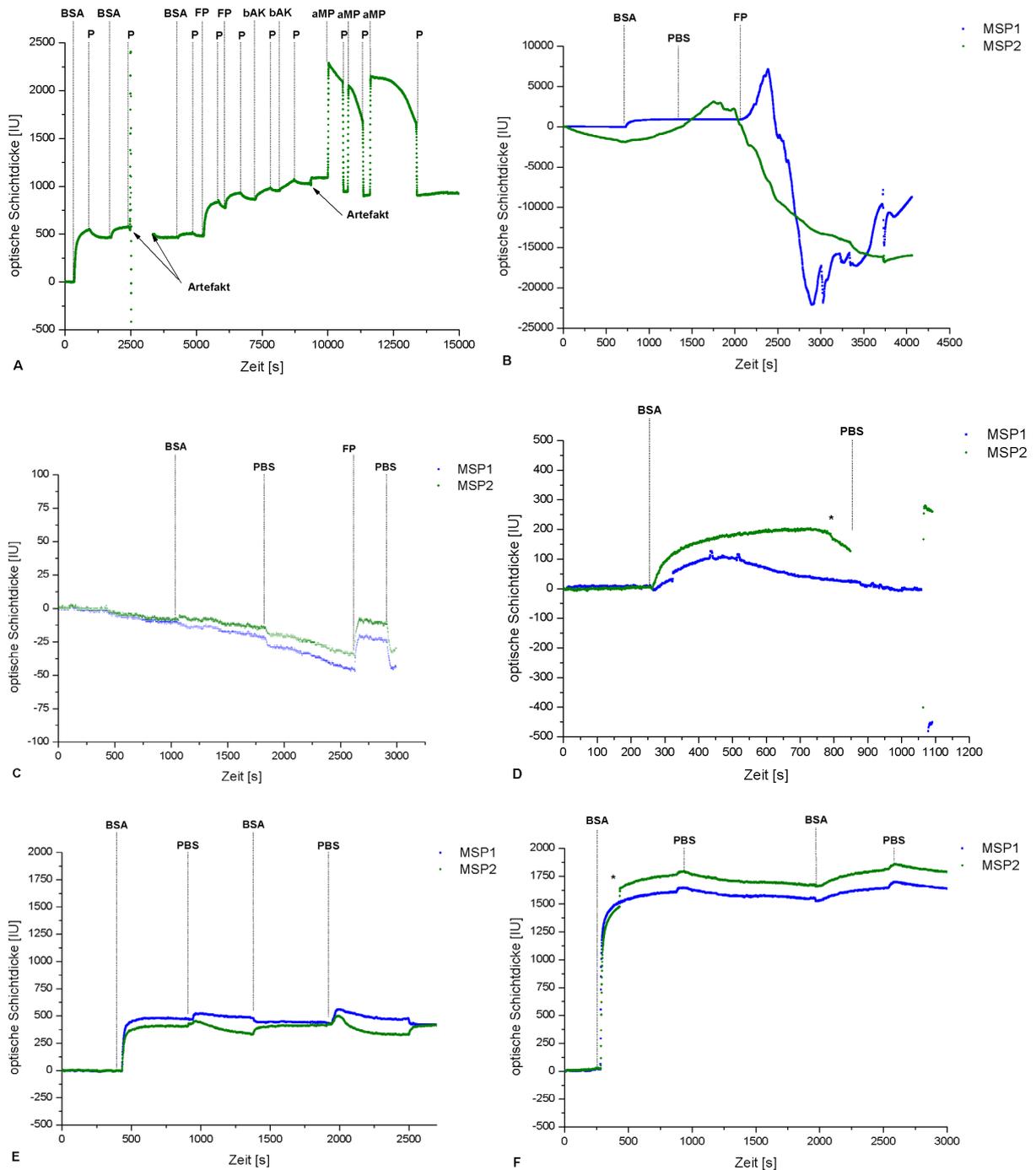
Auch zu dieser Versuchsreihe wurde eine halblogarithmische Darstellung der Signale am Ende der Dissoziationsphase gegen die FP-Konzentrationen erstellt (Abb. 4.63 A) und eine Darstellung der Signale in der Reihenfolge ihrer Messung (Abb. 4.63 B).



**Abb. 4.63: Auswertung der optischen Schichtdicken in ConA-SAv-Verdünnungsreihe 1.** BSA - je 2000 µg/ml; ConA-SAv - verschiedene Konzentrationen; Regeneration - SDS(2%). A) Halblogarithmische Auftragung der optischen Schichtdicken von ConA-SAv und BSA. B) Auftragung der BSA- und ConA-SAv-Messwerte in der Reihenfolge der durchgeführten Experimente.

Für diesen Zyklus von Experimenten wurde darauf geachtet, dass die Reihenfolge der Experimente die aufsteigende ConA-SAv -Konzentration spiegelt (Abb. 4.63 B). Einen sigmoiden Zusammenhang kann man in der halblogarithmischen Darstellung nicht erkennen, da die Signale bei niedrigen Konzentrationen zu hoch ausfallen. Gleichzeitig fallen auch die BSA-Signale bei den ersten Experimenten bei geringen ConA-SAv -Konzentrationen am höchsten aus.

Im folgenden werden noch einige Sensorgramme gezeigt, welche mit Chips dieser Art aufgenommen worden sind (Abb. 4.64 A-F).



**Abb. 4.64: Verschiedene Sensorgramme in Rahmen der Messungen für dieses Kapitel.** A – Beispiel-Sensorgramm mit Artefakten (gekennzeichnet); B – Beispiel-Sensorgramm mit massiven Artefakten; C – Beispiel-Sensorgramm eines Experiments, bei dem keine Messung möglich war; D – Beispiel-Sensorgramm eines Experiments, bei dem die Signale schon während der Assoziationsphase abnehmen; E und F – Beispiel-Sensorgramme, die verdeutlichen, wie unterschiedlich die Blockierung mit BSA ausfallen kann. BSA – Blockierungsreagenz; FP – ConA-SAv-Fusionsprotein; bAK –biotinylierter Anitkörper; aMP – Regenerationslösung  $\alpha$ -Methylmannopyranosid; MSP1 und MSP2 – Messspot 1 bzw. Messspot 2.

In dem Experiment, welches in Abb. 4.64 A dargestellt ist, zeigte die Bindungskurve, die über Messspot 1 gemessen wurde, so viele Artefakte, dass nur die Ergebnisse von Messspot 2 dargestellt werden. In dem Versuch wurde dreimal mit BSA (50  $\mu$ l, 2000  $\mu$ g/ml) blockiert, was insgesamt zu einer

OSD von ca. 500 IU führte. Im Verlauf der Blockierung kam es bei der 2. BSA-Injektion zu Artefakten. Zweifache Applikation von ConA-SAV (50 µl, 50 µg/ml) führte zu einem weiteren Signalanstieg 383 IU und eine zweifache Applikation von bAK (50 µl, 50 µg/ml) zu weiteren 148 IU. Eine dreimalige Anwendung von insgesamt 250 µl aMP (10%) bewirkte eine Regeneration um 30,7%. In der Dissoziationsphase zwischen der 2. bAK- und der 1. aMP-Applikation kam es zu einem weiteren Artefakt.

Abb. 4.64 B zeigt ein Experiment, das auf demselben Chip durchgeführt wurde, nachdem er um 180° in der Halterung gedreht worden war. Bei diesem Experiment traten von Anfang an auf MSP 2 massive Artefakte auf. Unter Messspot 1 konnte zunächst BSA immobilisiert werden, was eine Zunahme der OSD von etwa 750 IU erzeugte. Nach der Injektion des ConA-SAV (50 µg/ml, 50 µl) kam es auch unter MSP1 zu massiven Artefakten.

Abb. 4.64 C zeigt ein Experiment, in dem bei BSA- (2000 µg/ml, 75 µl) und ConA-SAV- (50 µg/ml, 30 µl) Applikation keine Signale gemessen werden konnten.

Bei dem Experiment, dessen Resultat in Abb. 4.64 D gezeigt wird, kam es kurz nach BSA-Applikation (2000 µg/ml, 50 µl) unter MSP1 zu Artefakten und einem vorzeitigen Signalrückgang, obwohl die Assoziationsphase noch nicht beendet war. Unter Messspot 2 kam es erst später, jedoch auch während der Assoziationsphase, zu einem Signalabfall und kurz vor Beginn der Dissoziationsphase zu massiven Artefakten.

Abb. 4.64 E und F zeigen zwei Experimente, in denen zweimal BSA (2000 µg/ml, 50 µl) injiziert wurde. Artefakte blieben aus. Das Experiment in E lieferte unter beiden Messspots eine Gesamt-OSD von 420 IU und das Experiment in F etwa 1630 IU. Unter Messspot 2 kam es dabei zu einem Artefakt (s. \*).

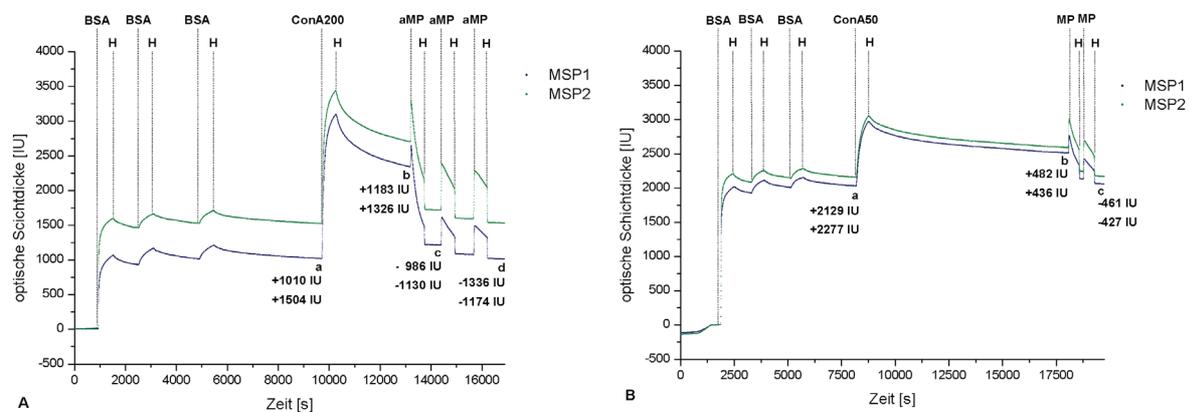
### **4.3.1.2 Mannan II: Experimente mit Mannan-OF gemäß modifiziertem Mannan-Protokoll**

Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Kapitels wurde das Protokoll modifiziert, um die Mannan-funktionalisierung effektiver zu gestalten. Nach der sechsständigen Inkubation in der APTES-Lösung wurden die Chips 120 Minuten bei 40°C in einem Wasserbad inkubiert und danach für 40 Minuten in einem Ofen bei 120°C (siehe Protokoll in Kapitel 3.2.1.3).

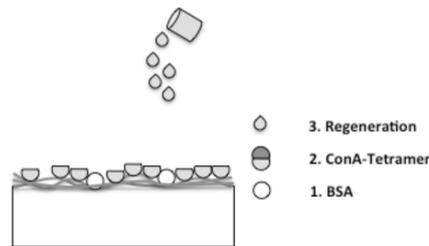
Im Folgenden werden verschiedene Sensorgramme gezeigt, die, wie in Kapitel 4.3.1.2, die Diversität der Resultate von RfS-Messungen widerspiegeln. Als Laufpuffer wurde stets HEPES pH 6,8 mit 5% Glycerol verwendet und als Regenerationslösung 10% aMP in PBS mit Gesamt-NaCl von 620 mM.

Als Erstes werden die Ergebnisse zweier Experimente mit ConA gezeigt (Abb. 4.65 A und B). Nach der Blockierung unspezifischer Bindestellen mit dreimaliger BSA-Applikation (jeweils 2000 µg/ml, 50 µl) wurde ConA (200 µg/ml, 50 µl in Abb. 4.65 A bzw. 50 µg/ml, 50 µl in Abb. 4.65 B) injiziert und anschließend aMP (3x in Abb. 4.65 A; 2x in Abb. 4.65 B → 10% + 620 mM NaCl). Die angegebenen OSDs

wurden zum Zeitpunkt der jeweils folgenden Injektion erhoben (d.h., das Ende der Dissoziationsphase fällt mit dem Zeitpunkt der folgenden Injektion zusammen).



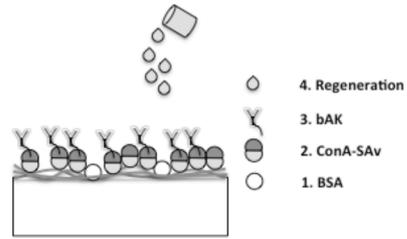
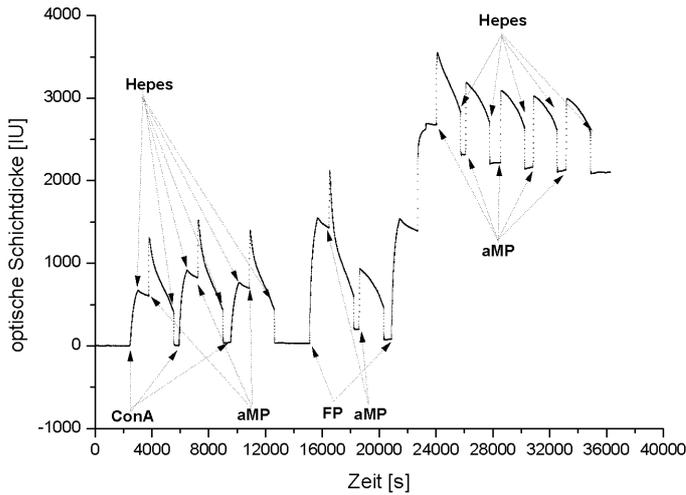
**Abb. 4.65: Sensorgramme nach ConA-Immobilisierung und dessen Regeneration.** A) BSA – Blockierer; ConA200 - 200 µg/ml, aMP - Regenerationslösung; B) BSA – Blockierer; ConA50 - 50 µg/ml; aMP - Regenerationslösung. MSP1 – Messung Messspot 1; MSP2 – Messung Messspot 2. Kleine Buchstaben - Indizes zur Referenz aus dem Text.



In beiden Experimenten wurden Blockierungssignale zwischen 1010 IU und 2277 IU gemessen. Nach einer Dissoziationsphase von 2920 s nach ConA-Applikation von 200 µg/ml wurde eine OSD von 1183 IU (MSP1) bzw. 1326 IU (MSP2) gemessen. Im Fall von ConA einer Konzentration von 50 µg/ml wurde eine OSD von 428 IU (MSP1) bzw. 436 IU (MSP2) gemessen. Die Gesamt-Regeneration (Index d in Abb. 4.65 A und Index c in Abb. 4.65 B) mit aMP betrug 112,9% (Abb. 4.65 A; MSP1), 88,5% (Abb. 4.65 A; MSP2), 95,6% (Abb. 4.65 B; MSP1) und 97,9% (Abb. 4.65 B; MSP2).

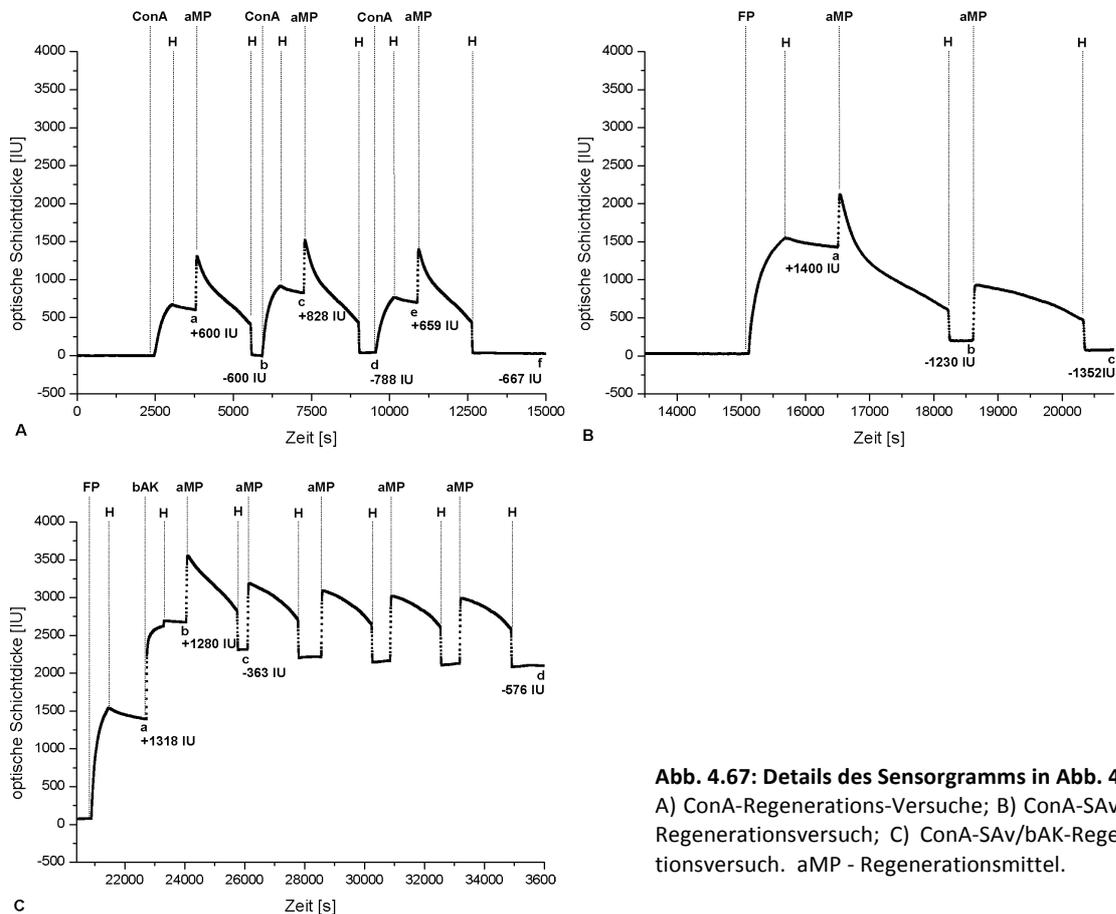
Im Experiment, welches als nächstes präsentiert wird, wurde zunächst mit ConA die Präsenz von Mannan auf der OF verifiziert, dann wurde die Binde- und Regenerationsfähigkeit des ConA-SAv-FP getestet und schließlich ein Proof of Principle mit ConA-SAv und bAK durchgeführt. Zunächst wurde mit BSA (50 µl, 2000 µg/ml) blockiert (nicht gezeigt) und anschließend drei ConA-Injektionen (je 50 µl, 50 µg/ml) jeweils gefolgt von aMP-Injektionen (150 µl, 10% + 620 mM NaCl) durchgeführt (Abb. 4.66; Detail s. Abb. 4.67 A). Danach wurde das ConA-SAv-FP (50 µl, 50 µg/ml) injiziert und zweimal mit aMP (150 µl, 10% + 620 mM NaCl) regeneriert (Abb. 4.66; Details s. Abb. 4.67 B). Als letztes wurde wieder ConA-SAv (50 µl, 50 µg/ml) injiziert, gefolgt von bAK (50 µl, 50 µg/ml) und fünf aMP-Applikationen (150 µl, 10% + 620 mM NaCl) (Details s. Abb. 4.67 C). Die Abb. 4.66 zeigt das Resultat des Experiments im Überblick.

## 4 ERGEBNISSE



**Abb. 4.66: Wiederholte ConA-Applikationen mit anschließender Regeneration und ConA-SAv/bAK-Applikation mit Regeneration.** aMP - Regenerationsmittel; HEPES – Puffer pH 6,8 + Glycerol; FP – ConA-SAv. Schema ConA/Regenerations-Versuche s. Schema Abb. 4.65. Schema ConA-SAv/Regenerations-Versuch siehe Abb. 4.62. Schema ConA-SAv/bAK/Regenerations-Versuch siehe Schema oben. Messung auf MSP2

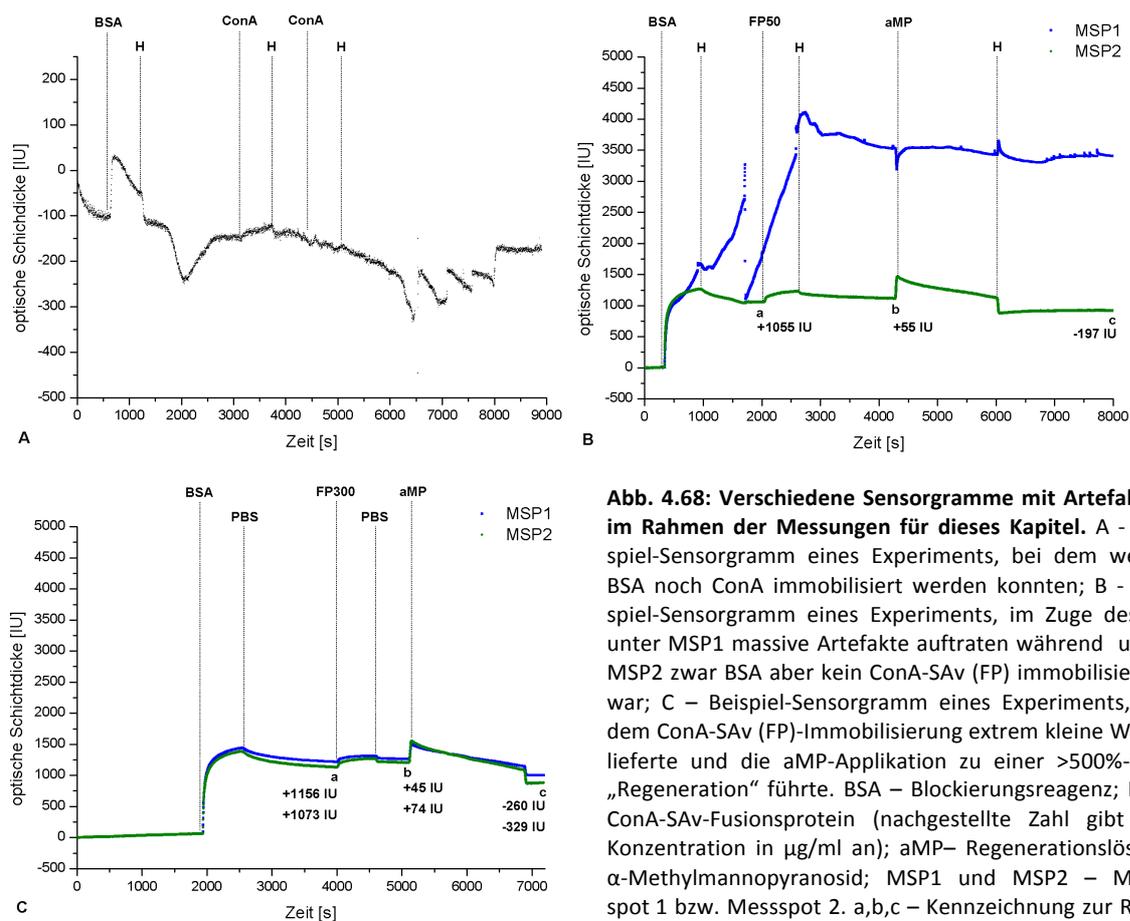
Wie man aus Abb. 4.67 A entnehmen kann, lässt sich ConA immobilisieren und erzeugt Sensorsignale zwischen 600 IU und 828 IU. Die Regeneration fällt nach der ersten aMP-Injektion zu 100%, nach der zweiten zu 95,2% und der dritten Injektion zu 101,2% aus. Die Applikation von ConA-SAv resultiert in einem Sensorsignal von 1400 IU. Regeneration nach aMP-Injektion findet zu 87,9% statt und wird durch eine weitere aMP-Injektion auf 96,6% erhöht (4.67 B).



**Abb. 4.67: Details des Sensorgramms in Abb. 4.8.** A) ConA-Regenerations-Versuche; B) ConA-SAv (FP)-Regenerationsversuch; C) ConA-SAv/bAK-Regenerationsversuch. aMP - Regenerationsmittel.

Der anschließende Proof of Principle führte bei der Immobilisierung des ConA-SAV (FP) zu einem Anstieg der OSD von 1318 IU und einem weiteren Anstieg bei Applikation von bAK um 1280 IU. Viermalige Injektion von aMP führte zu einer Gesamtregeneration von 22,2% (4.67 C).

Im Rahmen der Experimente mit den Chips, die nach dem modifizierten Protokoll Mannanfunktionalisiert worden sind, kam es auch zu häufigen Artefakten und anderen Schwierigkeiten. In Abb. 4.68 A-C sind drei Sensorgramme dargestellt, welche dies beispielhaft illustrieren. Abbildung 4.68 A zeigt ein Beispiel, bei dem sich weder BSA noch ConA auf der OF immobilisieren ließen. Stattdessen entwickelt sich das Signal unter MSP1 sehr schwankend. Die Kurve unter MSP2 zeigt einen extremen Abfall des Signals um 100000 IU und wird nicht gezeigt. Das Sensorgramm in Abb. 4.68 B zeigt erhebliche Artefaktentwicklung unter MSP1. Unter MSP2 lässt sich BSA (2000 µg/ml, 50 µl) mit einer OSD von 1055 IU zum Zeitpunkt der ConA-SAV-FP-Injektion immobilisieren. Die folgende ConA-SAV-Applikation (50 µg/ml, 50 µl) führt zu einem Signalanstieg von 55 IU. Injektion von aMP (10%, 150 µl) resultiert in einer Regeneration von 358,2%.



**Abb. 4.68: Verschiedene Sensorgramme mit Artefakten im Rahmen der Messungen für dieses Kapitel.** A - Beispiel-Sensorgramm eines Experiments, bei dem weder BSA noch ConA immobilisiert werden konnten; B - Beispiel-Sensorgramm eines Experiments, im Zuge dessen unter MSP1 massive Artefakte auftraten während unter MSP2 zwar BSA aber kein ConA-SAV (FP) immobilisierbar war; C – Beispiel-Sensorgramm eines Experiments, bei dem ConA-SAV (FP)-Immobilisierung extrem kleine Werte lieferte und die aMP-Applikation zu einer >500%-igen „Regeneration“ führte. BSA – Blockierungsreagenz; FP – ConA-SAV-Fusionsprotein (nachgestellte Zahl gibt die Konzentration in µg/ml an); aMP– Regenerationslösung α-Methylmannopyranosid; MSP1 und MSP2 – Messspot 1 bzw. Messspot 2. a,b,c – Kennzeichnung zur Referenz aus Text (s. Text)

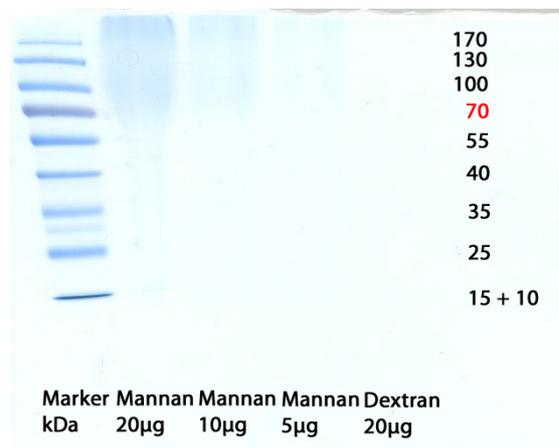
In Abb. 4.68 C wird das Experiment, dessen Resultat in Abb. 4.68 B dargestellt ist, wiederholt, jedoch mit 300 µg/ml ConA-SAV-FP (50 µl). Unter beiden Messspots ließen sich stabile Bindungskurven messen. BSA-Applikation resultierte in einer OSD von 1156 IU (MSP1) bzw. 1073 IU (MSP2). ConA-SAV-

## 4 | ERGEBNISSE

Injektion führte zu einem Signalanstieg um 45 IU (MSP1) bzw. 74 IU (MSP2). Die aMP-Lösung führte zu einer Regeneration von 577,8% (MSP1) bzw. 444,6%.

### 4.3.1.3 Mannan IV: Mannan-Funktionalisierung von OTS-Oberflächen

Die folgenden Experimente wurden aufgrund einer Überlegung durchgeführt, der zufolge Mannan des hier verwendeten Produkts hydrophobe Proteine enthalten könnte, die Linker zwischen einer hydrophoben OTS-OF und Mannan fungieren könnten (Näheres s. Diskussion). Um das zu testen, wurden Mannan und Dextran einer SDS-PAGE nach Lämmli (Trenngel 10%, Sammelgel 3,5%) unterzogen. Es wurde jeweils eine Mannan-Probe von 20 µg/ml und eine von 10 µg/ml und zur Kontrolle eine Dextran-Probe von 20 µg/ml in die Geltaschen pipettiert und der Migration überlassen (25 V; 300 mA). Anschließend wurden eventuell vorhandene Proteine mit Coomassie Brilliant Blau markiert. Eine Fotografie des Resultats ist in Abb. 4.69 zu sehen.

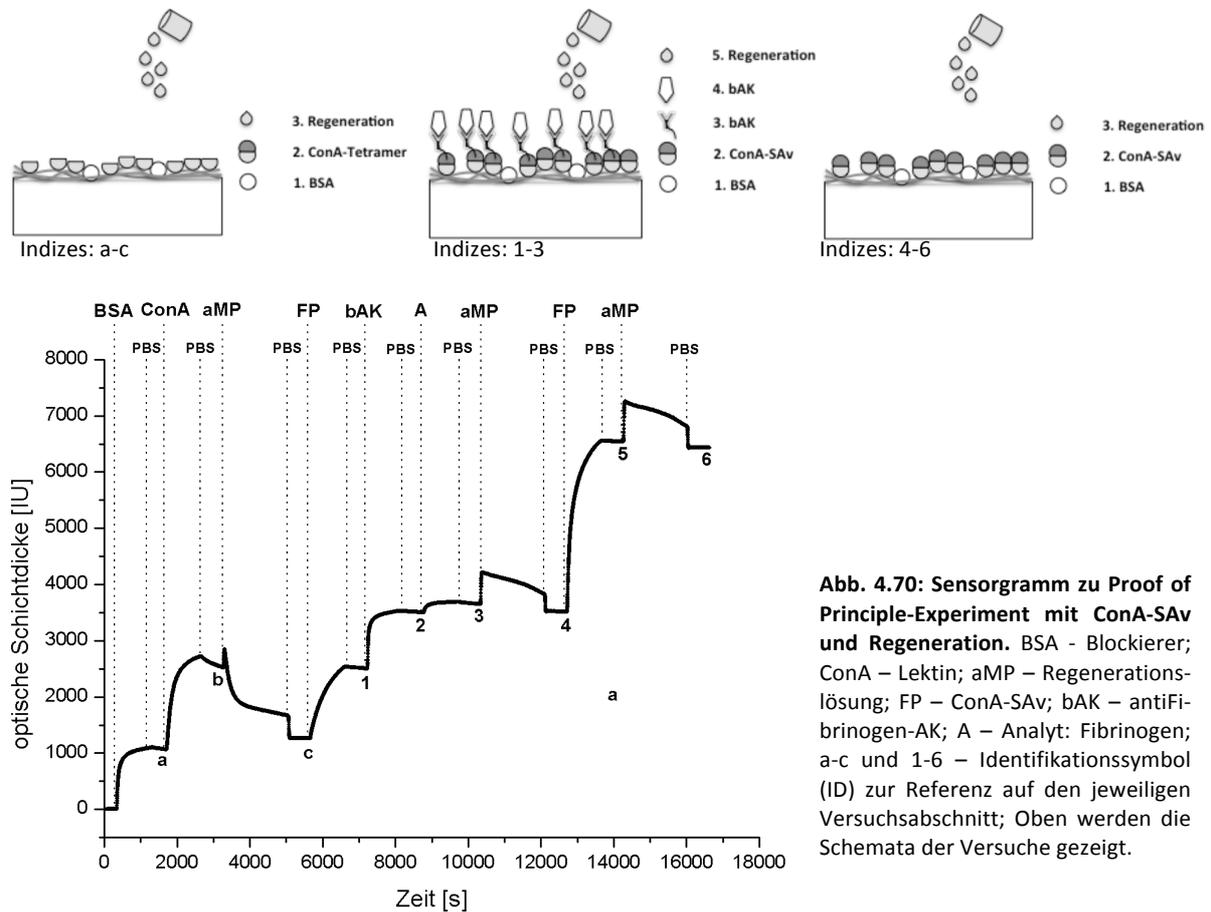


**Abb. 4.69: Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Mannan-Lösung mit anschließender Proteinfärbung.** Marker: PAGERuler Prestained Protein Ladder (Größenangaben rechts im Bild [kDa]). Färbung mit Coomassie Brilliant Blau; Dextran proteinfrei (Kontrolle).

Aus der Abb. 4.69 geht hervor, dass durch die Behandlung mit Coomassie Brilliant Blau in den Spalten, in denen Mannan vorgelegt worden ist, eine Anfärbung stattfindet, wohingegen das in der Dextran-Spalte nicht der Fall ist.

Im nächsten Schritt wurden Proof-of-Principle-Experimente mit den so hergestellten OTS-Mannan-OF durchgeführt. Die Experimente wurden gemäß folgendem Schema durchgeführt: Zuerst wurde nach 300 s Basislinienaufnahme mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) blockiert, ConA (100 µg/ml, 80 µl) appliziert und wieder mit aMP (10%, 150 µl) regeneriert. Dadurch sollte die prinzipielle Verwendbarkeit der OF geprüft werden (Abb. 4.70; Indizes a, b, c). Danach wurde ein neuer Experimentzyklus eröffnet (Abb. 4.70; Indizes 1-4): Zuerst wurde ConA-SAV (=FP; 100 µg/ml, 80 µl) injiziert, anschließend ein biotinylierter AK (bAK=anti-Fibrinogen-Antikörper (Biotin); 100 µg/ml, 80 µl) und schließlich ein Analyt (A=Fibrinogen; 50 µg/ml; 80 µl). Dann wurde versucht, die OF durch die Applikation von aMP (10%, 150 µl) zu regenerieren. Zum Schluss wurde nochmals das Verhalten von ConA-SAV (=FP; 100 µg/ml, 80 µl) bei anschließender Regeneration mit einer weiteren aMP-Zugabe getestet

(Abb. 4.12; Indizes 5-6). Als Analyt wurde in diesem Experiment Fibrinogen verwendet und der bAK war demnach ein biotinylierter anti-Fibrinogen-AK. Abbildung 4.70 zeigt das Resultat dieses Experiments und Tab. 4.15 fasst die gemessenen Sensorsignale zusammen.

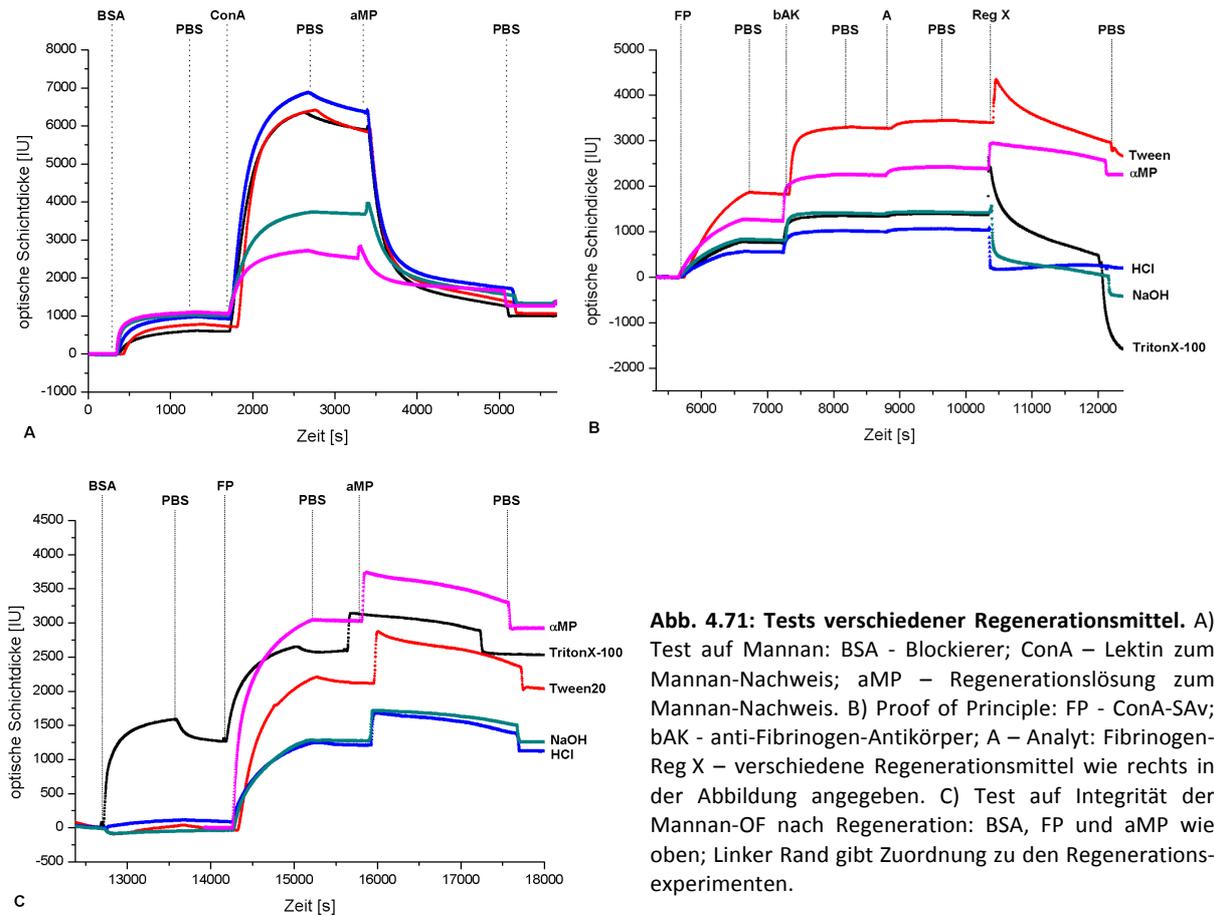


**Abb. 4.70: Sensorgramm zu Proof of Principle-Experiment mit ConA-SAV und Regeneration.** BSA - Blockierer; ConA – Lektin; aMP – Regenerationslösung; FP – ConA-SAV; bAK – antiFibrinogen-AK; A – Analyt: Fibrinogen; a-c und 1-6 – Identifikationssymbol (ID) zur Referenz auf den jeweiligen Versuchsabschnitt; Oben werden die Schemata der Versuche gezeigt.

BSA ließ sich mit einem Sensorsignal von 1058 IU immobilisieren. ConA, lieferte ein Sensorsignalzuwachs am Ende der Dissoziationsphase von 1470 IU und konnte anschließend mit aMP zu 85,7% regeneriert werden. Danach wurden nacheinander ConA-SAV (FP), ein bAK und ein Analyt immobilisiert (s. Tab. 4.15). Insgesamt wurde ein Signalzuwachs von 2388 IU gemessen. Die anschließende aMP-Injektion führte zu einer Regeneration um 5,7%. Um zu testen, ob die OF noch Kapazität zur weiteren Immobilisierung von ConA-SAV besitzt, wurde es nochmals immobilisiert, wobei ein Signalanstieg um weitere 3029 IU registriert wurde. Die Regeneration mit aMP erfolgte zu 3,7%. Nach dem gleichen Muster wurden weitere Experimente unternommen, um weitere Regenerations-Reagenzien zu testen. Die Bindungskurven sind in Abb. 4.71 A-C zu sehen.

**Tab. 4.15: Regenerationserfolg und Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphasen (600 s) des Experiments in Abb. 4.12.** ID – Identifikationsnummer (folgt der Zuordnung in Abb. 4.12); Komponente – Applizierte Substanzen; OSD bzw. Regeneration – Angabe der OSD in IU bzw. der Regeneration in %.

ID	Komponente	OSD bzw. Regeneration
a	BSA	1058 IU
b	ConA	1470 IU
c	aMP	85,7%
1	FP (ConA-SAV)	1240 IU
2	bAK	999 IU
3	Analyt (A)	149 IU
4	aMP	5,7%
5	FP	3029 IU
6	aMP	3,7%



Der besseren Übersicht wegen sind die Bindungskurven auf drei einzelne Diagramme aufgeteilt worden: A zeigt die Blockierung mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) und den auf ConA (100 µg/ml, 80 µl) und dessen Regeneration mit aMP (10%, 150 µl) basierenden Test, ob Mannan auf der OF vorhanden ist. B zeigt die Immobilisierung von ConA-SAV (FP), bAK, und Analyt (A) und den folgenden Regenerationsversuch mit unterschiedlichen Reagenzien. C schließlich zeigt eine weitere Immobilisierung von FP und einen anschließenden Regenerationsversuch mit aMP, um zu testen, wie sich das FP auf einer OF verhält, die mit den unterschiedlichen Regenerations-Reagenzien in Kontakt kam.

In Tab. 4.16 werden die konkreten Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphasen des ersten Versuchsteil (BSA, ConA, aMP) angegeben (s. Abb. 4.71 A). Folgendes ist zu beachten: Vor jedem Experiment mit FP, bAK und den verschiedenen Regenerationsmittel wurde, wie bereits erwähnt, getestet, ob auf der OF auch Mannan vorhanden ist. Der Test erfolgte durch Applikation von ConA (nach Blockierung unspezifischer Bindestellen mit BSA) und die anschließende Regeneration mit aMP. Die in der Tab. 4.16 unter „Experiment“ angesprochenen Regenerationslösungen geben nur an, zu welchem Experiment mit FP, bAK, Analyt und der entsprechenden Regenerationslösung der vorherige Mannan-Test mit ConA und aMP gehört. In der Rubrik „Regeneration“ stehen Werte, die nur mit aMP erzielt worden sind und nicht mit den Lösungen, welche unter „Experiment“ angegeben sind.

**Tab. 4.16: Ergebnisse der Mannan-Tests mittels ConA und aMP.** Experiment gibt den Namen der Experimente an, in deren Rahmen die Mannan-Tests durchgeführt worden sind. Regeneration erfolgte in den Mannan-Tests stets mit aMP. Werte beziehen sich auf die Bindungskurven in Abb. 4.71 A.

Experiment	BSA [IU]	ConA [IU]	Regeneration [%]
<b>aMP 10%</b>	1058	1470	85,7
<b>NaOH 0,1M</b>	1037	2688	82,8
<b>HCl 2%</b>	911	5356	91,2
<b>TritonX-100 0,5%</b>	591	5529	91,7
<b>Tween20 2%</b>	719	5167	93,1
<b>OSD<sub>MW</sub></b>	839,2	4229,5	89,6
<b>StDev</b>	191,1	1715,9	4,3
<b>SPW</b>	467	4059	10,3

Aus der Tabelle 4.16 geht hervor, dass BSA mit einer mittleren OSD von 839,2 IU auf der OTS-Mannan-OF immobilisiert werden kann. Mit einer Spannweite von 467 IU fallen die einzelnen Blockierungen recht unterschiedlich aus. Die mittlere OSD nach ConA-Applikation ergibt sich zu 4229,5 IU. Auch in diesem Fall ergibt sich eine hohe Spannweite (SPW). Die Regeneration mit aMP führt zu einer durchschnittlichen Signalreduktion von 89,3% des ConA-Sensorsignals.

Im weiteren Verlauf wurden die Experimente mit FP, bAK, Analyt und verschiedenen Regenerationslösungen unternommen, die in Abb. 4.71 B dargestellt worden sind. Die Tab. 4.17 zeigt die entsprechenden Werte. Bei der Applikation mit FP wurden Sensorsignale von durchschnittlich 1039,2 IU gemessen. Die äquimolare Applikation des bAK führte zu einem mittleren Anstieg um 809,8 IU und die Applikation des Analyten führte zu einem weiteren Anstieg von 76,4 IU. Für den gesamten Aufbau ergibt sich ein mittleres Gesamtsignal von 1925,4 IU. Die Regenerationen vielen sehr unterschiedlich aus. aMP führte zu keiner Regeneration, Tween20 zu einer 25%igen und HCl zu einer 85%igen Regeneration. NaOH und TritonX-100 bewirkten einen Signlrückgang von 129,9% bzw. 227%.

Im letzten Schritt dieser Experimente wurde schließlich getestet, wie die OTS-Mannan-OF auf die unterschiedlichen Regenerationsmittel reagiert. Dazu wurde zunächst nochmals mit BSA blockiert, um eventuell neu entstandene unspezifische Bindestellen zu eliminieren. Anschließend wurde FP immobilisiert und letztlich mit aMP regeneriert. Die Werte der Sensorsignale am Ende der jeweiligen Dissoziationsphasen sind in der Tab. 4.18 angegeben (für die Bindungskurven s. Abb. 4.71 C).

**Tab. 4.17: Ergebnisse der „Proof of Principle“ mit FP, bAK, Analyt und unterschiedlicher Regenerationslösungen.** Experiment - gibt die Regenerationslösung an, welche nach FP-, bAK- und Analyt-Applikation zur Regeneration verwendet worden ist. Der Regenerationserfolg ist in der Rubrik Regeneration in Prozent angegeben. bAK – anti-Fibrinogen-Antikörper, Analyt (A) - Fibrinogen; FP+bAK+A – Summe der Signalanstiege nach Applikation der einzelnen Komponenten. Kursiv – Statistische Parameter:  $OSD_{MW}$  (mittlere optische Schichtdicke), StDev (Standardabweichung), SPW (Spannweite). Werte beziehen sich auf die Bindungskurven in Abb. 4.71 B.

Experiment	ConA-SAv (FP) [IU]	bAK [IU]	Analyt (A) [IU]	FP+bAK+A [IU]	Regeneration [%]
aMP 10%	1240	999	149	2388	5,7
NaOH 0,1M	828	577	25	1430	129,9
HCl 2%	549	440	38	1027	83
TritonX-100 0,5%	755	577	37	1369	227
Tween20 2%	1824	1456	133	3413	25,3
<i>OSD<sub>MW</sub></i>	<i>1039,2</i>	<i>809,8</i>	<i>76,4</i>	<i>1925,4</i>	-
<i>StDev</i>	<i>505,4</i>	<i>417,9</i>	<i>59,5</i>	<i>973,3</i>	-
<i>SPW</i>	<i>1275</i>	<i>1016</i>	<i>124</i>	<i>2386</i>	-

Die erneute Blockierung mit BSA führte im Fall von NaOH und Tween20 zu keinem Signalanstieg im Fall von HCl und Triton-X 1000 jedoch zu einem Signalanstieg von 1058 IU bzw. 1436 IU. Bei der Applikation von FP wurde im Fall von vorheriger HCl-Regeneration ein Sensorsignal von 460 IU gemessen, gefolgt von einer Regeneration von über 100%. Bei den anderen Experimenten wurden nach FP-Applikation Sensorsignale von über 1000 IU gemessen. Die Regeneration erfolgt nur zu 0,8% bis 3,7%.

**Tab. 4.18: Ergebnisse des Tests der OF nach Kontakt mit verschiedenen Regenerationslösungen.**

Experiment	BSA [IU]	FP [IU]	Regeneration [%]
aMP 10%	-	3029	3,7
NaOH 0,1M	-27	1308	0,8
HCl 2%	158	460	1,8
TritonX-100 0,5%	1436	1062	9,1
Tween20 2%	-32	2157	5,0

#### 4.3.1.4 Mannan III

##### 4.3.1.4.1 Vergleichsuntersuchung

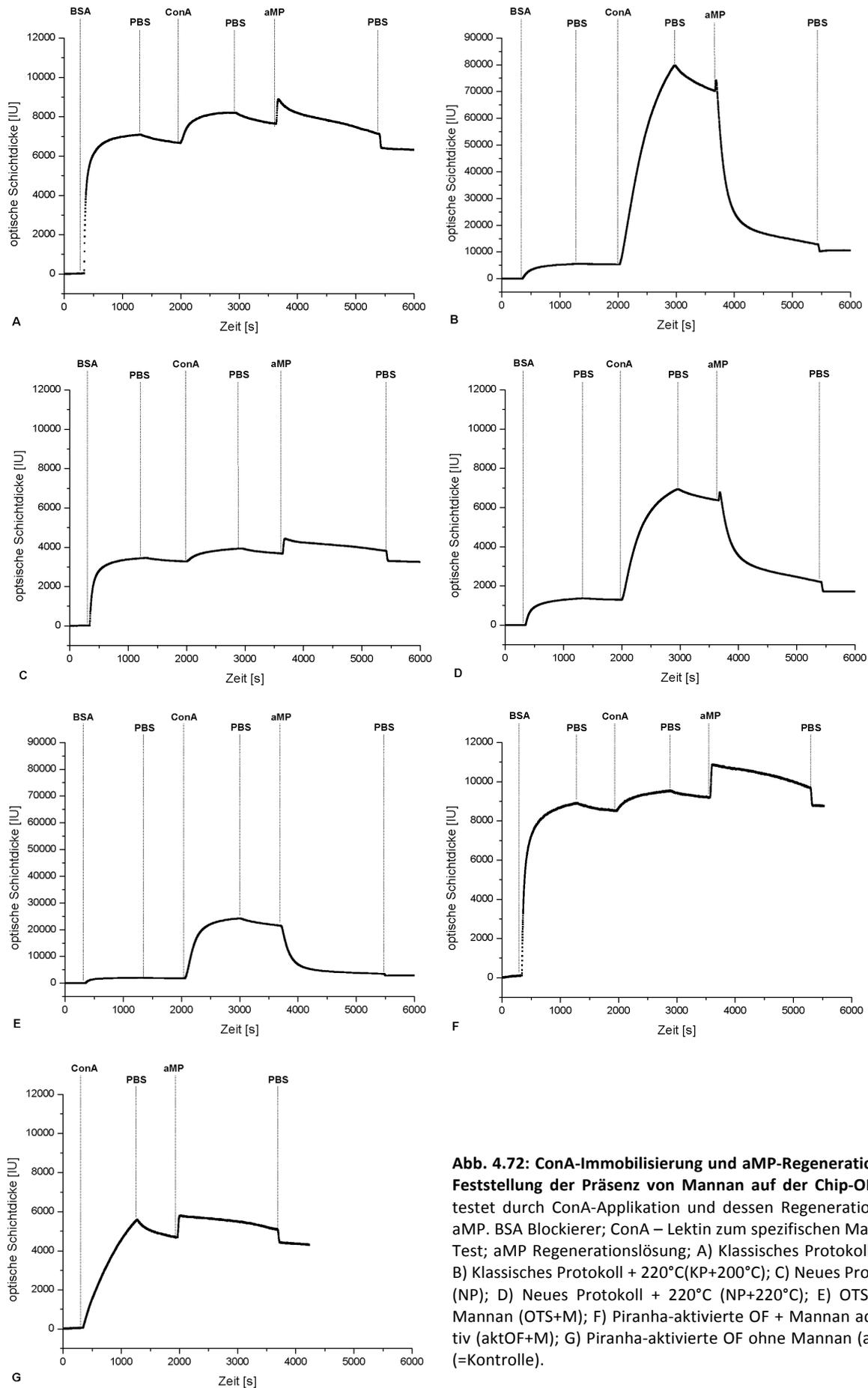
Besonders auf Oberflächen, auf denen Mannan kovalent über zuvor auf der OF eingeführte Amino-Gruppen durch APTES-Funktionalisierung gebunden werden sollte, ergaben sich, wie in den vorhergehenden Kapiteln aufgezeigt, vielfältige Probleme. Daher sollten in einer Versuchsreihe nochmals die verschiedenen Protokolle einander gegenübergestellt und der Funktionalisierungserfolg durch Applikation von ConA verglichen werden. Aufgrund der Erfahrungen mit vorherigen Versuchen wurden Protokolle verwendet, welche einige Modifikationen gegenüber den ursprünglichen Protokollen enthielten (Tab. 4.19). Außerdem wurde ein neues Protokoll getestet, welches in Kapitel 3.2.1.4 angegeben ist.

**Tab. 4.19: Übersicht über die verwendeten Protokolle bzw. Experimentalbedingungen.** ID – Kennung des Experiments; KP – klassisches Protokoll nach Kapitel 3.2.1.4. NP – neues Protokoll nach Kapitel 3.2.1.3 (modifiziertes KP wie angegeben); OTS+M – Mannan adsorptiv auf hydrophober OF adsorptiv immobilisiert gemäß Kapitel 3.2.1.5 (Chip mit OTS hydrophobisiert); aktOF+M – Mannan auf hydrophilem Chip adsorptiv immobilisiert (Chip mit NaOH und Piranha-Lösung hydrophilisiert); aktOF – hydrophile OF ohne Mannan (Chip mit NaOH und Piranha-Lösung hydrophilisiert).

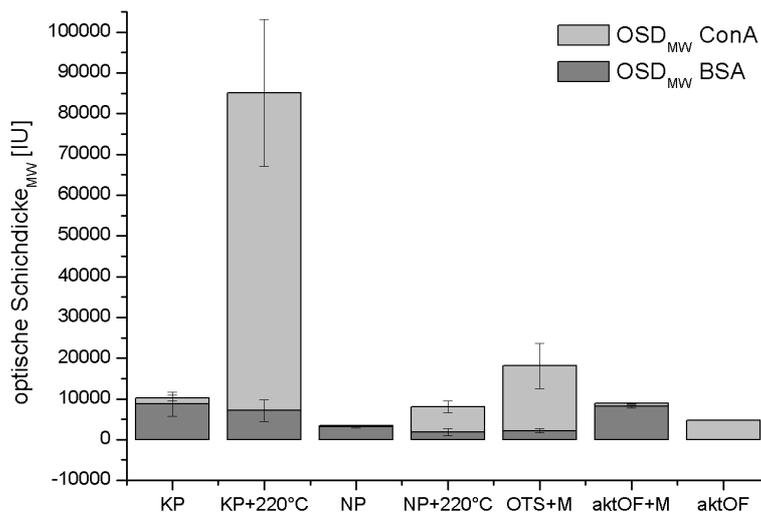
ID	Protokoll	Modifikation
<b>KP</b>	3.2.1.2 Mannan I	Aceton-Reinigung im ersten Schritt Waschschritte je 2 min
<b>KP+220°C</b>	3.2.1.4 Mannan III	Nach APTES-Funktionalisierung 15 min bei 220°C
<b>NP</b>	3.2.1.3 Mannan II	Aceton-Reinigung im ersten Schritt Nach APTES-Funktionalisierung Wasserbad für 2 h bei 40°C ohne Hitze-Schritt (Schritt 13)
<b>NP+220°C</b>	3.2.1.3 Mannan II	Aceton-Reinigung im ersten Schritt Nach APTES-Funktionalisierung Wasserbad für 2 h bei 40°C und danach 15 min bei 220°C (statt 40 min bei 120°C)
<b>OTS+M</b>	3.2.1.5 Mannan IV	Inkubation der OTS-Chips in Mannan-Lösung (5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 10, 24 h)
<b>aktOF+M</b>	3.2.1.3	Protokoll nur Schritt 1-7. Danach Inkubation in Mannan-Lösung (5 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, 24 h, anschließend 3x2 min mit ddH <sub>2</sub> O Spülen auf Rüttler) gemäß Schritt 14-16
<b>aktOF</b>	3.2.1.3	Protokoll nur Schritt 1-7. Kontrolle.

Die Versuche auf den Chips, die gemäß den Angaben in Tab. 4.19 funktionalisiert worden sind, wurden zunächst wie folgt durchgeführt: Die Chips wurden für 1 h im PBS-Pufferstrom äquilibriert. Nach der Äquilibrierung wurde für 300 s eine Basislinie aufgenommen, bevor BSA (500 µg/ml; 80 µl) injiziert worden ist. Nach einer 600 s-Dissoziationsphase wurde ConA (100 µg/ml; 80 µl) und schließlich, nach weiteren 600 s Dissoziationsphase, aMP (10%, 150 µl) appliziert. Die Experimente wurden jeweils doppelt ausgeführt (Kontrolle aktOF nur einmal). Die Abb. 4.72 A-G zeigen exemplarisch jeweils eine der Bindungskurven, die via Messspot 2 aufgenommen worden sind. Die Abb. 4.73 zeigt ein Balkendiagramm, in welchem die Mittelwerte (jeweils zwei identische Experimente auf jeweils demselben Chip; zweites Experiment nach Drehung des Chips um 180°) der optischen Schichtdicken von BSA bzw. ConA am Ende einer 600 s-Dissoziationsphase, vergleichend einander gegenübergestellt werden. In Tab 4.20 finden sich die entsprechenden Zahlenwerte und der „Grad der Regeneration“.

## 4 | ERGEBNISSE



**Abb. 4.72: ConA-Immobilisierung und aMP-Regeneration zur Feststellung der Präsenz von Mannan auf der Chip-OF.** Getestet durch ConA-Applikation und dessen Regeneration mit aMP. BSA Blockierer; ConA – Lektin zum spezifischen Mannan-Test; aMP Regenerationslösung; A) Klassisches Protokoll (KP); B) Klassisches Protokoll + 220°C(KP+200°C); C) Neues Protokoll (NP); D) Neues Protokoll + 220°C (NP+220°C); E) OTS-OF + Mannan (OTS+M); F) Piranha-aktivierte OF + Mannan adsorptiv (aktOF+M); G) Piranha-aktivierte OF ohne Mannan (aktOF) (=Kontrolle).



**Abb. 4.73: Vergleich der mittleren OSD nach ConA- bzw. BSA-Applikation.** Mittelwert aus jeweils zwei Experimenten. OSD<sub>MW</sub> – Mittelwert der optischen Schichtdicken aus jeweils zwei identischen Experimenten. Abkürzungen auf X-Achse siehe Zuordnung in Tab. 4.19.

Wie aus Abb. 4.72 und Tab. 4.20 hervorgeht, konnte unter allen Bedingungen mit BSA blockiert werden. Am höchsten vielen die Blockierungssignale im Experiment KP, KP+220°C und aktOF+M. Die bei weitem höchsten Sensorsignale nach ConA-Applikation wurden mit durchschnittlich 77907,5 IU in den Experimenten KP+220°C erzielt. Auch die Experimente OTS+M zeigten mit durchschnittlich 15913,5 IU sehr hohe ConA-Sensorsignale. Im Kontrollexperiment zeigte sich, dass ConA auch an die aktivierte und nicht weiter modifizierte OF binden kann. Das ConA konnte jedoch nicht durch aMP-Applikation von der OF entfernt werden, wie der Regenerationswert von 8,7% anzeigt. An dritter Stelle folgen die Experimente NP+220°C, bei denen nach ConA-Applikation ein mittleres Signal von 6153,5 IU gemessen worden ist.

**Tab. 4.20: Mittelwerte der gemessenen OSD für ConA und BSA und Regenerationserfolg.** OSD<sub>MW</sub> – Mittelwert der optischen Schichtdicke; StDev – Standardabweichung der OSD<sub>MW</sub>. Je zwei Experimente: Exp1 - erstes Experiment auf Chip; Exp2 – zweites Experiment auf Chip (nach Drehen um 180°).

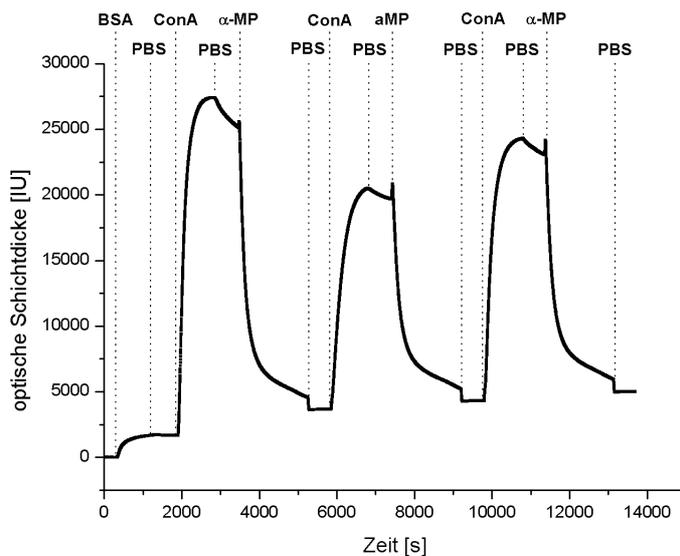
Protokoll	OSD <sub>MW</sub> (BSA) [IU]	StDev (BSA) [IU]	OSD <sub>MW</sub> (ConA) [IU]	StDev (ConA) [IU]	Regeneration Exp1 [%]	Regeneration Exp2 [%]
KP	8705,5	2906,9	1493	722,7	132	74,2
KP+220°C	7185	2665,8	77907,5	17976,8	90,9	94,4
NP	3096	247,5	348,5	81,3	102,1	133,4
NP+220°C	1913,5	880,3	6153,5	1501,2	90,8	90,4
OTS+M	2176,5	508,4	15913,5	5592,5	93,4	88,5
aktOF+M	8173,5	327,34	746	97,6	61,1	68,3
aktOF	-	-	4699	-	8,7	-

## 4 | ERGEBNISSE

Bei der Regeneration in den beiden KP-Experimenten ergaben sich widersprüchliche Signale. Im ersten Experiment kam es zu einer Regeneration von 132% und im zweiten nur um 74,2%. Die NP-Experimente zeigten eine Regeneration von 102,1% bzw. 133,4%. In den Experimenten KP+220°C, NP+220°C und OTS+M lagen die Werte für die Regeneration um 90%.

### 4.3.1.4.2 Wiederholte ConA-Immobilisierung

Aufgrund der Daten, wurde mit dem Protokoll weitergearbeitet, welches für den Versuch KP+220°C verwendet worden ist. D.h., die Chips der folgenden Versuche wurden gemäß dem Protokoll Mannan III (Kapitel 3.2.1.4) mit vorhergehender Aceton-Reinigung und einer Inkubation von 15 min bei 220°C funktionalisiert. Um nachzuweisen, dass man ConA mehrmals auf einer Mannan-OF immobilisieren und mit aMP wieder von der OF entfernen kann, wurde ein Experiment unternommen, bei dem drei mal ConA (100 µg/ml, 80 µl) immobilisiert worden ist, jeweils gefolgt von einer Regeneration mit aMP (10%, 150 µl). Die Abb. 4.74 zeigt das entsprechende Ergebnis.



**Abb. 4.74: Mehrfache ConA-Immobilisierung auf Mannan-OF mit anschließender Regeneration mit aMP.** BSA - Blockierer; ConA – Lektin für spezifischen Mannan-Test; aMP - Regenerationslösung;

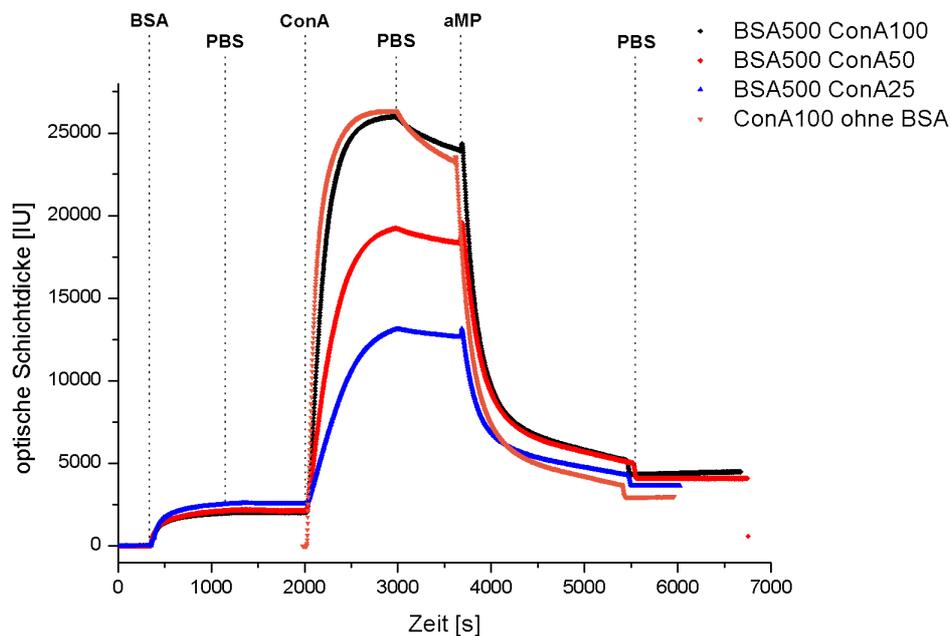
Die Applikation von BSA zur Blockierung ergab ein Sensorsignal von 1679 IU. Die drei ConA-Applikationen führten zu Signalanstiegen von 23567 IU, 16047 IU und 18816 IU. Die Regeneration gelang nach der ersten ConA-Applikation zu 91,5%, nach der zweiten zu 96% und nach der dritten ConA-Injektion zu 96,2%. Tabelle 4.21 stellt die Werte übersichtlich einander gegenüber.

**Tab. 4.21: Signalerhöhung/-verringern nach Applikation von BSA, ConA und aMP.** 1, 2, 3 – Reihenfolge der ConA-aMP-Zyklen gemäß Abb. 4.74.

	BSA [IU]	ConA [IU]	Regeneration [%]
1	1679	23567	91,5
2	-	16047	96
3	-	18816	96,2

4.3.1.4.3 Unterschiedliche ConA-Konzentrationen

Außerdem wurde getestet, wie sich ConA unterschiedlicher Konzentration auf der Mannan-OF verhält und ob BSA zur Blockierung notwendig ist. Dazu wurde in drei Versuchen zunächst wieder mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) blockiert, anschließend 80 µl ConA der Konzentrationen 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml appliziert und schließlich mit aMP (10%, 150 µl) regeneriert. In einem weiteren Experiment wurde nicht mit BSA blockiert und stattdessen direkt 100 µg/ml ConA (80 µl) injiziert. Dieses Experiment wurde wieder durch einen Regenerationsschritt mit aMP (10%, 150 µl) beschlossen. In Abb. 4.75 werden die resultierenden Bindungskurven und in Tab. 4.22 die entsprechenden Werte zusammengefasst.



**Abb. 4.75: Bindekurven nach ConA-Applikationen unterschiedlicher Konzentration.** BSA500 ConA X – Blockierung mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) mit anschließender ConA-Injektion unterschiedlicher Konzentration; aMP-Regenerationslösung. ConA100 ohne BSA – Keine Blockierung anschließend ConA 100 µg/ml und aMP-Regeneration.

Die drei ConA-Applikationen ergeben folgerichtig bei kleineren Konzentrationen kleinere Sensorsignale. Die Regeneration fällt mit Werten zwischen 87% und 90% sehr ähnlich aus. Ohne vorherige BSA-Blockierung ergibt sich für 100 µg/ml ConA das gleiche Bild wie mit vorheriger Blockierung. Der Sensorsignalzuwachs beträgt mit Blockierung 22049 IU und ohne Blockierung 23249 IU. Die Regeneration beträgt 87,2 IU bzw. 89,2 IU.

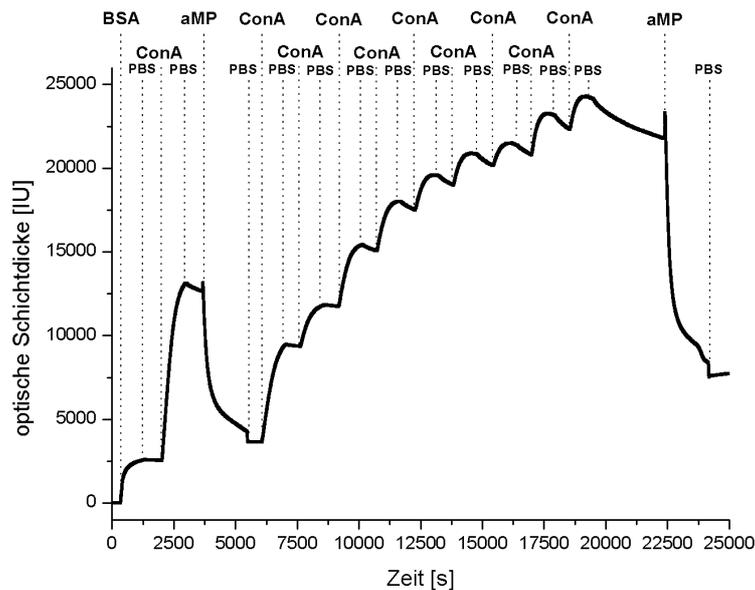
**Tab. 4.22: Sensorsignale nach BSA-/ConA-Applikation und Regenerationserfolg gemäß Abb. 4.75.** Linke Spalte enthält die Bezeichnungen der Experimente, die schon in Abb. 4.75 verwendet worden ist. BSA500 – Blockierung mit 500 µg/ml BSA; ConAXXX – x µg/ml ConA.

	BSA [IU]	ConA [IU]	Regeneration [%]
ConA100 ohne BSA	-	23249	87,2
BSA500 ConA100	2000	22049	89,2
BSA500 ConA50	2114	16241	87,9
BSA500 ConA25	2555	10123	89,2

## 4 | ERGEBNISSE

### 4.3.1.4.4 Sättigung der Mannan-OF mit ConA

Schließlich wurde ein Experiment unternommen, mit dem getestet wurde, wie viel ConA sich auf der Mannan-OF immobilisieren lässt und wie die Regeneration bei maximaler Beladung ausfällt. Zunächst wurde mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) blockiert, ConA (100 µg/ml, 80 µl) appliziert und mit aMP (10%, 150 µl) regeneriert. Danach wurden neun weitere ConA-Injektionen à 100 µg/ml (80 µl) durchgeführt, ohne dass nach diesen Injektionen mit aMP regeneriert worden wäre. Die Regeneration erfolgte erst nach der neunten ConA-Applikation. Das Ergebnis zeigt das Sensorgramm in Abb. 4.76.



**Abb. 4.76: Sättigungsexperiment mit ConA auf einer Mannan-OF.** BSA – Blockierer; ConA jeweils 100 µg/ml (80 µl); aMP - Regenerationslösung.

Bei der BSA-Blockierung wurden am Ende der Dissoziationsphase (600 s) 2553 IU gemessen. Nach der ConA-Injektion stieg das Signal um weitere 10117 IU am Ende der Dissoziationsphase (600 s) an. Die Regeneration mit aMP erfolgte zu 71,2%. Die neun Applikationen von ConA führten zu einem erneuten Sensorsignalzuwachs zum Zeitpunkt der zweiten aMP-Injektion von 18137 IU. Die anschließende Regeneration erfolgte zu 64,5% (Tab. 4.23).

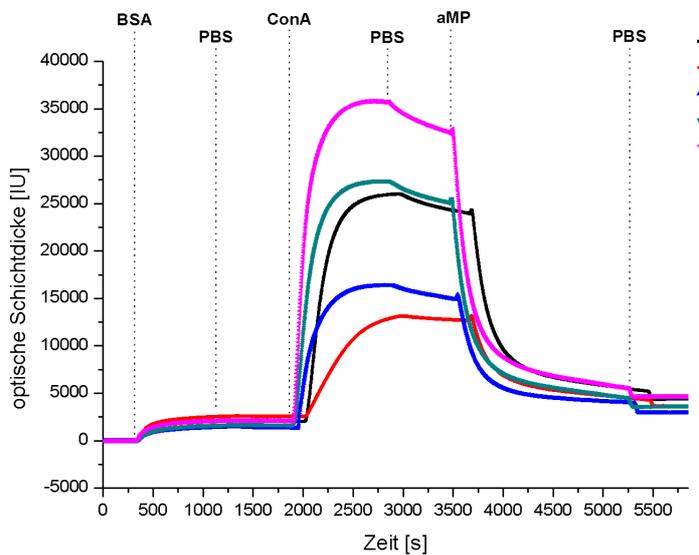
**Tab. 4.23: Sensorsignal und Regenerationserfolg bei ConA-Stapel-Experiment.** (s. Abb. 4.76)

	BSA [IU]	ConA [IU]	Regeneration [%]
<b>BSA-Blockierung</b>	2553	-	-
<b>1. ConA-Applikation</b>	-	10117	71,2%
<b>9xConA</b>	-	18137	64,5%

### Zusammenfassende Bemerkungen

Insgesamt wurden auf den Chips dieser Charge fünf Experimente unternommen, bei denen zuerst mit BSA (500 µg/ml, 80 µl) blockiert, dann ConA (100 µg/ml, 80 µl) appliziert und schließlich mit aMP

(10%, 150 µl) regeneriert worden ist. Abbildung 4.77 zeigt die Bindungskurven im Vergleich. Tabelle 4.24 fasst die Mittelwerte und einige diesbezügliche Parameter zusammen.



**Abb. 4.77: Fünf ConA-Experimente im Vergleich.** BSA - Blockierer; ConA - jeweils 100 µg/ml; aMP – Regenerationslösung; dazwischen.

Die Blockierung ergibt eine mittlere optische Schichtdicke ( $OSD_{MW}$ ) von 1926,4 IU bei einer Standardabweichung von 458,2 IU und einer Spannweite von 1221 IU. Die ConA-Applikation führt zu einem mittleren Anstieg der OSD von 20009,2 IU ( $StDev=8156,7$  IU;  $SPW=20407$  IU). Die Regeneration mit aMP beträgt durchschnittlich 86,2% ( $StDev=8,5\%$ ,  $SPW=20,4\%$ ).

**Tab. 4.24: Vergleich der  $OSD_{MW}$  nach BSA- bzw. ConA-Applikation und der Regeneration auf fünf Chips.**

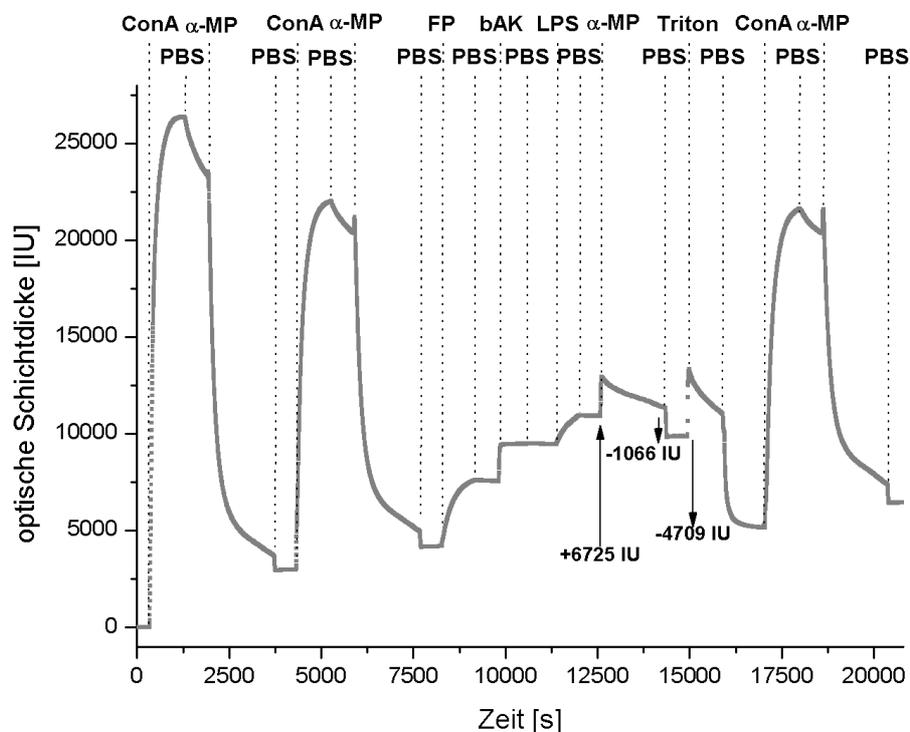
	1	2	3	4	5	$OSD_{MW}$	StDev	SPW
<b>BSA-Signal [IU]</b>	1999	2553	1332	1679	2078	1926,4	458,2	1221
<b>ConA-Signal [IU]</b>	22190	10117	13653	23567	30519	20009,2	8156,7	20402
<b>Regeneration [%]</b>	88,6	71,2	88,1	91,5	91,6	86,2	8,5	20,4

#### 4.3.1.4.5 Regeneration der Mannan III-OF mit aMP und TritonX 100

Im Zusammenhang mit den Tests bezüglich des Protokolls Mannan III wurde auch ein Regenerationsexperiment unternommen, welches prüfen sollte, ob die Funktionalisierung nach Protokoll Mannan III etwas am Regenerationserfolg ändert. Dazu wurde ein Chip verwendet, auf dem nach 300 s Basislinienaufnahme zunächst zweimal ConA (100 µg/ml; 80 µl) immobilisiert wurde, gefolgt von jeweils einer aMP-Injektion (10%, 150 µl). Daraufhin wurden nacheinander ConA-SAv (50 µg/ml; 80 µl), ein bAK (anti-Legionella-AK AK237746; 50 µg/ml; 80 µl) und Legionellen-Lipopolysaccharide (unverdünnte Probe bereitgestellt vom FzMB; 50 µl) appliziert. Anschließend wurde wieder aMP (10%, 150 µl) injiziert und nach 600 s Dissoziati-

onsphase TritonX 100 (0,1%, 80 µl). Um zu testen, ob die Mannan-OF durch die Regenerationschritte beeinträchtigt worden ist, wurden noch einmal ConA (100 µg/ml; 80 µl) und aMP (10%, 150 µl) injiziert. Das Resultat, gemessen unter MSP2, ist in Abb. 4.78 dargestellt.

Das ConA der beiden Applikationen zu Beginn des Experiments ließ sich wie gewohnt mit aMP von der OF entfernen. Die ConA-SAV-Injektion lieferte eine OSD von 3342 IU, die bAK-Applikation eine OSD von 1907 IU und die LPS-Applikation eine OSD von 1476 IU. Insgesamt beträgt der Signalzuwachs des Gesamtkonstrukts vom Zeitpunkt der ConA-SAV-Injektion bis zum Zeitpunkt der aMP-Injektion 6725 IU. Die aMP-Gabe reduzierte das Sensorsignal am Ende der Dissoziationsphase um lediglich 1066 IU bzw. um 15,9%. Die darauf folgende TritonX 100-Injektion reduzierte das Signal um 4709 IU bzw. 83,2%. Insgesamt kam es mit aMP und TritonX 100 zu einer Regeneration von 85,9%. Bei der folgenden ConA-Injektion stieg das Sensorsignal wieder stark an bis zu dem Niveau der OSD, die bei der zweiten ConA-Injektion im Rahmen des Mannan-Tests vor der ConA-SAV-Injektion gemessen worden ist. Eine weitere Injektion von aMP führte wieder zu einer Regeneration.



**Abb. 4.78: Regenerationsexperimente mit aMP und TRitonX 100 auf einer Mannan-OF (Funktionalisierung gemäß Protokoll Mannan III).** ConA – zum Test auf Mannan; aMP – Regenerationslösung; FP – ConA-SAV; bAK – biotinylierter anti-Legionella-AK (AK237746); LPS – Legionellen-Lipopolysaccharid-Lösung; Triton – 0,1% TritonX 100. Gemessen wurde unter MSP2.

### 4.3.2 Mannan-Funktionalisierung von Mikrotiterplatten

Die Experimente, welche in diesem Kapitel präsentiert werden, gingen aus einem Kontrollexperiment hervor, das im Anschluss an die RfS-Experimente mit Mannan auf OTS-Chips unternommen wurde. Da es zunächst unklar war, warum Mannan auf hydrophoben OTS-Chips immobilisierbar ist, wurde ein Versuch unternommen Mannan auch auf hydrophoben Mikrotiterplatten aus Polystyrol zu immobilisieren. Aus diesem Experiment erwuchs die Idee, dass sich mit mannanfunktionalisierten Mikrotiterplatten leicht die Eigenschaften von neuen ConA-basierten Fusionsproteinen testen lassen. Anders als mit Biosensoren, mit denen ein einziges bis wenige Experimente gleichzeitig durchgeführt werden können, kann man in 96er Mikrotiterplatten bis zu 96 Experimente unter verschiedenen Bedingungen durchführen.

Die pipettierten Volumina betragen stets 200 µl/Well. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) auf einem Rüttler bei 300 rpm. Zwischen den Pipettierschritten wurde jedes Well drei mal mit einem Puffer gewaschen, indem 200 µl des Puffers in die Wells gegeben und 10 min auf dem Rüttler bei 300 rpm inkubiert wurden. Nach jedem dieser Waschschrte wurde die Mikrotiterplatte auf einem Tuch ausgeklopft und sofort wieder befüllt. Abweichungen werden im Folgenden speziell angegeben. Die Farbreaktion wurde wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben ausgelöst.

#### 4.3.2.1 Experimente mit ConA

Im Folgenden wird die Idee der Mannanfunktionalisierung von Mikrotiterplatten unter Verwendung von ConA ausgearbeitet.

##### 4.3.2.1.1 Immobilisierung von Mannan auf Polystyrol

Im ersten Experiment wurde getestet, ob sich Mannan auf Polystyrol immobilisieren lässt. Die Tab. 4.25 zeigt das Pipettierschema. Für „Test“ wurde wie folgt vorgegangen: Immobilisiert wurde eine Lösung von 5 mg/ml Mannan in Boratpuffer pH 10 und über 24 h inkubiert. Nach dem Waschen

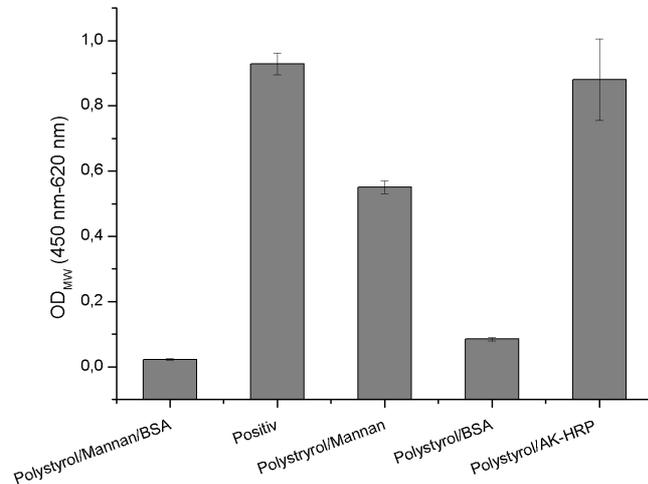
Tab. 4.25: Pipettierschema 1

Polystyrol/Mannan/BSA (Kontrolle 1)	Positiv	Polystyrol/ Mannan (Kontrolle 2)	Polystyrol/BSA (Kontrolle 3)	Polystyrol/AK-HRP (Kontrolle 4)
4x	4x	4x	4x	4x
Mannan	Mannan	Mannan	-	-
BSA	BSA	-	BSA	AK-HRP
-	<b>ConA</b>	-	-	-
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	-

wurde mit BSA (1000 µg/ml in PBS pH 7,3) für 1 h inkubiert (200 rpm). Nach erneutem Waschen wurde ConA (1000 µg/ml in PBS pH 7,3) appliziert und 1 h inkubiert (200 rpm). Darauf folgten drei weitere Waschschrte und die Inkubation mit anti-ConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) für 1,5 h (200

## 4 | ERGEBNISSE

rpm). Anschließend wurde die Farbreaktion ausgelöst. In „Kontrolle 1“ wurde kein ConA appliziert und in „Kontrolle 2“ weder BSA noch ConA. In „Kontrolle 3“ fehlten Mannan und ConA und in „Kontrolle 4“ Mannan, BSA und ConA. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 4.22 dargestellt.



**Abb. 4.79: Mannanfunktionalisierung auf Polystyrol.**  
X-Achsen-Rubriken s. Pipettierschema 1 (Tab. 4.25);  
N=4

Kontrolle 4 zeigt, dass das AK-HRP-Konjugat unspezifisch an Polystyrol bindet. Aus Kontrolle 3 geht hervor, dass eine Blockierung der Polystyrol-OF mittels BSA die unspezifische Bindung von AK-HRP drastisch verringert. Aus Kontrolle 2 folgt, dass eine Mannanfunktionalisierung nicht ausreicht, um das unspezifische Binden von AK-HRP stark zu verringern. In dem Fall ist ein hohes Hintergrundsignal zu erwarten. Kontrolle 1 zeigt den kombinierten Effekt von Mannan und BSA-Blockierung. In diesem Fall ist mit dem geringsten Hintergrund zu rechnen. Das Positiv (=Test in Pipettierschema) zeigt, dass nach ConA-Applikation auf einer mannanfunktionalisierten und BSA-blockierten Polystyrol-OF hohe Signale messbar sind.

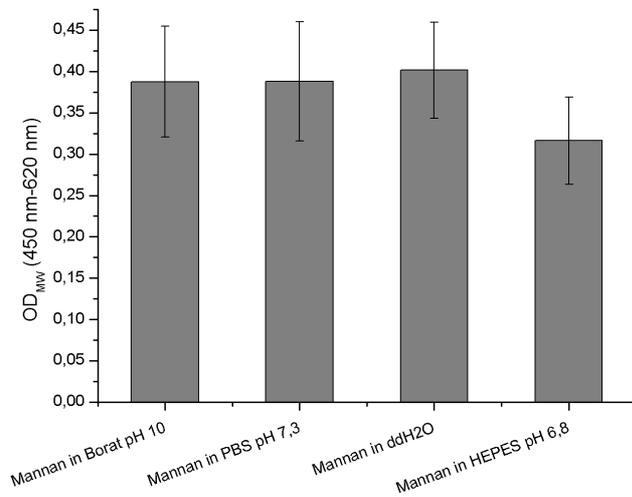
### 4.3.2.1.2 Mannan-Immobilisierung auf Polystyrol in verschiedenen Puffern

Im nächsten Set an Experimenten wurde getestet, ob die Wahl des Puffers Auswirkungen auf den Mannan-Immobilisierungserfolg in Polystyrol-Mikrotiterplatten hat. In Tab. 4.26 findet sich das Pipettierschema. Wieder wurde Mannan in einer Konzentration von 5 mg/ml verwendet. Gelöst wurde es jeweils in Boratpuffer pH 10, PBS pH 7,3, doppeldestilliertem Wasser (ddW) und HEPES pH 7,3. Danach wurde mit BSA (1000 µg/ml in PBS pH 7,3) blockiert, ConA (200 µg/ml in PBS pH 7,3) appliziert und schließlich antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) dazu pipettiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten jeweils drei Waschschr

**Tab. 4.26: Pipettierschema 2**

1	2	3	4
4x	4x	4x	4x
Mannan (Borat)	Mannan (PBS)	Mannan (ddW)	Mannan (HEPES)
BSA	BSA	BSA	BSA
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP

Weise. Als letztes wurde die Farbreaktion ausgelöst. Das Resultat der Experimente ist in Abb. 4.80 illustriert.



**Abb. 4.80: Abhängigkeit der Mannan-Funktionalisierung von Puffer bzw. pH-Wert.**  
X-Achsen-Rubriken geben Puffer und pH-Wert an; N=4

Die Puffersysteme bzw. die pH-Werte scheinen für die Immobilisierung nicht von Bedeutung zu sein. Deshalb wurde die Immobilisierung von Mannan ab diesem Zeitpunkt in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

#### 4.3.2.1.3 Konzentration von Mannan

Als Nächstes wurde bestimmt, wie viel Mannan für eine effektive Funktionalisierung von Mikrotiterplatten-Wellen nötig ist. Dazu wurde je 200 µl Mannan der Konzentrationen 8, 5, 3 und 1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O in je 4 Wells gegeben. Danach wurde wieder mit BSA (1000 µg/ml in PBS pH 7,3) blockiert, ConA (200 µg/ml in PBS

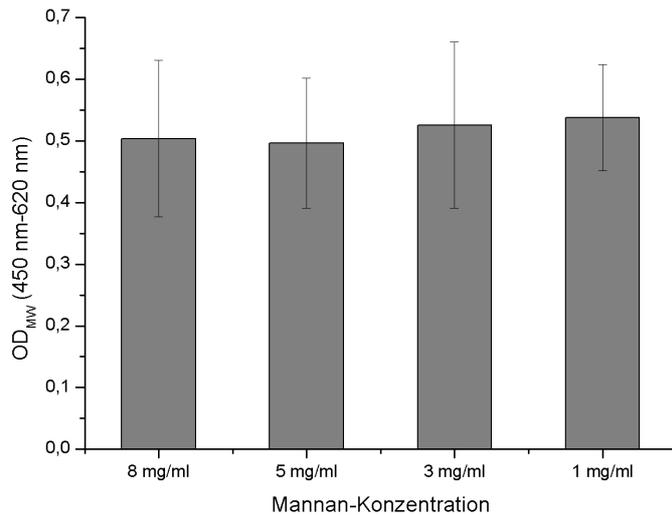
pH 7,3) appliziert und zuletzt antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) hinzu pipettiert. Zwischen den Schritten wurde wie-

**Tab. 4.27: Pipettierschema 3**

1	2	3	4
4x	4x	4x	4x
8 mg/ml Mannan	5 mg/ml Mannan	3 mg/ml Mannan	1mg/ml Mannan
BSA	BSA	BSA	BSA
ConA	ConA	ConA	ConA
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP

der in der oben angegebenen Weise gewaschen. Als Letztes wurde die Farbreaktion ausgelöst. Das Pipettierschema ist in Tab. 4.27 illustriert und das Resultat der Experimente in Abb. 4.81. Die Farbreaktion zeigt, dass es unter den gegebenen Bedingungen keinen wesentlichen Unterschied im Immobilisierungserfolg ergibt, wenn Konzentration zwischen 1 µg/ml und 8 µg/ml verwendet werden. Im Folgenden wird mit 1 mg/ml weitergearbeitet.

## 4 | ERGEBNISSE



**Abb. 4.81: Immobilisierung mit versch. Mannan-Konzentrationen.** X-Achsen-Rubriken geben Konzentration von Mannan in ddH<sub>2</sub>O an; N=4

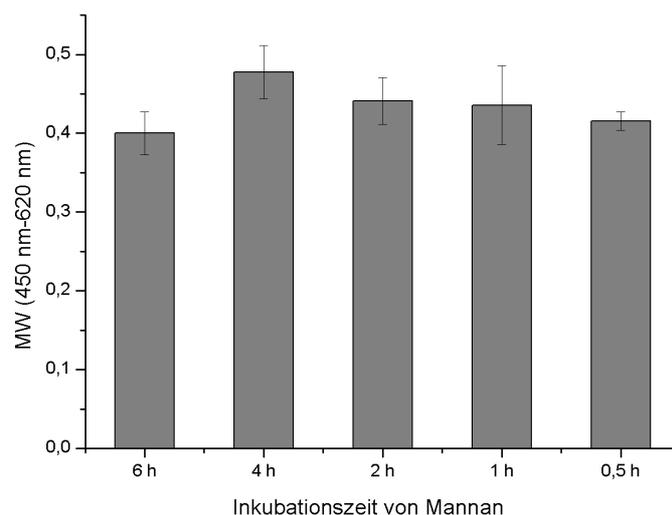
### 4.3.2.1.4 Inkubationszeit von Mannan auf Polystyrol

Anschließend wurde getestet, wie lange man inkubieren muss, um 1 mg/ml Mannan in ddH<sub>2</sub>O effektiv auf Polystyrol zu immobilisieren. Dazu wurde eine entsprechende Mannanlösung 6, 4, 2, 1, ½ h vor der Auslösung der Farbreaktion in je vier Wells pipettiert. Anschließend wurde mit BSA

**Tab. 4.28: Pipettierschema 4**

1	2	3	4	5
4x	4x	4x	4x	4x
M 6h	M 4h	M 2h	M 1h	M 1/2h
BSA	BSA	BSA	BSA	BSA
ConA	ConA	ConA	ConA	ConA
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP

(1000 µg/ml in PBS pH 7,3) blockiert und ConA (200 µg/ml in PBS pH 7,3) appliziert.



**Abb. 4.82: Mannan-Inkubationszeit** X-Achsen-Rubriken geben die Inkubationszeiten von Mannan in ddH<sub>2</sub>O an; N=4

Dann wurde antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) in jedes Well pipettiert. Auf jeden Schritt folgten wie oben angegeben drei Waschschrirte mit PBS pH 7,3. Zuletzt wurde die Farbreaktion ausgelöst. Tabelle 4.28 zeigt das Pipettierschema und Abb. 4.82 die Resultate. Aufgrund der Ergebnisse wurde die Mannan-Lösung (1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) in Mikrotiterplatten-Wells nur noch für 30 min inkubiert.

4.3.2.1.5 Konzentration von BSA zum Blockieren

Um zu testen, welche BSA-Konzentration nötig ist, um möglichst wenig Hintergrundsignal zu erhalten, wurde eine BSA-Verdünnungsreihe unternommen. Als erstes wurden die Wells mit Mannan (1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, 30 min Inkubation) funktionalisiert. Anschließend wurde mit 200 µl BSA unterschiedlicher Konzentration (10, 50, 100, 250, 500 und 1000 µg/ml in PBS pH 7,3) blockiert und dann ConA (200 µg/ml in PBS pH 7,3) appliziert. Zuletzt wurde antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) in jedes Well pipettiert. Auf jeden Schritt

folgten wie oben angegeben drei Waschschrirte mit PBS pH 7,3. Zuletzt wurde die Farbreaktion ausgelöst. Tabelle 4.29 zeigt das Pipettierschema und Abb. 4.83 die Resultate.

Tab. 4.29: Pipettierschema 5

1	2	3	4	5	6
6x	6x	6x	6x	6x	6x
Mannan BSA 1000	Mannan BSA 500	Mannan BSA 250	Mannan BSA 100	Mannan BSA 50	Mannan BSA 10
-	-	-	-	-	-
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP

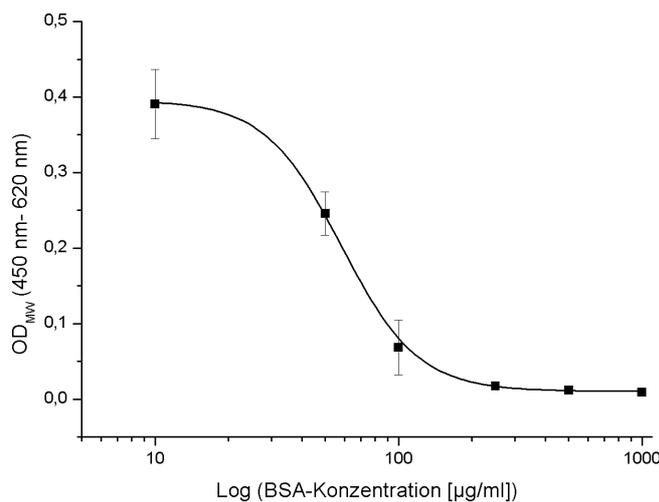


Abb. 4.83: BSA-Blockierungs-Konzentration. Halblogarithmische Darstellung der mittleren OD nach Farbreaktion in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration; N=6

Ab einer Konzentration von 250 µg/ml BSA (200 µl) verändert sich das Signal nicht mehr wesentlich. Daher wird im Folgenden mit dieser Konzentration blockiert.

4.3.2.1.6 ConA-Verdünnungsreihe

Um zu testen, welche ConA-Kapazität die mannanfunktionalisierten Wells besitzen, wurde eine ConA-Konzentrationsreihe gemessen. Wieder wurden die Wells mit Mannan (1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, 30 min Inkubation) funktionalisiert und anschließend mit BSA (250 µg/ml in PBS pH 7,3) unspezifische Bindestellen blockiert. Dann wurde ConA unterschiedlicher Konzentration (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml in PBS pH 7,3) appliziert. Zuletzt wurde wieder antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) in jedes Well pipettiert. Auf jeden Schritt folgten wie oben angegeben drei Waschschrirte mit PBS pH 7,3. Zuletzt wurde die Farbreaktion ausgelöst. Tabelle 4.30 zeigt das Pipettierschema und

## 4 | ERGEBNISSE

Abb. 4.84 die Resultate. Aus Abb. 4.84 geht hervor, dass die Sättigungskonzentration bei etwa 100 µg/ml liegt.

Tab. 4.30: Pipettierschema

1	2	3	4	5	6	7
6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x
Mannan BSA ConA1000 aConA-HRP	Mannan BSA ConA500 aConA-HRP	Mannan BSA ConA100 aConA-HRP	Mannan BSA ConA50 aConA-HRP	Mannan BSA ConA10 aConA-HRP	Mannan BSA ConA5 aConA-HRP	Mannan BSA ConA1 aConA-HRP

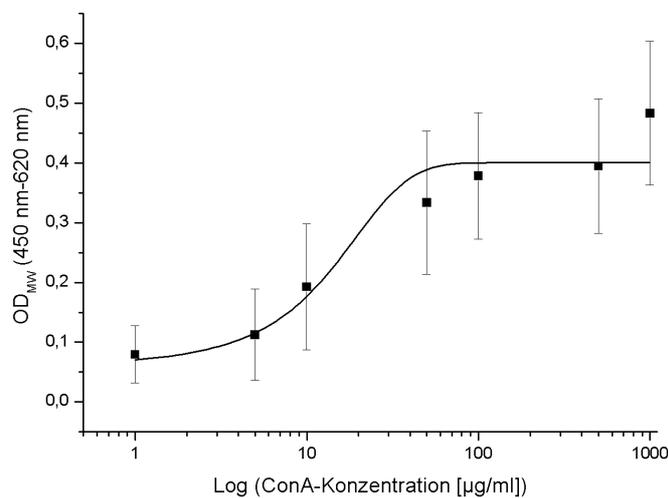


Abb. 4.84: ConA-Verdünnungsreihe  
halblogarithmische Darstellung der mittleren OD nach Farbreaktion in Abhängigkeit von der ConA-Konzentration; N=6

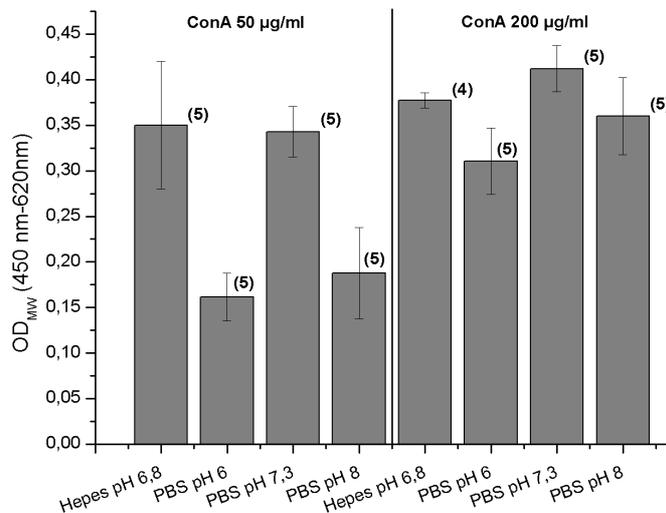
### 4.3.2.1.7 Pufferabhängigkeit der ConA-Immobilisierung

Als nächstes wurde getestet, welchen Einfluss der Puffer, in dem ConA gelöst ist, auf den Immobilisierungserfolg hat. Um das herauszufinden wurden je Puffer ConA-Konzentrationen von 50 µg/ml und 200 µg/ml verwendet. Die Mannanfunktionalisierung erfolgte wieder mit einer Lösung der Konzentration 1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O (30 min Inkubation) und die BSA-Blockierung mit einer Konzentration von 250 µg/ml. Danach folgte die ConA- und als letztes die antiConA-HRP-Zugabe (1:1000 in PBS pH 7,3). Auf die einzelnen Schritte folgte stets die angegebene Waschprozedur. Das Pipettierschema zeigt Tab. 4.31, die Resultate werden in Abb. 4.85 illustriert. Aus der Abb. 4.85 ist zu entnehmen, dass es bei beiden ConA-Konzentrationen für die Immobilisierung unerheblich ist, ob HEPES 3 pH 6,8 oder PBS pH 7,3 verwendet wird. Die Signale fallen sehr ähnlich aus.

**Abb. 4.31: Pipettierschema 7.** H – Hepes P – PBS; (Immobilisierungspuffer zur Lösung von ConA);

1	2	3	4	5	6
6x	6x	6x	6x	6x	6x
Mannan BSA ConA200 H pH 6,8 aConA-HRP	Mannan BSA ConA200 P pH 6 aConA-HRP	Mannan BSA ConA200 P pH 7,3 aConA-HRP	Mannan BSA ConA200 P pH 8 aConA-HRP	Mannan BSA ConA50 H pH 6,8 aConA-HRP	Mannan BSA ConA50 P pH 6 aConA-HRP
7	8				
6x	6x				
Mannan BSA ConA 50 P pH 7,3 aConA-HRP	Mannan BSA250 ConA 50 P pH 8 aConA-HRP				

Die Signale, die bei der Immobilisierung von ConA PBS pH 6 und PBS pH 8 gemessen worden sind, fallen für beide Konzentrationen niedriger aus. Im Folgenden wird PBS pH 7,3 verwendet.



**Abb. 4.85: Puffer-Abhängigkeit der ConA-Immobilisierbarkeit**

X-Achsen-Rubriken geben die verschiedenen Puffer und pH-Werte an, in denen ConA zur Immobilisierung vorlag. Die Experimente wurden für jeden Puffer mit zwei ConA-Konzentrationen durchgeführt (50 µg/ml; 200 µg/ml); Zahlen in Klammern geben Anzahl N der Experimente an.

Die in diesem Versuch erhobenen Daten sind dem Shapiro-Wilk-Test zufolge normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ), so dass eine ANOVA durchgeführt werden konnte. Levene's Tests auf Varianzhomogenität ergab, dass es keine signifikanten

**Tab. 4.32: Ergebnisse eines Tukey-Tests im Rahmen einer ANOVA.** SIG – kennzeichnet Unterschied der Stichproben-Mittelwerte: 1 – signifikant; 0 - nicht signifikant.

Puffersystem bei ConA 50 µg/ml	SIG	Puffersystem bei ConA 200 µg/ml	SIG
PBS pH 6 vs. Hepes pH 6,8	1	PBS pH 6 vs. Hepes pH 6,8	0
PBS pH 7 vs. Hepes pH 6,8	0	PBS pH 7 vs. Hepes pH 6,8	0
PBS pH 7 vs. PBS pH 6	1	PBS pH 7 vs. PBS pH 6	0
PBS pH 8 vs. Hepes pH 6,8	1	PBS pH 8 vs. Hepes pH 6,8	0
PBS pH 8 vs. PBS pH 6	0	PBS pH 8 vs. PBS pH 6	0
PBS pH 8 vs. PBS pH 7	1	PBS pH 8 vs. PBS pH 7	0

## 4 | ERGEBNISSE

Unterschiede in den Stichprobenvarianzen gibt ( $\alpha=0,05$ ). Im Fall der 200  $\mu\text{g/ml}$ -Konzentration konnte durch die ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Stichproben festgestellt werden ( $\alpha=0,05$ ).

Im Fall der 50  $\mu\text{g/ml}$ -Konzentration dagegen wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $\alpha=0,05$ ). Der Unterschied in den Daten bezüglich der 50  $\mu\text{g/ml}$ -Experimente wird durch einen Tukey-Test aufgedeckt (Tab. 4.32). Unterschiede ergeben sich lediglich bei 50  $\mu\text{g/ml}$ . Aufgrund der Ergebnisse wird im Folgenden mit PBS pH 7,3 gearbeitet. HEPES 3 pH 6,8 wäre eine Alternative.

### 4.3.2.1.8 Regenerationsexperimente

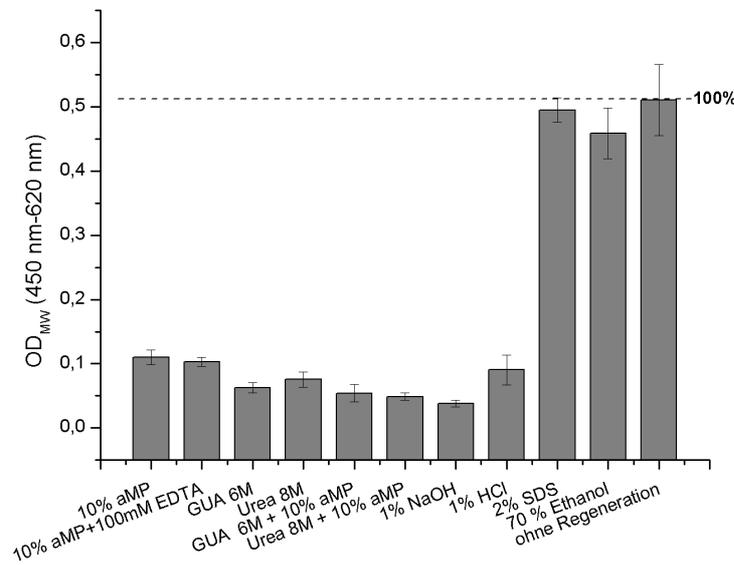
Die in den vorherigen Kapiteln ausgearbeitete Mannan-OF in Mikrotiterplatten ist nur dann von Nutzen, wenn sich die OF regenerieren lässt. Aus diesem Grund wurde eine Reihe Experimente mit verschiedenen Regenerationsreagenzien durchgeführt. Die Mannan-OF wurde gemäß den Resultaten der vorherigen Kapitel präpariert (Mannan 1  $\mu\text{g/ml}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 30 min Inkubation). BSA wurde in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$  appliziert, ConA in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . Den einzelnen Schritten folgten Waschschrte. Anschließend wurde die Regenerationslösung pipettiert (10% aMP; 10% aMP + 100 mM EDTA; 8M Urea; 8M Urea + 10% aMP; 1% NaOH; 1% HCl; 2% SDS; 70% Ethanol) und 1 h inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrte an gefolgt von einer 2. BSA-Applikation. Diese diente der Blockierung unspezifischer Bindestellen, welche durch die

**Abb. 4.33: Pipettierschema 8**

1	2	4	7	9	10	11	12
8x	8x	8x	8x	8x	8x	8x	8x
Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan
BSA250	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250
ConA100	ConA100	ConA100	ConA100	ConA100	ConA100	ConA100	ConA100
10% aMP	EDTA/aMP	UREA 8M	UREA/aMP	1% NaOH	1% HCl	SDS 2%	Ethanol
BSA250	BSA250	PBS200	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250	BSA250
AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP	AK-HRP

härteren Regenerationsmaßnahmen verursacht worden sein könnten. Danach wurde antiConA-HRP (1:1000 in PBS pH 7,3) zugegeben, erneut gewaschen und schließlich die Farbreaktion ausgelöst. Zur Kontrolle wurden in einigen Wells keine Regenerationsreagenzien zugesetzt, um so eine 100%-Baseline zur Quantifizierung der Regeneration zu etablieren (s. „ohne Regeneration in Abb. 4.86). In Abb. 4.86 sind die Resultate der Experimente illustriert und in Tab. 4.33 das entsprechende Pipettierschema. Die Daten zeigen für alle Regenerationsmittel gegenüber der 100%-Marke für die Messung ohne vorherige Regeneration einen deutlichen Rückgang der OD außer bei den Reagenzien 70%

Ethanol und 2% SDS. Laut Shapiro-Wilk sind die Daten normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ). Eine ANOVA zeigt an, dass die Mittelwerte der Stichproben signifikant verschieden sind ( $\alpha=0,05$ ).



**Abb. 4.86: Regeneration mit verschiedenen Reagenzien.**

X-Achsen-Rubriken geben die verschiedenen Regenerationsmittel an. „ohne Regeneration“ gibt Signalthöhe ohne Regeneration an (=100% gesetzt).

N=6 (Ausnahmen: N(Urea 8M+aMP)=5; N(1% NaOH)=5)

Ein Levene's Test jedoch zeigt, dass die Varianzen nicht homogen sind ( $\alpha=0,05$ ). Wenn man die Daten für 70% Ethanol, 2% SDS und „ohne Regeneration“ aus dem Vergleich ausschließt, wird Varianzhomogenität festgestellt. Hier werden dann die Effekte der Regenerationsmittel untereinander getestet. Tukey's Test ergibt, dass alle Stichproben sich paarweise signifikant unterscheiden. Ein Sidak-Test dagegen findet signifikante Unterschiede gemäß der Tabelle 4.12. Demgemäß ist 1% NaOH das effektivste Regenerationsmittel, gefolgt von 8 M Harnstoff plus 10% aMP, 6 M Guanidinhydrochlorid, und 8 M Harnstoff.

**Tab. 4.34: Ergebnisse des Sidak-Tests.** Vergleich – verglichene Datensätze; SIG – kennzeichnet signifikante (1) und nicht-signifikante (0) Unterschiede; ( $\alpha=0,05$ ).

Vergleich	SIG	Vergleich	SIG	Vergleich	SIG
10% aMP+100mM EDTA vs. 10% aMP	0	Urea 8M + 10% aMP vs. 10% aMP	1	1% NaOH vs. Urea 8M + 10% aMP	0
GUA 6M vs. 10% aMP	1	Urea 8M + 10% aMP vs. 10% aMP+100mM EDTA	1	1% HCl vs. 10% aMP	0
GUA 6M vs. 10% aMP+100mM EDTA	1	Urea 8M + 10% aMP vs. GUA 6M	0	1% HCl vs. 10% aMP+100mM EDTA	0
Urea 8M vs. 10% aMP	1	Urea 8M + 10% aMP vs. Urea 8M	1	1% HCl vs. GUA 6M	1
Urea 8M vs. 10% aMP+100mM EDTA	1	Urea 8M + 10% aMP vs. GUA 6M + 10% aMP	0	1% HCl vs. Urea 8M	0
Urea 8M vs. GUA 6M	0	1% NaOH vs. 10% aMP	1	1% HCl vs. GUA 6M + 10% aMP	1

## 4 | ERGEBNISSE

GUA 6M + 10% aMP vs. 10% aMP	1	1% NaOH vs. 10% aMP+100mM EDTA	1	1% HCl vs. Urea 8M + 10% aMP	1
GUA 6M + 10% aMP vs. 10% aMP+100mM EDTA	1	1% NaOH vs. GUA 6M	0	1% HCl vs. 1% NaOH	1
GUA 6M + 10% aMP vs. GUA 6M	0	1% NaOH vs. Urea 8M	1		
GUA 6M + 10% aMP vs. Urea 8M	0	1% NaOH vs. GUA 6M + 10% aMP	0		

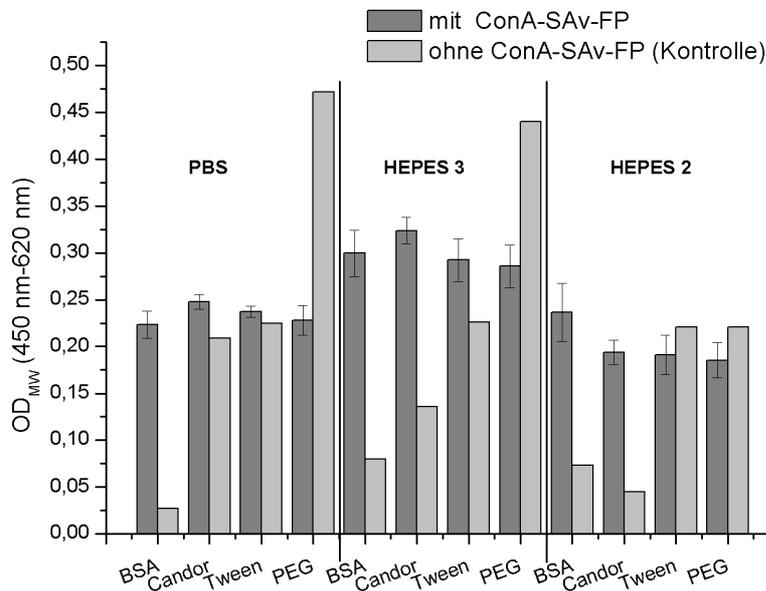
### 4.3.2.2 Experimente mit ConA-SAv-FP

Durch die Experimente, die in Kapitel 4.3.2.3 präsentiert worden sind, konnten Bedingungen für eine effektive Mannan-Funktionalisierung festgestellt werden. Außerdem wurden einige Experimente mit ConA unternommen, welche auf dessen möglichst effektive Immobilisierbarkeit abzielten. Das Mikrotiterplatten-Mannan-Setup wurde nun auf ConA-SAv angewendet. In den Experimenten wurden folgende Parameter nicht verändert: Die Mannan-Funktionalisierung wurde stets mit 200 µl Mannan der Konzentration 1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 30 min und wurde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler bei 200 rpm unternommen. Nach jedem Schritt wurden jeweils drei Waschschrte mit PBS pH 7,3 auf dem Rüttler (200 rpm) durchgeführt, um nicht gebundenes Material zu entfernen (wenn nicht anders angegeben). Die Inkubation von Proteinen dauerte jeweils 1 h.

#### 4.3.2.2.1 Einfluss des Puffers auf ConA-SAv-Immobilisierung

Um den Einfluss des Puffers und des Blockierers auf die Immobilisierung von ConA-SAv zu ermitteln, wurden nach Mannan-Funktionalisierung je 200 µl von verschiedenen Blockierern pipettiert: 250 µg/ml BSA in PBS pH 7,3, Candor-Puffer unverdünnt, 1 mg/ml PEG6000 in PBS pH 7,3, 0,05% Tween 20 in PBS pH 7,3. Anschließend wurden 200 µl ConA-SAv-FP einer Konzentration von 100 µg/ml in verschiedenen Puffern in die Wells pipettiert. Getestet wurden PBS pH 7,3 (PBS), Hepes 2 (H2) und Hepes 3 (H3) (s. Tab. 3.6, Kapitel 3.1). Die Waschschrte zwischen der Blockierung und der ConA-SAv-Immobilisierung wurde in den verschiedenen Wells mit demjenigen Puffer durchgeführt, in welchem die entsprechenden ConA-SAv-Immobilisierungen stattfinden sollten. Nach der ConA-SAv-Immobilisierung wurde für die Waschschrte wieder PBS pH 7,3 verwendet. Zum Nachweis der erfolgreichen ConA-SAv-Immobilisierung wurden dann 200 µl eines anti-Streptavidin-Primärantikörpers (αSav) in einer 1:1000-Verdünnung in jedes Well pipettiert. Zuletzt erfolgte die Applikation von 200 µl eines Sekundärantikörper-HRP-Konjugats (αAK-HRP) gegen αSav in einer

1:10000-Verdünnung. Auslösen der Farbreaktion lieferte die in Abb. 4.87 gezeigten Resultate. Tabelle 4.35 zeigt das entsprechende Pipettierschema.



**Abb. 4.87: ConA-SAv-Immobilisierung mit verschiedenen Puffern und Blockierungsreagenzien.** X-Achsen-Rubriken geben die verschiedenen Blockierer an. 250 µg/ml BSA; Candor „The Blocking Solution“, unverdünnt; 0,05% Tween 20; 1 mg/ml PEG 6000; je Blockierer wurden Experimente in PBS pH 7,3, HEPES 3 pH 6,8 und HEPES 2 pH 6,8 (mit 5,5% Glycerol) durchgeführt; N=6.

Laut Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test sind alle Daten (N=6) normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ). Im Rahmen einer ANOVA zeigte ein Levene's Test innerhalb der PBS-, HEPES 3-, und HEPES 2-Gruppen, dass die Varianzen nicht signifikant unterschiedlich sind ( $\alpha=0,05$ ). Die ANOVA ergibt signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben ( $\alpha=0,05$ ). Mit einem Sidak-Test wurden in der PBS-Gruppe ein signifikanter Unterschiede zwischen der Candor- und der BSA-Blockierung festgestellt und in der HEPES 3-Gruppe zwischen der PEG- und der Candor-Blockierung. Für die HEPES 2-Gruppe wurden signifikante Unterschiede zwischen folgenden Blockierungen festgestellt: Candor vs. BSA, Tween vs. BSA, PEG vs. BSA ( $\alpha=0,05$ ). Das Kontroll-Experiment, welches zu allen Blockierungsexperimenten in PBS unternommen worden ist, zeigt, dass ohne ConA-SAv nur im Fall von BSA ein niedriges Hintergrundsignal entsteht. In HEPES 3 liefert das Kontrollexperiment zu jeder Versuchsreihe im Fall von BSA das niedrigste Hintergrundsignal. Im Fall von HEPES 2 wurde für die Candor-Blockierung der geringsten Hintergrund festgestellt, wobei das Kontrollexperiment im BSA-Fall nur wenig größer ausfällt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mannan BSA FP100(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan BSA FP100(H3) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(H3) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(H3) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(H3) αSav αAK-HRP	Mannan BSA FP100(H2) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(H2) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(H2) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(H2) αSav αAK-HRP
1x	6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x	6x
1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Mannan BSA - αSav αAK-HRP	Mannan Candor - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - αSav αAK-HRP	Mannan PEG - αSav αAK-HRP	Mannan BSA - αSav αAK-HRP	Mannan Candor - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(H3) αSav αAK-HRP	Mannan BSA FP100(H2) αSav αAK-HRP	Mannan Candor - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - αSav αAK-HRP	Mannan PEG - αSav αAK-HRP

Tab. 4.35: Pipettierschema 9

Da BSA am besten geeignet erscheint, um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurden auch die Daten via ANOVA verglichen, die sich unter den verschiedenen Pufferbedingungen bei einer BSA-Blockierung ergaben. Levene's Test auf Varianzhomogenität stellte keine signifikanten Unterschiede fest ( $\alpha=0,05$ ). Die Overall-ANOVA stellte jedoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Datensätzen fest ( $\alpha=0,05$ ). Der Sidak-Test zum Vergleich der Mittelwerte zeigt auf, dass Unterschiede bei dem Vergleich der PBS-Daten und HEPES 3-Daten und der HEPES 3- und HEPES 2-Daten bestehen ( $\alpha=0,05$ ). Die Ergebnisse der Sidak-Tests zum Blockierervergleich sind in Tab. 4.36 zusammengefasst und die für den Puffervergleich in BSA in Tab. 4.37.

**Tab. 4.36: Ergebnisse des Sidak-Tests zum Vergleich der Mittelwerte beim Blockierer-Vergleich.** Blockierer-Vergleich – verglichenes Blockierer-Paar; PBS SIG - kennzeichnet signifikant unterschiedliche PBS-Datensätze; HEPES 3 SIG - kennzeichnet signifikant unterschiedliche HEPES 3-Datensätze; PBS SIG - kennzeichnet signifikant unterschiedliche HEPES 2-Datensätze: nicht signifikant (0), signifikant (1);  $\alpha=0,05$ .

<b>Blockierer-Vergleich</b>	PBS SIG	HEPES 3 SIG	HEPES 2 SIG
<b>Candor vs. BSA</b>	1	0	1
<b>Tween vs. BSA</b>	0	0	1
<b>Tween vs. Candor</b>	0	0	0
<b>PEG vs. BSA</b>	0	0	1
<b>PEG vs. Candor</b>	0	1	0
<b>PEG vs. Tween</b>	0	0	0

**Tab. 4.37: Ergebnisse des Sidak-Tests zum Vergleich der Mittelwerte beim Puffervergleich.** Puffer-Vergleich – verglichenes Puffer-Paar bei BSA-Blockierung; SIG - kennzeichnet signifikant unterschiedliche Datensätze: nicht signifikant (0), signifikant (1); PBS pH 7,3; HEPES pH 6,8;  $\alpha=0,05$

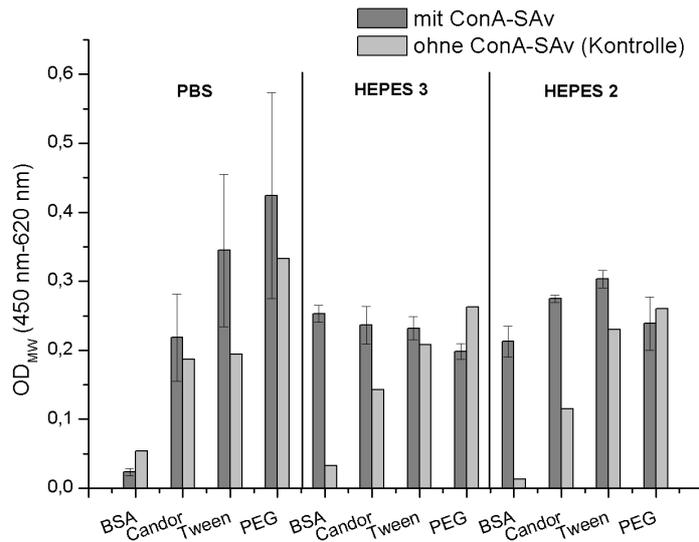
<b>Puffer-Vergleich (BSA)</b>	SIG
<b>HEPES 3 vs. PBS</b>	1
<b>HEPES 2 vs. PBS</b>	0
<b>HEPES 2 vs. PBS</b>	1

#### 4.3.2.2.2 Einfluss des Puffers auf ConA-SAv-Regeneration mit aMP

Im nächsten Schritt wurde die Regeneration der Oberfläche in Abhängigkeit des Puffers und des Blockierers untersucht. Dazu wurde das Versuchsprotokoll bzw. Pipettierschema des vorhergehenden Kapitels verwendet, jedoch wurde nach der Applikation des ConA-SAv-FP dreimal mit dem Puffer gewaschen, indem auch die Immobilisierung stattfand. Anschließend wurde ein aMP-Regenerationsversuch mit jeweils 200  $\mu$ l aMP (10%) in demjenigen Puffer unternommen, der im entsprechenden Well schon zur Immobilisierung und zum Waschen Verwendung fand. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen und mit der Zugabe von  $\alpha$ Sav und zuletzt  $\alpha$ AK-HRP fortgefahren. Unter diesen Bedingungen fanden jeweils sechs Experimente statt. Außerdem wurde je ein Kontroll-experiment durchgeführt: einmal ohne ConA-SAv und aMP und einmal ohne Blockierer und aMP. Das entsprechende Pipettierschema findet sich in Tab. 4.38 und die Resultate in Abb. 4.88. Wie Abb. 4.89 zeigt, sind die besten Regenerationserfolge in PBS bei BSA-Blockierung zu erzielen. Mit dem Grubbs' Test auf Ausreißer wurde ein Datum der BSA/PBS-Messungen als Ausreißer erkannt. Das Datum wurde nicht aus der Population entfernt (s. Diskussion).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mannan BSA FP100(PBS) aMP(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(PBS) aMP(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(PBS) aMP(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(PBS) aMP(PBS) αSav αAK-HRP	Mannan BSA FP100(H3) aMP(H3) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(H3) aMP(H3) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(H3) aMP(H3) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(H3) aMP(H3) αSav αAK-HRP	Mannan BSA FP100(H2) aMP(H2) αSav αAK-HRP	Mannan Candor FP100(H2) aMP(H2) αSav αAK-HRP	Mannan Tween FP100(H2) aMP(H2) αSav αAK-HRP	Mannan PEG FP100(H2) aMP(H2) αSav αAK-HRP
1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Mannan BSA - - αSav αAK-HRP	Mannan Candor - - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - - αSav αAK-HRP	Mannan PEG - - αSav αAK-HRP	Mannan BSA - - αSav αAK-HRP	Mannan Candor - - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - - αSav αAK-HRP	Mannan PEG - - αSav αAK-HRP	Mannan BSA - - αSav αAK-HRP	Mannan Candor - - αSav αAK-HRP	Mannan Tween - - αSav αAK-HRP	Mannan PEG - - αSav αAK-HRP
1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Mannan FP100(PBS) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(PBS) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(PBS) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(PBS) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H3) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H3) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H3) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H3) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H2) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H2) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H2) - αSav αAK-HRP	Mannan - FP100(H2) - αSav αAK-HRP

Tab. 4.36: Pipettierschema 10



**Abb. 4.89: Einfluss der Pufferbedingungen und Blockierungen auf aMP-Regeneration bei Arbeiten mit ConA-SAv.** X-Achsen-Rubriken geben die verschiedenen Blockierer an. 250 µg/ml BSA; Candor „The Blocking Solution“, unverdünnt; 0,05% Tween 20; 1 mg/ml PEG 6000; je Blockierer Experimente in PBS pH 7,3, HEPES 3 pH 6,8 und HEPES 2 pH 6,8 (mit 5,5% Glycerol); N=6

Eine OD von 0,02 nach aMP-Zugabe wird unter keinen anderen Bedingungen erreicht. In PBS fällt die Regeneration bei Verwendung der anderen Puffer wesentlich schlechter aus. Tatsächlich sind die entsprechenden ODs größer als es bei den Kontrollexperimenten ohne ConA-SAv und aMP-Behandlung der Fall ist. Die Regeneration in HEPES 3 und HEPES 2 fällt auch weniger stark aus. Die Entfernung von ConA-SAv von der Mannan-OF mittels aMP funktioniert also am besten, wenn die Komponenten in PBS vorliegen und mit BSA blockiert wird.

#### 4.3.2.2.3 Kontrollexperimente bezüglich eines Proof of Principle

Bevor im nächsten Kapitel ein Proof of Principle mit ConA-SAv, einem bAK und einem Analyten plus anschließende Regeneration durchgeführt wurde, sind in diesem Kapitel eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt worden, die zeigen sollten, inwiefern die Komponenten bAK, Analyt, und αAK-HRP mit der BSA-blockierten

Mannan-OF einerseits und mit dem ConA-SAv andererseits interagieren. Dazu wurde wieder eine Mannan-funktionalisierte Mikrotiterplatte mit BSA blockiert (250 µg/ml, 200 µl, PBS pH 7,3). Anschließend wurde wie im Pipettierschema in Tab. 4.37

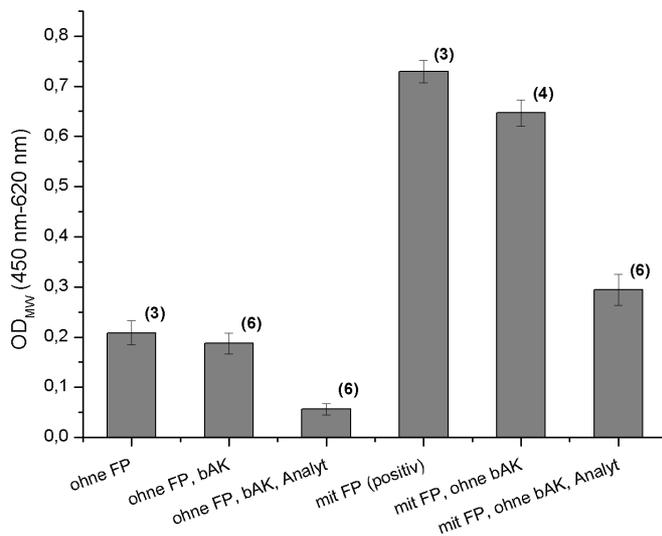
**Tab. 4.37: Pipettierschema 11**

1	2	3	4	5	6
6x	6x	6x	6x	6x	6x
Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan	Mannan
BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA
-	-	-	FP100	FP100	FP100
bAK	-	-	bAK	-	-
Analyt	Analyt	-	Analyt	Analyt	-
aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP

verfahren. Dazu wurden von jeder Komponente 200 µl pipettiert, 1 h inkubiert und anschließend drei Waschschrte durchgeführt. Bei dem bAK handelte es sich um den Sekundärantikörper „anti-IgG b-Antikörper (Biotin)“ einer 1:1000-Verdünnung und bei dem Analyten (Analyt) um den Primärantikörper „anti-Ig-fraction Antikörper“ (Rabbit) einer 1:10000-Verdünnung. Der Nachweis erfolgte mit dem

## 4 | ERGEBNISSE

AK-HRP-Konjugat „Polyclonal Antibody to Rabbit IgG [H&L]-HRP“ in einer 1:10000-Verdünnung (aAK-HRP). Gearbeitet wurde in PBS.



**Abb. 4.90: Kontrolleexperimente mit ConA-SAv, bAK und Analyt.**

X-Achsen-Rubriken geben die immobilisierten Komponenten an. bAK - biotinylierter Antikörper FP – ConA-SAv; Blockierung mit BSA 250 µg/ml; Puffer PBS pH 7,3; in Klammern Anzahl der Experimente.

Wie der Abb. 4.90 zu entnehmen ist, wurde in drei Experimenten (mit FP (positiv)) eine OD von über 0,729 gemessen, wenn alle Komponenten anwesend waren (ConA-SAv, bAK, Analyt und aAK-HRP). Fehlt das ConA-SAv-FP (ohne FP) aber alle anderen Komponenten sind anwesend, fällt die OD auf 0,187. Fehlt auch bAK (ohne FP, bAK), ergibt sich mit einer OD von 0,208 laut ANOVA kein signifikanter Unterschied zu „ohne FP“ ( $\alpha=0,05$ ). (Alle anderen Mittelwerte unterscheiden sich signifikant ( $\alpha=0,05$ .) Fehlt zusätzlich der Analyt (ohne FP, bAK, Analyt) ergibt sich eine OD von 0,056. Die OD-Mittelwerte von „mit FP (positiv)“ von 0,729 und „mit FP ohne bAK“ mit 0,647 sind signifikant verschieden. „Mit FP, ohne bAK und Analyt“ fällt mit einer OD von 0,295 weit geringer aus.

### 4.3.2.2.4 Proof of Principle unter Verwendung unterschiedlicher Regenerationsmittel

Die Regenerierbarkeit der Mannan-OF wurde im vorherigen Kapitel gezeigt. In den folgenden Experimenten wurde anhand einiger Regenerationslösungen untersucht, mit welchem Regenerationsmittel sich das gesamte Konstrukt aus ConA-SAv, einem bAK und einem Analyten möglichst effektiv von der OF lösen lässt. Zu diesem Zweck wurden Mikrotiterplatten-Wells mit Mannan funktionalisiert und mit 200 µl BSA einer Konzentration von 250 µg/ml (in PBS pH 7,3) blockiert. Für jedes Regenerationsexperiment wurden 93,45 µg/ml ConA-SAv immobilisiert. Anschließend wurden biotinylierte anti-IgG b-Antikörper (bAK) einer Konzentration von 0,5 µg/ml (1:1000) appliziert (200 µl in PBS pH 7,3). Als nächstes folgte der Analyt anti-Ig-fraction-Antikörper einer Konzentrationen von 93,45 µg/ml (200 µl in PBS pH 7,3). Darauf folgte die Applikation von je 200 µl Regenerationslösung (siehe Schema Tab. 4.38): 10% aMP, 10% aMP + 8 mol/l Guanidiniumhydrochlorid (GUA), 8 mol/l Gua-

nidinhydrochlorid, aMP + 8 mol/l Urea und 8 mol/l Urea (jeweils in PBS pH 7,3). Zur Detektion wurde anschließend Polyclonal Antibody to Rabbit IgG [H&L]-HRP appliziert und die Farbreaktion ausgelöst. Zwischen den einzelnen Schritten wurden Waschschrirte wie in den Experimenten zuvor vorgenommen. Tabelle 4.38 zeigt das dazu gehörige Pipettierschema und Abb. 4.91 die Resultate.

Tab. 4.38: Pipettierschema 12

1	2	3	4	5	6
6x	6x	6x	6x	6x	3x
Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml <b>aMP</b> aAK-HRP	Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml <b>aMP + GUA</b> aAK-HRP	Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml <b>GUA</b> aAK-HRP	Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml <b>aMP + Urea</b> aAK-HRP	Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml <b>Urea</b> aAK-HRP	Mannan BSA FP 93,45 µg/ml bAK 0,5 µg/ml A 93,45 µg/ml - aAK-HRP

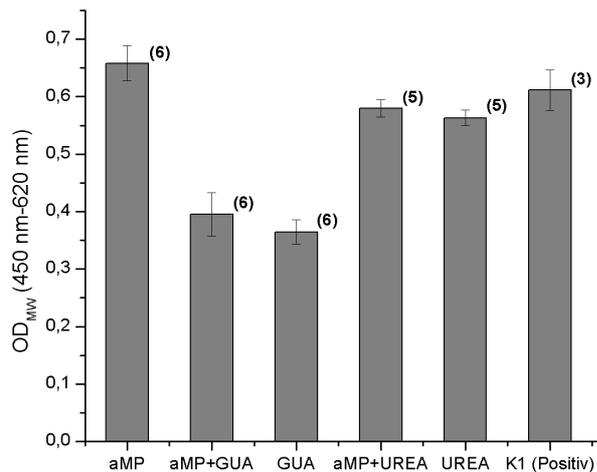


Abb. 4.91: OD<sub>MW</sub>s der Proof of Principle-Experiment mit ConA-SAv + bAK + Analyt-Konstrukt auf Mannan-OF mit anschließender Regeneration. aMP – α-Methylmannopyranosid 10%; GUA – Guanidinhydrochlorid (8 M); Urea – Harnstoff (8 M); K1 (Positiv) – Positivkontrolle ohne Regeneration. Zahlen in Klammern – Anzahl der Datenpunkte.

Auch in diesem Experiment waren die Daten normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ). Aufgrund der Ergebnisse des Grubb’s-Test auf Ausreißer wurde in aMP+Urea und Urea jeweils ein Datum verworfen. K1 (Positiv) repräsentiert das Detektionssignal in Form der OD (OD=0,61) für die Kontrolle, in der nach ConA-SAv-, bAK- und Analyt-Immobilisierung keine Regeneration stattgefunden hat. Regeneration mit aMP führt gemäß eines Tukey-Tests im Rahmen einer ANOVA zu keiner signifikant anderen OD ( $\alpha=0,05$ ). Gleiches gilt für Urea und aMP+Urea. Ein signifikanter Unterschied lässt sich nur für Regeneration mit aMP+GUA und GUA feststellen. Der Unterschied zwischen der GUA- und der aMP+GUA-Regeneration ist nicht signifikant.

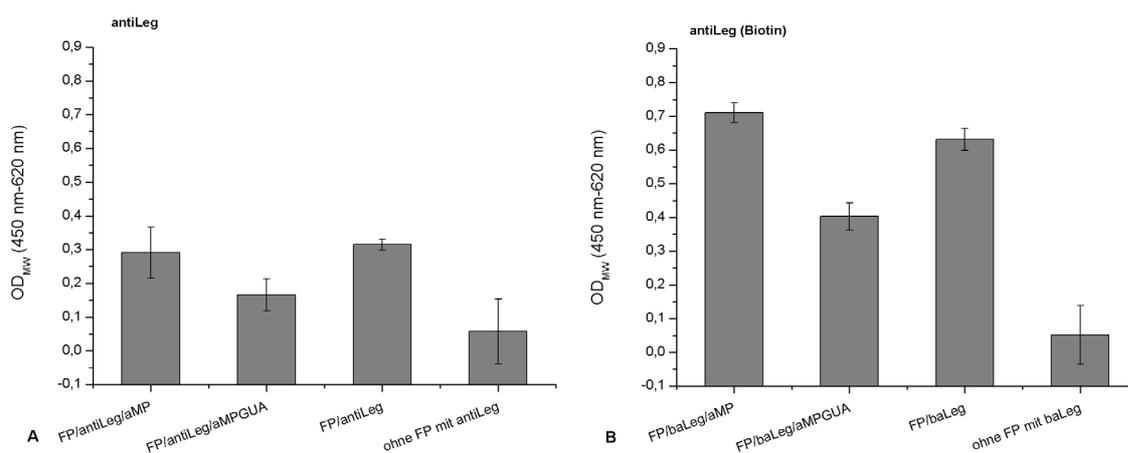
## 4 | ERGEBNISSE

### 4.3.2.2.5 Einfluss des Antikörpers auf die Regeneration

Um herauszufinden, inwiefern der Antikörper bzw. der Analyt für die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts verantwortlich ist, wurde ein weiteres Experiment unternommen, in dem die Mannan- und BSA-Immobilisierung in derselben Weise durchgeführt wurde wie im vorherigen Abschnitt und anschließend 100 µg/ml ConA-SAv und 0,5 µg/ml des jeweiligen Antikörpers appliziert worden sind. Auf einen Analyten wurde verzichtet. Regeneriert wurde mit aMP und aMP+GUA. Als Antikörper wurden der biotinylierte Antikörper „anti-*Legionella pneumophila* Antibody (Biotin)“ (=baLeg) und seine nichtbiotinylierte Variante „anti-*Legionella pneumophila* Antibody“ (aLeg) verwendet (aLSD). Die Detektion erfolgte mit „Polyclonal Antibody to Rabbit IgG [H&L]-HRP“. Der Ablauf samt Waschschritten stimmt ansonsten mit dem im vorherigen Abschnitt überein. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 4.92 und das Pipettierschema Tab. 4.39.

**Tab. 4.39: Pipettierschema.** FP – ConA-SAv; AK XXX – die Ansätze 1-4 wurden je dreimal mit AK XXX = antiLeg (anti *Legionella pneumophila* Antibody) und je dreimal mit AK XXX = antiLeg (Biotin) (anti-*Legionella pneumophila* Antibody (Biotin)) durchgeführt ; aMP – α-Methylmannopyranosid; aAK-HRP – Antikörper-HRP-Konjugat gegen die eingesetzten Antikörper (=AK XXX).

1	2	3	4
3x	3x	3x	3x
Mannan	Mannan	Mannan	Mannan
BSA	BSA	BSA	BSA
FP 100 µg/ml	FP 100	FP 100 µg/ml	-
<b>AK XXX 0,5 µg/ml</b>			
aMP	aMP + GUA	-	-
aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP	aAK-HRP



**Abb. 4.92: Verhalten von verschiedenen Antikörpern auf ConA-SAv (FP) ausgestatteten Mannan-OFn.** A - Experimente mit nichtbiotinylierten anti-*Legionella*-AKs. B – Experimente mit biotinylierten anti-*Legionella* AKs. Erster Balken zeigt OD<sub>MW</sub> nach aMP-Regeneration, zweiter Balken Regeneration nach aMP + Guanidinhydrochlorid-Regeneration, dritter Balken Positivkontrolle ohne Regeneration und vierter Balken die OD<sub>MW</sub> nach AK-Applikation ohne ConA-SAv-FP und Regeneration.

Laut Kolmogorov-Smirnov-Test sind die drei Messwerte jedes Experimentes normalverteilt ( $\alpha=0,05$ ). Die Daten wurden wieder mittels ANOVA ausgewertet. Ein Levene's Test auf Varianzhomogenität gibt an, dass die Ergebnisse jeweils varianzhomogen sind ( $\alpha=0,05$ ). Im Fall von aLeg (Abb. 4.92 A) wird für die Positivkontrolle (FP/aLeg) eine OD von 0,315 gemessen. Die ANOVA zeigt, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben gibt ( $\alpha=0,05$ ). Ein Tukey-Test ( $\alpha=0,05$ ) zeigt, dass kein signifikanter Unterschied für die Stichproben FP/aLeg/aMP (mit aMP-Regeneration) und FP/antiLeg (ohne Regeneration) sowie für FP/aLeg/aMPGUA (mit aMP+GUA-Regeneration) und FP/aLeg (ohne Regeneration) festzustellen ist. Dasselbe gilt für den Vergleich der Stichproben FP/aLeg/aMPGUA und FP/aLeg/aMP. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich für die Stichproben „ohne FP mit aLeg“ (Negativkontrolle) vs. FP/aLeg (Positivkontrolle) sowie für „ohne FP mit aLeg“ (Negativkontrolle) vs. FP/aLeg/aMP. Im Fall des biotinylierten aLeg (baLeg) (Abb. 4.92 B) wurde in der Positivkontrolle eine mittlere OD von 0,631 gemessen. Die OD-Mittelwerte der Experimente mit dem biotinylierten aLeg-AK mit (FP/baLeg/aMP) und ohne (FP/baLeg=Positivkontrolle) unterscheiden sich nicht signifikant ( $\alpha=0,05$ ). Signifikante Unterschiede zeigen sich besonders beim Stichproben-Vergleich von FP/baLeg (Positivkontrolle) vs. FP/baLeg/aMPGUA und FP/baLeg/aMP vs. FP/baLeg/aMPGUA sowie für die Negativkontrolle (ohne FP mit baLeg) vs. FP/baLeg/aMP, FP/baLeg/aMPGUA, Positivkontrolle (FP/baLeg). In der folgenden Tabelle sind die Signifikanzunterschiede wegen der besseren Übersichtlichkeit noch einmal zusammengefasst (Tab. 4.40).

**Tab. 4.40: Ergebnisse des Tukey-Tests zum Vergleich der Stichproben im Rahmen einer ANOVA.** aLeg-Experiment - Experimente mit nicht-biotinyliertem anti-Legionella-Antikörper (Abb. 4.46 A). baLeg-Experimente - Experimente mit biotinylierten anti-Legionella-AK durchgeführt (Abb. 4.46 B). SIG – SIG=0 indiziert „Unterschied der OD<sub>MW</sub> ist nicht signifikant ( $\alpha=0,05$ )“ bzw. SIG=1 indiziert „Unterschied der OD<sub>MW</sub> ist signifikant ( $\alpha=0,05$ ).“

antiLeg-Experimente	SIG	bantiLeg-Experimente	SIG
FP/antiLeg/aMPGUA vs. FP/antiLeg/aMP	0	FP/baLeg/aMPGUA vs. FP/baLeg/aMP	1
FP/antiLeg/aMPGUA vs. FP/antiLeg/aMP	0	FP/baLeg/aMPGUA vs. FP/baLeg/aMP	0
FP/antiLeg vs. FP/antiLeg/aMP	0	FP/baLeg vs. FP/baLeg/aMP	1
FP/antiLeg vs. FP/antiLeg/aMP	1	FP/baLeg vs. FP/baLeg/aMP	1
FP/antiLeg vs. FP/antiLeg/aMPGUA	0	FP/baLeg vs. FP/baLeg/aMPGUA	1
FP/antiLeg vs. FP/antiLeg/aMPGUA	1	FP/baLeg vs. FP/baLeg/aMPGUA	1
ohne FP mit antiLeg vs. FP/antiLeg/aMP	0	ohne FP mit baLeg vs. FP/baLeg/aMP	1

## 5. Diskussion

### 5.0.1 Kontaktwinkelanalyse

Die Kontaktwinkelanalysen (Kapitel 4.0.1) wurden durchgeführt, um eine Aussage über eine erfolgreiche OTS-Silanisierung und deren Reproduzierbarkeit zu treffen. Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit verschiedener OF-Segmente innerhalb eines jeden Chips zu ermöglichen, wurden zwischen drei und fünf Tropfen auf unterschiedliche Stellen eines Chips pipettiert. Die resultierenden Kontaktwinkel wurden gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Chips nach einer einfachen Reinigung mit Methanol zwar hydrophil sind, der mittlere Kontaktwinkel mit  $68,58^\circ$  aber relativ groß ist. Durch die Behandlung mit NaOH und Piranha-Lösung fallen die Kontaktwinkel so klein aus, dass sie mit der Software nicht bestimmt werden können. Das zeigt, dass die sog. Aktivierung der Chips mit NaOH und Piranha-Lösung die OF stark hydrophilisieren. Für alle drei OTS-silanisierten Chips konnten mittlere Kontaktwinkel über  $90^\circ$  bestimmt werden. Oberflächen mit Kontaktwinkel  $\geq 90^\circ$  werden als hydrophob bezeichnet, Oberflächen mit Kontaktwinkeln  $< 90^\circ$  als hydrophil (Notsu et al., 2005; Patankar, 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass die Chips 1, 2 und 3 hydrophob sind. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Hydrophobizität auf die OTS-Silanisierung zurück zu führen ist. Der Unterschied zwischen den Kontaktwinkeln der OTS-Chips 1, 2 und 3 zu dem aktivierten Kontrollchip (K2) ist offensichtlich. Der Unterschied zwischen den mittleren Kontaktwinkeln der OTS-Chips und denen des nicht-aktivierten Kontrollchip (K1) sind statistisch signifikant (ANOVA). Die Unterschiede zwischen den OTS-Chips sind statistisch nicht signifikant (ANOVA). Da die Standardabweichungen ebenfalls sehr klein ausfallen, ist davon auszugehen, dass die Anwendung von Protokoll 3.2.1.1 gut reproduzierbare OF liefert.

Die gemessenen Kontaktwinkel liegen nahe dem Minimalkriterium für Hydrophobizität von  $90^\circ$ . Es lässt sich also vermuten, dass nicht sämtliche Oberflächen-OH-Gruppen mit OTS umgesetzt worden sind. Dabei handelt es sich um ein bekanntes Phänomen. Beispielsweise werden im Fall von „reversed phase (RP)“-HPLC-Säulen die Oberflächen-OH-Gruppen des Kieselgels mit Silanen wie Octadecyltrichlorsilan nicht vollständig umgesetzt, was sich in „Leading“- und/oder „Tailing“-Effekten niederschlägt. Darum wird noch das sogenannte „end-capping“ mit Trimethylchlorsilan durchgeführt, einem sehr kleinen, reaktionsfähigen Silan, welches auf der OF übrig gebliebene OH-Gruppen sättigt. Dieser Schritt spielt bei dem verwendeten Protokoll keine Rolle. Ziel der hier angewendeten OTS-Silanisierung ist nicht der Aufbau eines lückenlosen OTS-Monolayers. Für die gestellte Aufgabe reicht es, eine reproduzierbare Oberfläche mit hydrophoben Eigenschaften zu produzieren, auf der die Immobilisierung von Proteinen oder Zellen aufgrund von hydrophober Interaktion möglich ist.

### 5.0.2 Zellzahlbestimmung

Sowohl die Konzentration der Legionellen- als auch die Konzentration der *E. coli*-Zellen-Proben wurde durch eine optische Zellzahl-Bestimmung bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels eines Photometers gemessen. Die Methode basiert auf der Bestimmung des Intensitätsverlustes von durch eine Suspension transmittierten Lichts. Bei Durchgang von Licht durch eine Probe einer homogen verteilten Substanz kommt es zur Extinktion von Licht durch Reflexion, Absorption, Streuung und Beugung. Reflexionsbeiträge werden durch Leer- oder Quermessung eliminiert. Die Absorption spielt dann die größte Rolle. Bei Suspensionen allerdings spielt die Streuung die dominierende Rolle, vor allem, da der Beitrag zur Extinktion durch Absorption bei Licht von 600 nm stark minimiert ist (Xu und Katz, 2008). Eine genaue Zellzahlbestimmung mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ist nur für *E. coli* möglich. Der Grund ist, dass das Photometer eine eingebaute Umrechnungsfunktion besitzt, die jedoch genau genommen nur für *E. coli* gilt. Die Streuung des Lichts ist abhängig vom Brechungsindex, der Form, Größe und inneren Struktur von Zellen. Eine Anwendung auf *L. pneumophila* erfordert demnach die Bestimmung einer Kalibrierfunktion, um genaue Konzentrationen zu ermitteln. Zu diesem Zweck müsste eine Verdünnungsreihe mit *L. pneumophila*-Zellen erstellt werden mit Kenntnis der genauen Zellkonzentration. Leider ist die Ermittlung der genauen Zellkonzentration daran gescheitert, dass die getöteten Zellen nicht mehr ausplattiert werden konnten. Jedoch kann die Ermittlung der Konzentration mittels Photometer bei 600 nm in erster Näherung auf Legionellen übertragen werden. Die Streuung ist bei Objekten der Größenordnung von Bakterien abhängig von deren Brechungsindex, Form, Größe und innerer Struktur (Stull, 1972). Bei Prokaryoten fehlen komplexe Strukturen wie Zellkerne und andere Organellen. Der Brechungsindex von Bakterien in der Größenordnung von 0,5  $\mu\text{m}$  bis 2  $\mu\text{m}$  beträgt typischerweise etwa 1,39 (Xu und Katz, 2008). Außerdem sind sowohl *E. coli*- als auch *L. pneumophila*-Zellen stäbchenförmig. Ihre Größe beträgt im Fall von *E. coli* typischerweise etwa 0,5  $\mu\text{m}$  in der Breite und 2  $\mu\text{m}$  in der Länge (Miao et al., 2003; Bolshakova 2001) und im Fall von *L. pneumophila* typischerweise 0,3-0,9  $\mu\text{m}$  in der Breite und 2  $\mu\text{m}$  in der Länge (Füchslin et al., 2010; United States Environmental Protection Agency, 2001). Da sich die Zellen in den entscheidenden Parametern hinreichend ähnlich sind, darf davon ausgegangen werden, dass die Zellzahlbestimmung bei einer Wellenlänge von 600 nm im Fall von *L. pneumophila* eine erste Annäherung der tatsächlichen Konzentration darstellt. Der Fehler, der bei dieser Bestimmung aufgrund der oben angeführten Faktoren gemacht wird, ist angesichts dessen recht klein. Außerdem muss bedacht werden, dass sich diese Arbeit mit einer Modell-Applikation beschäftigt. Das bedeutet zunächst auch, dass die Zellen entgegen der Feld-Applikation tot sind. Mit lebenden *L. pneumophila*-Zellen wurde aus Sicherheitsgründen nicht gearbeitet. Versuche von Frau Hellming die Zellzahl mittels Zählkammer zu bestimmen, scheiterten ihrer Aussage zufolge an der Tatsache, dass sie sich im Lichtmikroskop nicht fokussieren ließen.

### 5.1 Versuche zur Detektion von *L. pneumophila* mit immobilisierten Fängerantikörpern (Sandwich-Assay-Format)

Im Folgenden werden Experimente diskutiert, die mit fAK und Leg1G bzw. Leg1P-Zellen unternommen worden sind. Die fAKs wurden entweder direkt auf OTS-OF aufgrund von hydrophoben Wechselwirkung zwischen fAKs und OTS-OF immobilisiert oder sie wurden auf OTS-OF immobilisiert, die zuvor mit einem fAK-bindenden Linkerprotein ausgestattet worden waren. Vorteile der direkten Immobilisierung sind u.a. die Einfachheit der Immobilisierungsprozedur, die Tatsache, dass die Antikörper keine Modifikationen erfahren müssen, dass viele OF bei diesem Verfahren hohe Antikörper-Bindungs-Kapazität zeigen (Jung et al., 2008; Tanaka et al., 2006) und dass das Verfahren günstig, schnell und oft sogar effektiver ist als andere Strategien (z.B. kovalenten Immobilisierungsmethoden) (Barlen et al., 2009). Der Vorteil der Verwendung von Linkerproteinen besteht in der besseren Orientierung der antigenbindenden Bereiche der fAKs. Zunächst werden die Experimente unter Verwendung der Leg1G-Zellen (Quelle: Institut für Hygiene und Umweltmedizin des UKGM in Gießen) diskutiert. Anschließend folgt die Diskussion der Experimente mit Leg1P-Zellen (Quelle: FzMB).

#### 5.1.1 Experimente mit fAKs und Leg1G-Zellen

##### 5.1.1.1 Antikörpertest

Um sicher zu gehen, dass der erworbene Antikörper *L. pneumophila*-Zellen bindet, wurden ELISA-basierte Bindungstests durchgeführt. Wegen des besonders hydrophoben Lipopolysaccharids (LPS) Legionaminsäure (5-Acetamidin-7-acetamid-8-O-acetyl-3,5,7,9-tetradecoxy-L-glycero-D-galactonulosonsäure) verhält sich die Legionellen-Zelloberflächen hydrophob (Neumeister et al., 1998), so dass sich die Zellen auf dem Boden von Mikrotiterplattenwells aus Polystyrol direkt (ohne fAKs) immobilisieren lassen. Die Bindung des in Frage stehenden Antikörpers wurde mittels eines passenden AK-HRP-Konjugats nachgewiesen. Im Kontrollansatz ohne das Sekundärantikörper-HRP-Konjugat kam es erwartungsgemäß nur zu einer sehr geringen Farbentwicklung. Im Kontrollansatz ohne den in Frage stehenden Antikörper AK237744 kam es ebenfalls zu einer sehr geringen Farbentwicklung, was bedeutet, dass das Sekundärantikörper-HRP-Konjugat nur an sehr wenige Bindestellen gebunden hatte. Im Kontrollexperiment auf einer BSA-blockierten OF unter Auslassung von Zellen kommt es zu einer recht starken Farbreaktion, was bedeutet, dass AK237744 oder das Konjugat an die BSA-blockierte OF bindet. Dass der Antikörper in Ansätzen mit allen Komponenten, insbesondere mit Zellen, besser bindet, als auf bloß BSA-blockierten OF, wurde durch statistische Tests (Lord-Test bzw. Weir-Test) gezeigt. Demnach binden die Antikörper spezifisch an die Zellen. Sie binden aber auch an BSA, jedoch sind die Werte für die Bindung an Zellen signifikant höher als die Werte für die Bindung an BSA. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper 237744 in der Lage ist, die Zellen

aus dem Pufferstrom zu „fangen“. Es muss aber auch im Falle von BSA als Blockierungsreagenz mit unspezifischen Bindungen von AK237744 an BSA gerechnet werden. Es wurden keine Tests mit AK237744 als fAK durchgeführt sondern nur als dAK. So wurde die grundsätzliche Bedingungsfähigkeit des Antikörpers getestet, indem er frei in Lösung mit dem Antigen konfrontiert wurde. Unter Umständen bedeutet aber ein Nachweis einer spezifischen Bindung als dAK nicht, dass der AK auch als fAK einsetzbar ist, da es möglich erscheint, dass ein AK infolge einer Immobilisierung seine Bindefähigkeit verliert und verändert.

#### **5.1.1.2 Blockierung unspezifischer Bindestellen (RfS)**

Bei Bioassays muss darauf geachtet werden, dass die zu messenden Wirkungen, so weit wie möglich durch spezifische Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Erkennungsmolekülen verursacht werden (Mohammad und Esen, 1989). Im Falle eines Biosensors, bei dem die Erkennungsreaktionen auf einer chemisch modifizierten Glasoberfläche stattfinden, sind Wechselwirkungen zwischen den Antigenen oder den Antikörpern und der Oberfläche der Glaschips möglich. Außerdem kann es zu Wechselwirkung mit anderen Komponenten wie Blockierungsreagenzien kommen, welche gerade die unspezifische Wechselwirkung mit der OF unterdrücken sollen. Daher muss zuvor getestet werden, welche Blockierer sich zu diesem Zweck eignen. Für die Experimente, die in dieser Arbeit präsentiert werden, wurden Tween20, The Blocking Solution (TBS) von Candor Bioscience GmbH und BSA als Blockierer verwendet. Tween20 ist ein niedermolekulares, sehr kleines, nicht-ionisches Tensid, welches im Rahmen von Immunoassays häufig als Lösungsvermittler zu Proteinlösungen zugegeben wird. Außerdem lagert es sich auch an viele Arten von Oberflächen an und verhindert so, dass die Proteine in der Lösung an diese adsorbieren (Butler, 2000). Deshalb findet es auch Anwendung als Blockierungsreagenz, um unspezifische Bindestellen nach der Antikörper-Immobilisierung zu blockieren (Batteiger et al, 1982). TBS ist laut Produktinformation ein Blockierungsreagenz, welches aus Fragmenten unterschiedlichen Molekulargewichts von hochreinem, chemisch modifizierten Caseins besteht. BSA ist ein Standardblockierungsreagenz für hydrophile und hydrophobe Oberflächen (Jeyachandran et al., 2010), dass in vielen biochemischen (Western Blots) (Ida et al., 1996) und molekularbiologischen Experimenten (als Additivum in PCR-Ansätzen) (Beattie et al., 1999) eingesetzt wird aber auch besonders im Bereich der Immunoassays (Jeyachandran et al., 2010).

In dem durchgeführten Tween20-Experiment stieg das Signal nach Tween20-Injektion sehr schnell an. In der Folge zeigt das Experiment, das Tween20 offenbar viel schneller von dem OF-Segment dissoziiert, welches zuvor mit AKs ausgestattet worden war (wie in dem Experiment in Kapitel 4.1.1.3.1 bezüglich MSP 1 (blau) geschehen), als von dem Segment, welches frei von AKs war. Der Dissoziationsprozess nahm in beiden Fällen mit 6800 s sehr viel Zeit in Anspruch. Dem Problem könn-

## 5 | DISKUSSION

te man mit geringeren Konzentrationen bzw. geringerem Volumen abhelfen. Das TBS-Experiment wurde analog dem Tween20-Experiment durchgeführt. Nach der Injektion von TBS verlief die Dissoziation überschüssigen TBSs jedoch viel schneller als die Dissoziation von Tween20. Schon nach etwa 4000 s stabilisierte sich das Signal sichtbar. Jedoch ergab sich für die freie OTS-OF (grün) und die AK-belegte OTS-OF (blau) nur ein Signalunterschied von 168 IU. Das BSA-Experiment zeigte, dass sich mit BSA sehr gut blockieren ließ. Auf dem Segment mit AKs (MSP 1; blau) ergab sich zwar ein Signal von 431 IU, jedoch fiel das Signal auf der dem AK-freien Segment (MSP 2; grün) mit 2149 IU weitaus höher aus. Im Vergleich zum TBS-Test ist hier deutlich zu bemerken, dass auf MSP 1 schon AKs immobilisiert worden waren. Der Unterschied zwischen AK-belegter und freier OTS-OF ist zwar auch im Tween20-Experiment festzustellen. Jedoch ist die BSA-Dissoziation mit 1080 s wesentlich kürzer als die Tween20-Dissoziation (>6800 s).

Im Tween20-Experiment wurde nach 6800 s eine Legionellenprobe injiziert. Die Leg1-Injektion wurde zwar von dem Biosensor unter beiden Messspots registriert, jedoch nur mit einem sehr geringen Signal. Auf MSP 2 war das Signal vor der Leg1-Injektion nahezu stabil, so dass von einer vollständigen Dissoziation ausgegangen werden konnte. Das Signal fiel aber nach Beendigung der Injektion auf dem MSP 2 auf das Niveau von vor der Injektion zurück. Daher lag der Schluss nahe, dass auf einer Tween20 blockierten OTS-OF keine Leg1-Zellen binden können. Auf MSP 1 war die Dissoziation zum Zeitpunkt der Zell-Injektion noch nicht vollständig abgeschlossen. Das Signal fiel in der Dissoziationsphase wieder ab und kehrte zu einer Signalentwicklung zurück, welche die Signalentwicklung vor der Leg1-Injektion fortzusetzen schien. Vermutlich konnten die Zellen auf MSP 1 nicht binden, weil noch überschüssiges Tween20 dissoziierte und die Leg1-Zellen mitriss. Ob sich Tween20 als Blockierungsreagenz eignet oder nicht, kann anhand dieses Experiments nicht entschieden werden, weil die Dissoziationsphase zu kurz war. Da die Dissoziation unangemessen viel Zeit beanspruchte und das Experimentieren mit anderen Konzentrationen und/oder Volumina zu aufwendig erschien, wurde Tween20 nicht weiter verwendet. Die zweimalige Injektion von Leg1-Zellen im Rahmen des TBS-Experiments ergab am Ende der Dissoziationsphase ein Sensorsignal von 106 IU (Messspot 1 – blau) und 73 IU (Messspot 2 – grün). Wenn man hier von einem spezifischen Signal sprechen wollte, müsste man es auf lediglich 29 IU beziffern. Es wurde erwartet, dass die TBS-Injektion auf der freien OTS-OF ein weitaus höheres Signal erzeugt als auf der AK-belegten OF. Warum das nicht der Fall ist, bleibt ungeklärt. Die Blockierung der freien OTS-OF ist zwar gelungen, jedoch ist nicht klar, was auf der AK-belegten OF passiert. Daher wurde TBS als Blockierer ausgeschlossen. Im BSA-Experiment wurde die Leg1-Zellen-Injektion zwar vom Detektor während der Injektion registriert, fiel aber sehr klein aus. Nach 760 s Dissoziation konnte auf MSP 2 (grün – nur blockiert) keine Nettosignalanstieg festgestellt werden und auf dem MSP 1 (blau – mit AKs) ein Signalanstieg von 49 IU. Aus folgenden Gründen

wurde entschieden, BSA als Blockierungsreagenz zu verwenden. Erstens zeigte BSA eine besonders kurze Dissoziationsphase, obwohl der Variation der Konzentration bzw. des Volumens von Tween20 und TBS die extrem langen Dissoziationsphasen wahrscheinlich zu vermeiden gewesen wären. Zweitens konnte man besonders gegenüber der TBS-Blockierung wesentlich besser die AK-belegte OF von der nur blockierten OF unterscheiden. Vermutlich spielt hier der Brechungsindex von TBS eine entscheidende Rolle, so dass die Unterschiede zwischen den beiden OF-Bereichen eingeebnet werden. Letztlich erschien es aus pragmatischen Gründen besser zu sein, sich auf BSA zu konzentrieren, weil sein Verhalten vorhersehbarer erschien. Der Nachteil von BSA besteht in der Größe. Tween20 und bestimmte Bestandteile von TBS sind wegen ihrer geringeren Größe in der Lage kleinere OF-Segmente zu blockieren. Das schien aber nicht von hoher Relevanz zu sein, da hier mit ganzen Zellen gearbeitet werden sollte. Es wurde als unwahrscheinlich angesehen, dass an freie OTS-OF-Segmente an denen BSA wegen seiner Größe nicht binden kann, dort zu Interaktionen zwischen OTS-OF und ganzen Legionellen-Zellen kommen kann.

Im Tween20- und TBS-Experiment wurde während der Leg1-Injektionen per „Hold“-Funktion der Strom über die OF kurzzeitig gestoppt. Es sollte getestet werden, ob die Zellen im Statischen besser binden können als im Fluss. Erstaunlicherweise stieg das Signal in beiden Fällen nicht an sondern fiel sogar ab. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden

### **5.1.1.3 BSA-Blockierung gegenüber Antikörpern und Zellen**

Mit der Entscheidung für BSA als Blockierungsreagenz wurde es notwendig, zu ermitteln, bei welcher Konzentration von BSA die OTS-OF gegenüber Antikörpern vollständig blockiert sei (Kapitel 4.1.1.3.2). Besonders im Zusammenhang mit dem Direct-Assay-Formats ist dies von Bedeutung, da hier die Zellen ohne vorherige fAK-Immobilisierung direkt auf der OF immobilisiert werden (hydrophobe Wechselwirkung) verfolgt wird. Zur Detektion und Quantifizierung der Zellen müssen anschließend dAKs appliziert werden. Gerade im Fall von niedrigen Zellkonzentrationen ist zu erwarten, dass große OF-Bereiche frei von Zellen sind. Werden solche Bereiche nicht ausreichend blockiert, wird es zu unspezifischen dAK-Bindungen kommen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wurde diejenige BSA-Konzentration gesucht, bei der die OF auch in Abwesenheit von Zellen gegenüber AK vollständig blockiert ist. Zu diesem Zweck wurde BSA verschiedener Konzentration auf der OTS-OF immobilisiert und anschließend der Test-Antikörper anti-IgG b appliziert. Wie erwartet fällt das BSA-Sensorsignal, wenn von hohen BSA-Konzentrationen zu geringeren fortgeschritten wird. In einem BSA-Konzentrationsbereich zwischen 500-2000 µg/ml erhält man bei anschließender Antikörper-Applikation sehr ähnliche AK-Signale in Höhe von durchschnittlich 295,7 IU (StDev 46,9 IU). Diese Bindungssignale können als Signale interpretiert werden, welche aus unspezifischen Wechselwirkungen der Antikörper mit BSA resultieren. Unterhalb einer BSA-Konzentration von 500 µg/ml wurden

weit höhere Signale infolge von AK-Applikationen gemessen. Daher ist davon auszugehen, dass eine BSA-Konzentration von 500 µg/ml bei einem Volumen von 80 µl ausreicht, um die Oberfläche so zu blockieren, dass die Bindung von Proteinen der Größe von Antikörpern minimale Signale erzeugt.

Außerdem war es wichtig zu ermitteln, bei welcher BSA-Konzentration bzw. bei welchem BSA-Volumen die OF gegenüber Legionellen-Zellen vollständig blockiert ist (Kapitel 4.1.1.3.3). Verfolgt man die Strategie des „Sandwich Assay Formats“, wird man zunächst feststellen müssen, bei welcher Konzentration man einen fAK eines festen Volumens immobilisieren muss, damit die höchste Bindungswahrscheinlichkeit erreicht wird. Je nach dem wie viel AK immobilisiert werden muss, wird die OF noch mehr oder weniger große OTS-Bereiche aufweisen, an denen Zellen oder dAK unspezifisch binden können. Da die entsprechenden AK-Bedingungen bei unterschiedlichen AK verschieden ausfallen können, müsste man die adäquaten BSA-Bedingungen für jeden Antikörper, den man einsetzt, neu bestimmen. Um diesen Aufwand zu vermeiden, wurde einfach diejenige BSA-Konzentration bestimmt, ab der die Signale nach Applikation von Zellen minimal ausfallen. Auf einer OTS-OF ohne AK würden diese BSA-Bedingungen für eine maximale Unterdrückung von unspezifischen Bedingungen sorgen. Wenn AK auf der OF immobilisiert werden, kann diese Konzentration ebenfalls eingesetzt werden, um übrige unspezifische Binstellen zu blockieren. Aufgrund der Ergebnisse der Experimente wurde eine BSA-Konzentration von 50 µg/ml bei einem Volumen von 80 µl als ausreichend angesehen, um die OF gegenüber ganzen Legionellen-Zellen vollständig zu blockieren. Die halblogarithmische Darstellung der BSA- und Leg1G-Signale am Ende der Dissoziationsphase (Abb. 4.11 D; Kapitel 4.1.1.3.3) zeigt, dass die Leg1G-Signale über einen BSA-Konzentrationsbereich von 50 µg/ml bis 2000 µg/ml mit durchschnittlich 85,6 IU (Spannweite von 126,33 IU) relativ konstant bleiben. Daraus ist zu folgern, dass die BSA-Blockierung im Konzentrationsbereich zwischen 50 µg/ml und 2000 µg/ml BSA (80 µl) gegenüber ganzen Leg1-Zellen effektiv ist. Das Leg1G-Signal bei einer BSA-Konzentration von 2,5 µg/ml fiel zwar mit weniger als 250 IU auch sehr klein aus, wurde angesichts der anderen Leg1G-Signale bei BSA-Konzentrationen <10 µg/ml als Artefakt interpretiert.

Um spezifische Signale von unspezifischen zu unterscheiden, geht man in der Praxis wie folgt vor: man behandelt das rein unspezifische Signal (hier: das Signal bei gegenüber Leg1G-Zellen vollständig blockierter OF gemessen) als Untergrundsignal  $S_u$  und berechnet den Mittelwert  $\Phi S_u$  und die Standardabweichung  $StDev$ . Das, was als Nutzsignal  $S_n$  bezeichnet werden kann, wird dann wie folgt definiert:  $S_n = \Phi S_u + 3 \times StDev$ . Damit ergibt sich ein Signal von 136 IU, welches nicht unterschritten werden darf, wenn es als ein spezifisches aufgefasst werden soll (Lohninger, 2012).

#### **5.1.1.4 AK237744-Wechselwirkung mit BSA**

Um die nicht eliminierbaren unspezifischen Bindungen von anti-Legionellen-Antikörpern an mit BSA-blockierten OF abzuschätzen, muss jeder zum Einsatz kommende anti-Legionella-Antikörper auf seine Bindefähigkeit an BSA-blockierte OTS-OF getestet werden. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper, welcher für die folgenden *L. pneumophila*-Experimente verwendet werden sollte (AK237744), auf eine OF appliziert, auf der zuvor 80 µl BSA einer Konzentration von 2000 µg/ml immobilisiert worden war (Kapitel 5.1.1.3.4). AK237744 führte zu keiner Erhöhung des Sensorsignals. Der Antikörper bindet demnach nicht an BSA. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen in Kapitel 4.1.1.2. In dem Mikrotiterplatten-Test wurde AK237744 auch auf einer BSA gesättigten OF getestet wobei sich zeigte, dass der Antikörper an BSA bindet. Allerdings unterscheidet die beiden Experimente, dass bei der RfS im Fluss (5 µl/min) und bei den Mikrotiterplatten-Versuchen mit einem Rüttler, der auf einer sehr niedrigen Stufe eingestellt war, gearbeitet wurde. Außerdem betrug die Inkubationszeit in den Mikrotiterplatten 1 h, während die Applikationszeit im RfS 16 min betrug. Der Unterschied ist offenbar ausreichend, um die Bindung von AK237744 an BSA zu verhindern.

#### **5.1.1.5 Experimente mit immobilisierten Antikörpern (hydrophobe Wechselwirkung)**

Die ersten Experimente zur Detektion von ganzen *L. pneumophila*-Zellen zielten auf die Strategie des Sandwich-Assay-Formats ab. Die Strategie ist aus zwei Gründen von Vorteil: erstens werden meist polyklonale Antikörper eingesetzt (wie in diesem Fall AK237744), die ein größeres Spektrum an Antigenen binden. Bindungsereignisse auf OF mit polyklonalen fAK lassen daher in der Regel zunächst auf Antigene eines gewissen Verwandtschaftszusammenhangs schließen. Zweitens ist die Gefahr des Funktionsverlusts durch Immobilisierung im Fall von polyklonalen Antikörpern geringer. Das geht, wie bereits erwähnt, aus einer Untersuchung von Butler et al. hervor, in der gezeigt wurde, dass bei Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern aufgrund hydrophober Wechselwirkungen im ELISA lediglich 3% der monoklonalen Antikörper ihre Antigenbindestellen bewahren, während sich die Zahl bei polyklonalen Antikörpern auf 10% beläuft (Butler et al., 1992; Jung et al., 2008). Wegen des breiten Spektrums an möglichen Antigenen gegen die Antikörper einer polyklonalen Antikörpermischung gerichtet sind, besteht die Gefahr, dass auch Angehörige von verwandten Arten oder sogar Gattungen gebunden werden, welche nicht von Interesse sind. Um derartige falsch positive Ergebnisse auszuschließen, kommt ein monoklonaler Antikörper zum Einsatz, der frei in Lösung vorliegt. Da sein Bindungsspektrum enger ist, kann er die Antigene von Interesse mit höherer Genauigkeit identifizieren. Das erhöht die Spezifität eines Tests, da so die Häufigkeit von falsch positiven Ergebnissen reduziert wird. Ziel der Versuche des Kapitels 4.1.1.4 war es, einen „Proof of Principle“ zu liefern, der zeigen sollte, dass auf einer mit dem Antikörper AK237744 ausgestattete OF ganze *L. pneumophila*-

Zellen gebunden werden können. Gemäß den Erkenntnissen der vorangegangenen Versuche (Kapitel 4.1.1.3.1, 4.1.1.3.2 und 4.1.1.3.4) wurden nun verschiedene Konzentrationen von AK237744 auf der OF immobilisiert, um festzustellen, welche Konzentration(en) sich in dem experimentellen Design am besten als Arbeitskonzentration eignete(n). Die Untersuchung wurde mit einer konstanten Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml durchgeführt. Bei allen Antikörperkonzentrationen konnten Leg1-Signale gemessen werden. Die OSDs, welche nach Zellen-Applikation am Ende der Dissoziationszeit von 1800 s gemessen worden sind, fielen mit Werten  $<250$  IU sehr niedrig aus. Bei den AK237744-Konzentrationen von  $1 \mu\text{g/ml}$  und  $5 \mu\text{g/ml}$  konnten noch hohe BSA-Signale bei der Blockierung gemessen werden. Demnach ließ die Oberflächenbelegung mit Antikörpern noch viel Raum für die Bindung von BSA. Das deutet darauf hin, dass die AK-Konzentrationen in diesen Fällen zu niedrig gewesen sein könnten, um Leg1-Zellen effektiv zu binden. Bei höheren AK237744-Konzentrationen dagegen wurde die Zugabe von BSA vom Sensor zwar registriert, es ergab sich am Ende der Dissoziationsphase jedoch nur ein sehr kleines bis gar kein BSA-Signal. Von Interesse sind demnach die Konzentrationen zwischen  $10 \mu\text{g/ml}$  und  $100 \mu\text{g/ml}$ . Hier scheint es zu unterschiedlichen OF-Belegungen mit Antikörpern zu kommen, die gleichzeitig dicht genug erscheinen, um kaum bis gar keine BSA-Bindung zu zulassen. Andererseits kann aufgrund der Ergebnisse der Passivierungsexperimente davon ausgegangen werden, dass für Leg1G-Zellen keine Stellen für unspezifische Interaktion mit der OTS-OF übrig sind. Dennoch kam es zu keinen Bindungssignalen, welche sich von den Signalen unterscheiden ließen, die in Kapitel 4.1.1.3.3 als unspezifische Signale von Leg1-Zellen auf vollständig mit BSA belegten OF ermittelt worden sind (136 IU). Demnach verhalten sich die Zellen bei allen AK237744-Konzentrationen wie sie sich auch auf vollständig mit BSA belegten OF verhalten. Davon abgesehen, erwartet man bei so großen Objekten wie ganzen Zellen viel höhere Signale. Unter diesen Bedingungen konnten also keine Signale gemessen werden, die als Signale einer spezifischen Bindung aufgefasst werden sollten. Die unspezifischen Signale, die sich bei Leg1-Zellen-Applikation auf vollständig BSA-blockierten OF ergeben, legen dies nahe. Es könnte aber auch sein, dass die Bindung der Zellen an AK237744-ausgestattete OF doch spezifisch aber nicht von den genannten unspezifischen unterscheidbar ist. Unter diesen Umständen würde auch ein Blockierer, welcher die 136 IU unterdrücken würde, nicht weiterhelfen: Wenn eine Leg1G-Probe einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml bei spezifischer Bindung nur ein Signal von weniger als 250 IU erzeugt, dann ist kaum Spielraum für verwertbare Signale bei kleineren Konzentrationen. Damit würden in Wasseruntersuchungen auch die extrem hohen Belastungen von einigen 10000 Zellen/ml nicht erkannt werden (s. Kapitel 1.3.3.1). Unter diesen Umständen sind in den Experimenten keine dAKs mehr eingesetzt worden, wie es im Sandwich-Assay-Format normalerweise üblich ist. Angesichts der kleinen OSDs erschien das als Materialverschwendung.

Für das Verhalten sind verschiedene Gründe möglich. Erstens ist es möglich, dass die Antikörper-Antigen-Bindung zu schwach ist, als dass es zu einer stabilen Bindung kommen würde. In diesem Fall ist das Antikörper-Antigen-Paar nicht adäquat gewählt. Zweitens kann es sein, dass die Flussbedingungen eine stabile Bindung verhindern. Eine Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  könnte ausreichend sein, um die Wahrscheinlichkeit von Bindungen drastisch zu reduzieren. Das wäre besonders dann der Fall, wenn für die Bindung an einem Ort mehr Zeit benötigt wird, als durch die Geschwindigkeit der Zellen zur Verfügung steht. Außerdem könnte es sein, dass eventuell ausgebildete Bindungen aufgrund von Scherkräften wieder reißen. Drittens könnte die Methode selbst nicht adäquat sein, um ganze Zellen zu bestimmen. Wie bereits erwähnt ist die Methode konzipiert für Fälle, in denen die Größe der Analyten in Größenordnungen kleiner oder gleich der Größenordnung der Wellenlänge des eingesetzten Lichts liegen (innerhalb des sichtbaren Lichts ca. 380 nm bis 780 nm). Ganze Zellen (2000  $\mu\text{m}$  in der Länge und mehr) überschreiten die Größenordnung. Die Konsequenzen dessen auf die Signalprozessierung sind schwer abzuschätzen. Es erscheint denkbar, dass die erhaltenen Leg1-Signale, obwohl sie sehr klein sind und sich nicht von unspezifischen Leg1-Signalen auf BSA-OF unterscheiden, trotzdem eine Leg1-gesättigte OF repräsentieren. In diesem Fall wäre die gesamte Methode ungeeignet, um mit ganzen Zellen zu arbeiten.

Viertens kann die Immobilisierungsmethode einen zu hohen Ausfall an bindungsfähigen Antikörpern zur Folge haben. Bei dieser Standardimmobilisierung von Antikörpern auf OTS-OF wird in Kauf genommen, dass die Antikörper auf der OF zufällig orientiert zu liegen kommen (Wang & Jin, 2003; Jung et al., 2008; Kausaite-Minkstimiene et al., 2010). Allgemein wird in der zufälligen Orientierung der Antikörper der Hauptgrund für den Ausfall von 90% der polyklonalen Antikörper gesehen (Abb. 5.1) (Butler et al., 1992; Tanaka et al., 2006). Ein weiterer Grund könnte sein, wie Tanaka et al. zeigten, dass auch adäquat ausgerichtete Antikörper aufgrund der Immobilisierung Konformationsänderungen durchmachen können, die zu Veränderungen in Spezifität und Affinität bis hin zum Funktionsverlust führen könnten (Tanaka et al., 2006).



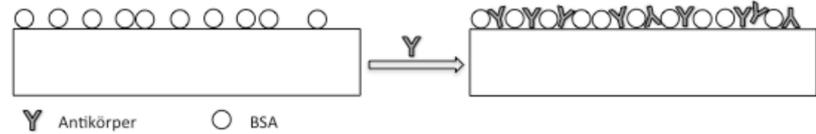
**Abb. 5.1: Orientierung von polyklonalen Antikörpern auf OTS-funktionalisierte Glaschips.** Immobilisierung aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen.

Die in Kapitel 4.1.1.5 präsentierten Experimente hatten zum Ziel die Orientierung zu verbessern und den möglichen Kontakt der Antikörper mit der OTS-OF zu verringern. Dazu wurden BSA-Moleküle einer Konzentration auf die OTS-OF appliziert, dass die OF nicht BSA-gesättigt wird. Zwischen den BSA-Molekülen sollte genug Platz für Immobilisierung von Antikörpern bleiben. Das „Parken“ von Antikörpern zwischen den BSA-Molekülen sollte zum einen die Kontaktfläche der Antigen-bindenden Bereiche des Antikörpers mit der OTS-OF minimieren. Zum anderen wurde eine bessere Ausrichtung der Antigen-bindenden Bereiche erwartet (s. Abb. 5.2). Die Ergebnisse, welche in Kapitel 4.1.1.3.3

Die in Kapitel 4.1.1.5 präsentierten Experimente hatten zum Ziel die Orientierung zu verbessern und den möglichen Kontakt der Antikörper mit der OTS-OF zu verringern. Dazu wurden BSA-Moleküle einer Konzentration auf die OTS-OF appliziert, dass die OF nicht BSA-gesättigt wird. Zwischen den BSA-Molekülen sollte genug Platz für Immobilisierung von Antikörpern bleiben. Das „Parken“ von Antikörpern zwischen den BSA-Molekülen sollte zum einen die Kontaktfläche der Antigen-bindenden Bereiche des Antikörpers mit der OTS-OF minimieren. Zum anderen wurde eine bessere Ausrichtung der Antigen-bindenden Bereiche erwartet (s. Abb. 5.2). Die Ergebnisse, welche in Kapitel 4.1.1.3.3

## 5 | DISKUSSION

präsentiert worden sind, legen für diesen Zweck eine BSA-Konzentration von 50 µg/ml nahe, weil diese Konzentration einerseits ausreicht, um die Bindung der Zellen an die



**Abb. 5.2: Immobilisierungsschema.** Links – mit BSA vorbehandelter OTS-Chip (BSA-Konzentration < Sättigungskonzentration). Rechts – Zwischen den BSA-Molekülen eingeparkte polyklonale Antikörper.

OTS-OF vollständig zu blockieren und die OTS-OF andererseits noch nicht vollständig blockiert ist.

Die Immobilisierung von AK237744 verschiedener Konzentrationen führt erst bei einer AK237744-Konzentration von 200 µg/ml zu einem deutlich Signalanstieg. Trotz der hohen Konzentration wurde nur ein Signal von 273 IU gemessen (im Vergleich zu den anderen AK237744-Konzentrationen, bei denen ein mittleres Signal von 25,6 IU gemessen wurde). Das deutet zunächst darauf hin, dass die BSA-Belegung der OTS-OF unerwartet hoch ausfällt, so dass nur wenige Antikörper zwischen dem BSA binden konnten. Andererseits kann man aber auch vermuten, dass bei geringen Antikörperkonzentrationen im Fluss, die Wahrscheinlichkeit an freie Stellen auf einer ansonsten weitgehend mit BSA-belegten OF zu binden, recht gering ist. Es kann auch erwartet werden, dass je höher die Konzentration der Antikörper im Fluss ist, desto höher ist auch die Bindungswahrscheinlichkeit der Antikörper. Letztlich konnte unter keinen der getesteten Bedingungen eine Immobilisierung von Leg1-Zellen festgestellt werden. Das höchste Leg1-Signal von knapp 400 IU wurde bei einer AK237744-Konzentration von 10 µg/ml gemessen (s. Kapitel 4.1.1.3.3, Abb. 4.11 C). Angesichts der Tatsache, dass bei der Immobilisierung von AK237744 nur ein Signal von weniger als 50 IU gemessen worden ist (s. Kapitel 4.1.1.3.3, Abb. 4.11 B), ist es ausgeschlossen, dass das gemessene Leg1-Signal eine spezifische Bindung indiziert. Auch bei einer Konzentration von 200 µg/ml AK237744 wurde letztlich nur ein Leg1-Zellen-Signal von weniger als 350 IU gemessen. Auch dieser Wert, wäre er als Signal einer spezifischen Bindung interpretierbar, ließe wenig Spielraum für verwertbare Signale bei Leg1-Konzentrationen kleiner als den eingesetzten  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Der „Proof of Principle“ mit dieser Strategie muss daher auch als gescheitert angesehen werden.

**Anmerkung:** Die Experimente, die in den Kapiteln 5.1.1.4 und 5.1.1.5 diskutiert worden sind, wurden vor der Funktionalisierung mit technischem Aceton gereinigt. Dasselbe gilt für die Chips, welche für die Experimente in Kapitel 4.1.4 verwendet worden waren. Mit Aceton sollte eine Grundreinigung erfolgen. In allen anderen Versuchen wurde Aceton für Gaschromatographie verwendet. Es bestand die Befürchtung, dass die Qualität von technischem Aceton mehr dazu beitrage, die OF, welche für hochsensible oberflächenchemische Reaktionen vorbereitet werden sollten, zu verschmutzen als sie zu reinigen. Möglicherweise ist die Qualität der OTS-OF durch die Behandlung der rohen Chips mit

technischem Aceton nicht vermindert worden, da darauf noch die Reinigung mit NaOH und Piranha-Lösung folgten.

#### 5.1.1.6 Antikörperimmobilisierung auf OTS/Protein A-Oberfläche

Die erfolglosen Versuche, Legionellen-Zellen auf einer mit fAK-ausgestatteten OF zu binden, ist vermutlich auf den hohen Verlust an bindungsfähigen fAK infolge ihrer Immobilisierung zurückzuführen. Auch die üblichen kovalenten Kopplungsstrategien, welche die Immobilisierung von Antikörpern über deren Amino- oder Carboxygruppen anstreben, führen letztlich zu einer Zufallsorientierung auf der OF, da diese Gruppen statistisch über Antikörper verteilt sind. Außerdem kommt es auch bei diesen Strategien zu erheblichen Funktionsverlusten (Leckband & Langer, 1990). Um die Wahrscheinlichkeit von erwünschten Bindungsereignissen zu erhöhen, liegt es nahe, Antikörper möglichst so auf der OF auszurichten, dass die Antigen-bindenden Bereiche zum Pufferstrom weisen und sie möglichst schonend an die Oberfläche zu binden. Der Einsatz von Protein A kann zu diesen Zwecken sehr hilfreich sein, da es in der Lage ist, Antikörper über ihren Fc-Teil zu binden, also über jene Region, die keine Antigen-Interaktionsstellen besitzt (s. Kapitel 1.2.1, Abb. 1.5). Eine Immobilisierung von Protein A auf einem Glaschip mit anschließender Antikörper-Immobilisierung könnte zu einer besseren Orientierung der Antigen-bindenden Stellen des Antikörpers führen. Außerdem wird durch die spezifische Immobilisierung die strukturelle Integrität der AK gewahrt. Deshalb wurde untersucht, ob hydrophob immobilisiertes Protein A eine effektivere Antikörper-Immobilisierung erlaubt.

Zunächst wurde untersucht, welche Protein A-Konzentration zur effektivsten Antikörper-Immobilisierung führt. Eine Reihe Protein A-Proben unterschiedlicher Konzentration wurde auf OTS-Oberflächen appliziert. Der untypische Signalverlauf bei den Protein A-Konzentrationen von 500 bzw. 1000  $\mu\text{g/ml}$  ist möglicherweise auf eine Überladung der OF mit Protein A zurückzuführen, die zur Bildung von instabilen Mehrfachschichten führt, die wieder kollabieren. Die Bindungskurven der drei niedrigeren Konzentrationen zeigten den typischen Bindungskurvenverlauf. Da die OSDs am Ende der Dissoziationsphase bei den Konzentrationen von 100  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$  sehr ähnlich ausfielen (1627 IU bzw. 1621 IU), ohne dass die BSA-Signale unterschiedlich ausfielen (659 IU bzw. 657 IU), wurde angenommen, dass die OF bereits durch die Applikation von Protein A bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  maximal mit Protein A belegt sei. Das Nettosignal bei Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Protein A ist nur geringfügig kleiner (1435 IU). Entscheidend für die Wahl der 50  $\mu\text{g/ml}$ -Konzentration als Arbeitskonzentration war, dass das BSA-Signal bei der 10  $\mu\text{g/ml}$ -Konzentration mit 850 IU größer ausfiel als bei der 50  $\mu\text{g/ml}$ -Konzentration. Von der Protein A-Konzentration, bei der die niedrigsten BSA-Signale gemessen worden ist, wurde angenommen, dass sie die OF maximal belegt.

Als nächstes wurde untersucht, welche Antikörper-Konzentration am effektivsten für die Bindung von Legionellen-Zellen ist. Dazu wurden vor jeder AK-Konzentration jeweils 50  $\mu\text{g/ml}$  Protein A im-

mobilisiert. Während dieser Experimente wurde eine entscheidende Entdeckung gemacht, die an dieser Stelle diskutiert werden muss, bevor zum eigentlichen Thema zurückgekehrt wird: Aus Kostengründen wurde dazu übergegangen das zur Funktionalisierung verwendete Toluol zu sammeln und durch Destillation zu reinigen, so dass es für weitere Funktionalisierungen wiederverwendet werden konnte. Bei dieser Gelegenheit wurde es auch mit Natrium getrocknet. Die Protein A-Immobilisierungsergebnisse fielen auf Chips, welche mit Hilfe von getrocknetem Toluol funktionalisiert worden sind, signifikant besser reproduzierbar aus (vgl. Kapitel 4.1.2, Abb. 4.21 & Tab. 4.6). Eine Möglichkeit der Interpretation ist die folgende: Laut White und Tripp kann die Funktionalisierung mit Silanen nicht ohne Wasser stattfinden. Andererseits ermöglicht Wasser im Lösungsmittel diejenigen Polymerisations-Reaktionen im Lösungsmittel, die erst an der Oberfläche erfolgen sollen, was zu einem Ausfällen des OTS führen kann. Zu mangelnder Reproduzierbarkeit kommt es gemäß diesem Modell aufgrund der Tatsache, dass viele Silanmoleküle schon im Lösungsmittel polymerisieren. Dadurch stehen weniger monomere Silanmoleküle zur Verfügung, die an der OF adsorbieren und durch kontrollierte Hydrolyse- und Kondensations- bzw. Polymerisationsreaktionen definierte Self-Assembled-Monolayers (SAM) bilden können (White & Tripp, 2000). Idealerweise sollten sich OTS-Moleküle auf eine fest an das Glassubstrat gebundene Wasserschicht setzen, dort unter dem Einfluss des OF-Wassers zu Methanol und Octadecyltrihydroxysilan hydrolysieren und anschließend polymerisieren. Der SAM stabilisiert sich dann aufgrund von van-der-Waals-Kräften zwischen den Alkylketten des Silans (Sullivan & Huck, 2003). Die Moleküle werden zunächst durch Wasserstoffbrückenbindungen an den Wasserfilm an der OF gebunden. Einerseits muss also OF-Wasser vorhanden sein, damit es zu einer Adsorption der Silane kommt, andererseits soll das Wasser im Lösungsmittel aber minimal sein, damit es nicht zu Polymerisierung und Ausfällung im Lösungsmittel kommt. Gemäß der Funktionalisierungsvorschrift werden die Chips nach der Inkubation in Piranha-Lösung zunächst in ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wird mit Methanol das Wasser entfernt und danach mit Toluol das Methanol. Nicht trockenes Toluol ist wassergesättigt (in handelsüblichem Toluol beträgt der Wassergehalt ca. 1% (Kreitmeier, 2001)). Trockenes Toluol dagegen wäre nun in der Lage, einen Teil des Wassers, welches noch auf der OF leicht gebundenen ist, zu entfernen. Die ersten Wassermolekülschichten, welche näher an der Glasoberfläche liegen, werden stärker gebunden, als diejenigen, die folgen bzw. weiter von der OF entfernt liegen (P. Van Der Voorta & Vansanta, 1996). Trockenes Toluol könnte einige lose gebundene Wassermoleküle von der OF entfernen, so dass ein Wasserfilm übrig bleibt, der von trockenem Toluol nicht weiter abgetragen werden kann. Nur mit diesem stabilen Restwasserfilm kann es gemäß White und Tripp zu einer Reaktion zwischen Silanen an der Oberfläche untereinander und zwischen Silanen und OF-OH-Gruppen kommen. Nach dreimaligem Spülen mit trockenem Toluol ist also zu erwarten, dass noch OF-Wasser vorhanden ist. Die OTS-Funktionalisierung findet auch in trockenem Toluol statt, so dass im Lösungsmittel die Polymerisation

wenn nicht eliminiert, so doch enorm minimiert sein sollte. Diese Überlegungen könnten den festgestellten Effekt erklären. Der Schritt bei 220 °C ist nötig, um Kondensationsreaktion zwischen benachbarten Trisilanolen und den Trisilanolen und den OF-Silanolen anzuregen. So entsteht das 2-dimensionale Polysiloxan-Netzwerk an der OF (Van Der Voorta & Vansanta, 1996).

Im weiteren Verlauf der Experimente wurden nach der Applikation von fAK unterschiedlicher Konzentration jeweils eine Probe Legionellen ( $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) injiziert. Die Signale der Antikörperbindung entwickeln sich folgerichtig, d.h. höhere Konzentrationen ergeben höhere Signale. In einem Kontrollexperiment wurde kein Antikörper appliziert. In diesem Fall wurde ein unspezifisches Signal von 336 IU gemessen, nachdem Legionellen injiziert worden waren. Bei den Antikörperkonzentrationen von 10 µg/ml bzw. 500 µg/ml wurden Nettosignale von ca. 600 IU nach Legionellen-Applikation gemessen. Abzüglich des unspezifischen Signals von ca. 300 IU bleiben etwa 300 IU spezifisches Signal übrig. Das Ergebnis der Versuche schien nicht vielversprechend, um unter diesen Bedingungen mit einer Legionellen-Verdünnungsreihe fortzufahren. Ein spezifisches Signal von 300 IU bei einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml würde kaum Raum für niedrigere Zell-Konzentrationen bieten. Es ist zu erwarten, dass die Anzahl funktionaler Antikörper durch diese Strategie erheblich gesteigert worden ist, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit für Bindeereignisse höher sein sollte. Wang und Jin wiesen nach, dass dies tatsächlich so ist: Antikörper auf Protein A-OF binden ihren Ergebnissen zufolge mehr Protein-Antigen als es Antikörper tun, die hydrophob immobilisiert wurden (Wang & Jin, 2003). In der vorliegenden Arbeit führt die erhöhte Wahrscheinlichkeit für Bindungsereignisse im Vergleich zur Strategie mit hydrophob immobilisierten Antikörpern jedoch nur zu einer unwesentlichen Erhöhung der Bindungssignale spezifischer Bindung (Signale aufgrund von spezifischer Bindung: 300 IU bei Protein A-Strategie, 114 IU bei AK-Immobilisierung aufgrund hydrophober Interaktionen; 290 IU bei AK-Immobilisierung aufgrund hydrophober Interaktion mit vorhergehender BSA-Immobilisierung). Das kann aber daran liegen, dass mit ganzen Zellen gearbeitet wurde, statt mit Proteinen. Insofern kann nur festgestellt werden, dass die Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit durch Protein A-immobilisierte Antikörper im Fall von ganzen Zellen das Problem nicht lösen konnte. Im Raum stehen noch immer die Fragen, ob sich Zellen überhaupt mit RfS nachweisen lassen, ob sie vielleicht nur im Flusssystem nicht auf OF eingefangen werden können, oder ob andere Gründe für den Misserfolg verantwortlich sind? Ein positiver Befund dagegen ist, dass sich Protein A auf OTS-OF immobilisieren lässt und noch Bindungsaktivität gegenüber Antikörpern besitzt. Wang und Jin wiesen dies schon für Dichlordimethylsilan-modifizierte OF nach (Wang & Jin, 2003). Die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen ihren Befund, dass Protein A durch hydrophobe Wechselwirkung sehr gut reproduzierbar auf OF immobilisierbar ist. Meist wird Protein A kovalent auf Oberflächen immobilisiert (z.B.: Jakovleva et al., 2003). Das verlangt aber nach einer komplexeren OF-Chemie, die mehr

Zeit in Anspruch nimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass lediglich eine OTS-Funktionalisierung von 6 Stunden nötig ist, um Protein A reproduzierbar zu immobilisieren. Jeder weitere Schritt komplexerer OF-Chemie bringt auch neue Fehlermöglichkeiten mit sich, die das Ergebnis beeinträchtigen könnten. Ob sich durch die hier vorgeschlagene Strategie absolut gesehen ähnlich viel Protein A auf der OF-immobilisiert lässt wie mit Methoden der kovalenten Protein A-Kopplung an Oberflächen, ist im Rahmen der Arbeit nicht untersucht worden. Tanaka et al. vermuten, dass auch die Immobilisierung von Protein A aus denselben Gründen, die für Antikörper angeführt werden, zu Funktionsverlusten führt, ohne dies jedoch explizit zu belegen (Tanaka et al., 2006). Protein A ist jedoch ein Pentamer aus fünf identischen Monomeren, die jeweils eine Fc-Binde-Domäne besitzen. Turkova zufolge werden drei der fünf Monomere bei der Immobilisierung inaktiviert (Turkova, 1999) sei es, weil sie Kontaktpunkte zur OF darstellen und ihre Bindungsstellen dadurch nicht zugänglich sind oder durch den Kontakt denaturieren. Durch die pentamerische Natur von Protein A bleibt die Funktionalität von zwei Monomeren jedoch erhalten. Die hier vorgestellte Methode scheint wegen ihrer schnellen Präparierbarkeit und dem Vermeiden von chemischen Modifikationen sehr hilfreich.

### 5.1.1.7 Antikörperimmobilisierung auf OTS/ConA-SAv-Oberfläche

Im Folgenden werden Experimente diskutiert, die aus Überlegungen hervorgegangen sind, welche zunächst nichts mit dem hier dargestellten Legionellen-Projekt zu tun hatten. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente führten zu einer unerwarteten Applikation eines ConA-SAv-Fusionsproteins, welches im Rahmen des „Multiprot“-Projekts im AK Keusgen von Nina Dassinger hergestellt wurde. Dadurch ergab sich für das Legionellen-Projekt eine unerwartete Anwendung des ConA-SAv-Fusionsproteins. Ausgangspunkt für diese Entwicklung war zunächst die Überlegung, Analyten mit Hilfe von Lektinen aus einer beliebigen Matrix heraus auf einer OF einzufangen. Eine Reihe von Proteinen besitzt Glykosylierungen, in denen z.B. Mannose vorkommt. Das ist z.B. bei Fibrinogen der Fall (Díaz-Mauriño et al., 1984), welches eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielt und in den Experimenten als Analyt für einen „proof of principle“ verwendet wurde.

In Kapitel 4.1.3.1.1 konnte gezeigt werden, dass ConA auf OTS-OF immobilisiert werden kann. Das kleine Signal nach Applikation von BSA legt nahe, dass die OF bei der eingesetzten Konzentration als gesättigt anzusehen ist und diese durch ConA für BSA passiviert wird. Allerdings schlug die Fibrinogen-Immobilisierung auf der ConA-belegten OF fehl. Zwei wesentliche Möglichkeiten stehen im Raum, die als Erklärung dieses Ergebnisses dienen können. Zunächst ist es möglich, dass ConA bei der Immobilisierung aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen degeneriert und seine Bindungsfähigkeit verliert. Zum anderen ist es auch möglich, dass ConA sich derart auf einer OTS-OF ausrichtet, dass sich die Zuckerbindestellen nicht nach oben, dem Pufferstrom zugewandt, orientieren. In Er-

mangelung eines weiteren Analyten, der Mannose-Glykosylierungen enthält, konnte das Experiment nur mit Fibrinogen durchgeführt werden. Außerdem wurde in Kapitel 4.1.3.1.2 überprüft, ob sich Streptavidin hydrophob immobilisieren lässt. Typischerweise wird Streptavidin kovalent immobilisiert (s. Einleitung). Ließe es sich ähnlich wie ConA hydrophob immobilisieren, könnte man die komplexere kovalente OF-Chemie umgehen. Wie sich zeigte, ließ sich Streptavidin unter den gewählten Bedingungen nicht immobilisieren. Der theoretische Isoelektrische Punkt von Streptavidin liegt laut „ProtParam tool“ bei pI 6,06. Diamandis und Christopoulos geben einen pI von 5-6 an (Diamandis & Christopoulos, 1991). Das indiziert, dass es bei den gewählten pH-Bedingungen von pH 7,3 geladen vorliegt und dadurch hydrophil ist. Besonders hydrophobe Bereiche, die dem Protein amphiphile Eigenschaften verleihen würden und die eine Immobilisierung über diese Bereiche ermöglichen würden, scheint das Protein nicht zu besitzen.

Aufgrund des Befunds, dass sich ConA auf OTS-OF hydrophob immobilisieren lässt, Streptavidin aber nicht, wurde vermutet, dass sich das ConA-SAV-Fusionsprotein, welches im Rahmen des Multiprot-Projekts von Nina Dassinger hergestellt worden ist, als Linkerprotein zwischen einer hydrophoben OTS-OF und biotinylierten Antikörpern einsetzen lasse. Eine Kombination der beiden Proteine in einem Fusionsprotein könnte dem Fusionsprotein beide Eigenschaften verleihen: Immobilisierbarkeit via ConA-Anteil und Antikörperbindung via Streptavidin-Anteil. Zunächst wurde getestet, ob sich ConA-SAV so immobilisieren lässt, dass biotinylierte Antikörper (bAK) gebunden werden können. Dazu wurde Antikörper-Antigenpaar „anti-IgG b-Antikörper“ - „anti-Ig-fraction Antikörper“ verwendet. „anti-IgG b-Antikörper“ ist ein biotinylierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper „anti-Ig-fraction Antikörper“ (=Analyt) gerichtet ist. Die Experimente zeigten, dass sich ConA-SAV immobilisieren lässt und nach Blockierung unspezifischer Bindestellen auch eine Bindung des bAK erfolgt. Das Kontrollexperiment mit bAK auf einer nur mit BSA-gesättigten OF zeigte zwar auch eine Bindung aber diese fiel mit 253 IU sehr niedrig aus. Daraus wurde geschlossen, dass der bAK auf der ConA-SAV-belegten OF aufgrund des Biotins gebunden worden ist. Weitere Experimente zeigten, dass ab einer ConA-SAV-Konzentration von 100 µg/ml ConA-SAV eine BSA-Applikation zu keinem weiteren Signalanstieg führte. Die halblogarithmischen Gegenüberstellung der ConA-SAV-Konzentrationen und der BSA- und ConA-SAV-Signale am Ende der jeweiligen Dissoziationsphasen zeigt, dass die OTS-OF erst ab einer Konzentration zwischen 200 µg/ml-500 µg/ml ConA-SAV als gesättigt betrachtet werden kann. Das zeigt, dass ConA-SAV weniger affin zur OTS-OF ist als Antikörper, mit denen schon bei 50 µg/ml bis 100 µg/ml eine Sättigung der OF zu erreichen ist. Für die Immobilisierung von bAK scheint es aber unerheblich zu sein, ob 100 µg/ml, 200 µg/ml oder 500 µg/ml ConA-SAV immobilisiert worden ist. Die gemessenen bAK-Signale zeigen, dass ab einer ConA-SAV-Konzentration von 100 µg/ml durch Erhöhung der ConA-SAV-Konzentration keine weiteren Bindestellen für bAK eingeführt werden können. Es erscheint möglich, dass bei höheren ConA-SAV-

Konzentrationen eine weitere Schicht ConA-SAv auf der OF zu entstehen beginnt. Der Umstand, dass ConA-SAv-Proteine nach Expression in *E. coli* und Zellaufschluss in Einschlusskörperchen (inclusion bodies) vorliegen, zeigt, dass Interaktionen möglich sind, welche die Bildung von Mehrfachsichten begünstigen könnten.

Das Streptavidin-bAK-System findet in der Biotechnologie sehr häufig Anwendung (Diamandis & Christopoulos, 1991; D’Orazio, 2011). Das Streptavidin spielt dabei die Rolle eines Linkerproteins zwischen OF und Antikörpern. Dadurch wird der direkte Kontakt des Antikörpers mit der OF vermieden und damit auch viele der Effekte der OF auf die Antikörper. So können Funktionsverluste und Änderungen in Affinität und Spezifität aufgrund von totaler bzw. partieller Denaturierung minimiert werden. Sofern die Biotinylierung nicht gerichtet sondern zufällig erfolgt, wird die Orientierung der Antigen-bindenden Epitope allerdings ähnlich zufällig ausfallen, wie es bei adsorptiven oder den meisten kovalenten Immobilisierungsmethoden der Fall ist (Jung et al., 2008). Ein Nachteil ist, dass die Antikörper durch die Biotinylierung chemisch modifiziert werden. Da Biotin mit 244 Da ein im Vergleich zu Antikörpern (150000 Da) sehr kleines Molekül ist, stellt dessen Bindung an Antikörper keinen sehr starken Eingriff in die Struktur des AK dar, wenn darauf geachtet wird, dass pro Antikörper möglichst wenige Biotinmoleküle gebunden werden (Davies et al., 1994). Die Anzahl der Biotine pro Antikörper des hier verwendeten Antikörpers war nicht zu erfahren. Davies et al. berichten von 60% funktionalen Antikörpern auf einer OF, unter Verwendung des Streptavidin-Biotin-Systems (Davies et al., 1994). Streptavidin muss jedoch zunächst durch kovalente Kopplungschemie auf der OF immobilisiert werden. Dadurch unterliegt es denselben OF-Effekten wie Antikörper, die direkt an OF gekoppelt werden. Da Streptavidin ein überaus stabiles Protein ist, ist durch den Kontakt mit einer OF ein weniger starker Funktionsverlust als bei Antikörpern zu erwarten. Jedoch ist auch die kovalente Immobilisierung ein Verfahren, welches zu einer zufälligen Orientierung der Biotin-Bindestellen führt. Der Nachteil wird kompensiert durch das Vorkommen von Streptavidin als Homotetramer mit vier Biotinbindestellen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich bei dessen Immobilisierung Biotinbindestellen in adäquater Weise ausrichten, ist viel größer als bei einem Monomer (Davies et al., 1994). Mit dem ConA-SAv wurde ein Tool entwickelt, welches die Vorteile von Streptavidin konserviert und sich wesentlich einfacher immobilisieren lässt. Inwieweit die Streptavidin-Funktionalität durch die Fusion mit ConA zu ConA-SAv im Vergleich zu Streptavidin verändert ist, wurde nicht untersucht.

Bei der Anwendung des Fusionsproteins im Rahmen der Legionellen-Experimente wurde die niedrigste Sättigungskonzentration von ConA-SAv (200 µg/ml, 80 µl) verwendet. Die Hoffnung auf verwertbare Signale mit dieser Strategie wurde leider enttäuscht, da bei allen getesteten bAK-Konzentrationen kein Signal größer als 426 IU gemessen werden konnte. Außerdem waren die Signale mit Werten zwischen 325 IU-426 IU alle recht ähnlich und damit unabhängig von der bAK-Konzentration. Das Signal bei 10 µg/ml ist mit 426 IU zwar ca. 25% größer als die Signale, die bei den anderen Antikörper-

per-Konzentrationen gemessen wurden. Aber auch dieses Signal wäre für die Quantifizierung als nicht zielführend klein einzuordnen. Angesichts der Tatsache, dass es bei Injektion von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml gemessen wurde, ist nicht zu erwarten, dass sich bei geringeren Konzentrationen Signale messen ließen, die sich für eine Quantifizierung eigneten. Die Protein A-Strategie lieferte zumindest ein Signal von höchstens 602 IU. Da die ConA-SAv-Strategie sich gegenüber der Protein A-Strategie nicht als überlegen zeigte, wurde auf Kontrollexperimente verzichtet, welche die unspezifische Bindung von Legionellen auf einer ConA-SAv-belegten OF aufzeigen hätten können. Wenn man die erreichten Signale beider Strategien als ausreichend für einen spezifischen qualitativen Nachweis gelten lassen möchte, bleibt immer noch die Frage nach dem Grund, warum so große Objekte wie ganze Zellen bei adäquater Immobilisierung Signale ergeben, die derart klein sind.

Die Experimente, deren Ergebnisse in Kapitel 4.1.3.3 präsentiert wurden, sind auf OTS-Chips durchgeführt worden, welche mit trockenem Toluol funktionalisiert worden waren. Zuvor wurde aber unter gleichen Bedingungen eine erste Versuchsreihe mit ConA-SAv auf Chips durchgeführt, welche in nichttrockenem Toluol funktionalisiert worden waren. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass das Bindungssignal auf Chips, welche in trockenem Toluol funktionalisiert worden waren, im Mittel um 553,2 IU höher lag als es bei den Chips

der Fall war, die in nichttrockenem Toluol hergestellt worden waren. Da in Zukunft die Funktionalisierung sowieso in trockenem Toluol durchgeführt werden würde, war der Unterschied für keinerlei Entscheidung relevant, so dass auf einen Signifikanz-Test verzichtet wurde. Außerdem ist schon im Zusammen-

Linkerprotein	Toluol-Status	N	StDev [IU]	SPW [IU]
Protein A	nwf	11	336,02	937
	wf	7	86,67	238
ConA-SAv	nwf	5	391,69	1014
	wf	5	413,64	994

Tab. 5.1: Vergleich der Standardabweichungen und Spannweiten der gemessenen Sensorsignale nach Protein A- bzw. ConA-SAv-Immobilisierung auf OTS-OF, die unter Verwendung von wasserfreiem (wf) bzw. nicht-wasserfreiem Toluol (nwf) hergestellt worden sind. StDev – Standardabweichung; SPW – Spannweite; N – Anzahl der Messungen.

menhang mit der Protein A-Immobilisierung auf OTS-OF, dass die Verwendung von wasserfreiem Toluol einen signifikanten Unterschied ausmachen kann. Wäre der Unterschied für ConA-SAv nicht signifikant, müsste das auf das ConA-SAv zurückgeführt werden. Das ConA-SAv ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus ConA- bzw. SAv-Monomeren, welche in der Natur als Tetramere vorkommen. Daraus ergibt sich zumindest eine hohe Wahrscheinlichkeit für Aggregatbildungen, welche im Endergebnis den Effekt der OF-Modifikation in wasserfreiem bzw. nichtwasserfreiem Toluol unerkennbar machen. Die Fähigkeit der Aggregatbildung zeigt sich in der Tatsache, danach der Expression und Aufreinigung als Einschlusskörperchen vorliegen. Auch aus diesem Grund würde in dem ConA-SAv-Fall sowohl ein signifikanter als auch ein nichtsignifikanter Unterschied keine Informationen über den Effekt von Wasser im Toluol auf die OF-Modifikation liefern. Die Standardabweichung von den Mit-

telwerten und die Spannweite der Einzel-Ergebnisse waren jedenfalls in beiden Fällen ähnlich. Ein Vergleich der Ergebnisse der Protein A-Experimente und den ConA-SAv-Experimenten liefert folgendes Ergebnis (s. auch Tab. 5.1): Die Standardabweichung von den Mittelwerten, die sich bei der Immobilisierung von Protein A auf Chips ergibt, die mit nichttrockenem Toluol funktionalisierte Chips worden waren (nwfChips) fällt um 15% kleiner aus, als die Standardabweichung bei den entsprechenden Experimenten mit ConA-SAv. Die Standardabweichung der gemessenen Protein A-Signale, welche sich bei entsprechenden Experimenten auf Chips ergibt, welche mit trockenem Toluol funktionalisiert worden waren, fällt 75% geringer aus als im Fall der ConA-SAv-Immobilisierung. Offenbar ist es für die Protein A-Immobilisierung bedeutsam, ob sie auf Chips stattfindet, die in trockenem Toluol funktionalisiert worden sind oder auf Chips, die in nicht-trockenem Toluol hergestellt worden sind. Für die ConA-SAv-Immobilisierung scheint das jedoch unerheblich zu sein. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten sind völlig unklar.

### Zwischenfazit

Das „Capturing“ von Legionellen war weder mit immobilisierten fAKs noch mittels fAK-Immobilisierung mit vorhergehender BSA-Immobilisierung, noch unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems und Protein A erfolgreich. Die erzielten Legionellen-Bindungssignale fielen angesichts der eingesetzten Legionellen-Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml zu niedrig aus, um Bioassays zu entwickeln, mit denen Legionellen-Kontaminationen in Wasser quantifiziert werden könnten. Das höchste Sensorsignal unter diesen Bedingungen wurde unter Anwendung der Protein A-Strategie gemessen. Es betrug 602 IU. Unter Abzug unspezifischer Bindung bleibt ein Signal aufgrund von spezifischen Bindungen von 300 IU. Tabelle 5.2 fasst die besten Ergebnisse zusammen. Die Detektion von Legionellen bei einem geforderten Technischen Maßnahmenwert von 100 KBE/100 ml unmöglich. Auch die Detektion von 1000 KBE/100 ml, ab der eine Sanierung notwendig ist, scheint außer Reichweite und ebenfalls Konzentrationen von 10000 KBE/100 ml, die als hohe Belastungen gelten

Strategie	Antikörper	AK-Konzentration	Sensorsignal (EDP)
<b>Protein A</b>	AK237744	10 µg/ml	600 IU
<b>SAF</b>	AK237744	50 µg/ml	250 IU
<b>SAF präBSA</b>	AK237744	200 µg/ml	350 IU
<b>ConA-SAv</b>	AK237744 (Biotin)	10 µg/ml	420 IU

**Tab. 5.2: Vergleich der höchsten Sensorsignale bei den unterschiedlichen Strategien.** Gemessene Sensorsignale am Ende der entsprechenden Dissoziationsphasen (EDP) bei Applikation von Leg1-Zellen einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml (150 µl). Antikörper – eingesetzter Antikörper; AK-Konzentration – Konzentration des AK, bei der das höchste Leg1-Zellen-Signal gemessen wurde; Sensorsignal (EDP) – höchstes gemessenes Sensorsignal am Ende der jeweiligen Dissoziationsphase; SAF – Sandwich-Assay-Format; SAF präBSA – SAF mit vorhergehender BSA-Applikation.

(KBE – koloniebildende Einheiten) (s. Kapitel 1.3.3.1). Eine Lösung dieser Problematik könnte durch eine Anreicherung der Zellen aus einem größeren Volumen mittels Filtration erreicht werden. Auch

eine Vorinkubation mit spezifischen Antikörpern und eine anschließende Anwendung der RIF-Plattform wären eine mögliche Lösung. Dazu müssten antikörperbindende Komponenten wie Protein A bzw., im Fall von bAKs, ConA-SAv auf der OF immobilisiert werden. Dadurch könnte eventuell die Bindungswahrscheinlichkeit von Zellen, an die bereits Antikörper gebunden sind, an die OF, erhöht werden. Der Antikörpertest in Mikrotiterplatten (Kapitel 4.1.1.2) zeigte zwar eine spezifische Bindung von AK237744 an, jedoch ließ das Ergebnis schon die Vermutung aufkommen, dass die Affinität des AK zu den Zellen zu gering sein könnte.

## 5.1.2 Experimente mit fAKs und Leg1P-Zellen

### 5.1.2.1 Vorversuche

Die ersten mit Leg1G3 unternommenen Experimente (Kapitel 4.1.5.1) zeigten, dass weder Leg1P-Zellen noch der AK Leg1G3 an den Blockierer (BSA) binden können. Zu diesem Zeitpunkt standen allerdings nur Hitze-deaktivierte Legionellen-Zellen zur Verfügung, die auf BCYE-Platten gezüchtet worden sind. Außerdem zeigte ein Experiment, dass Leg1G3 an eine zuvor immobilisierte Legionellen-LPS-Präparation bzw. an zuvor immobilisierte, hitzedeaktivierte Legionellen binden kann. Im Fall der hitzedeaktivierten Zellen ergaben infolge der Immobilisierung nur ein um etwa 500 IU höheres Signal als bei der LPS-Immobilisierung. Auch hier stellt sich die Frage, warum so große Objekte wie Zellen nicht wesentlich höhere Signale ergeben, als es kleine Objekte wie LPS (s.u.) tun. Die Blockierung mit BSA zeigte, dass im Falle der LPS sogar noch ein recht hohes BSA-Signal gemessen wird, während bei hitzedeaktivierten Zellen kein Signalanstieg festzustellen war. Das suggeriert den unwahrscheinlichen Fall, dass auf der OF im Fall der hitzedeaktivierten Zellen kein Raum mehr zur Bindung von BSA vorhanden ist. Man könnte versucht sein, zu schließen, die OF sei mit Hitze-deaktivierten Zellen gesättigt. Gegen diese Vermutung spricht jedoch einerseits, dass die Signale von hitzedeaktivierten Zellen gegen jede Erwartung nur geringfügig größer ausfallen als jene der viel kleineren LPS. Hitzedeaktivierung gilt als ein massives Zelltötungsverfahren, bei dem Zellen höchstwahrscheinlich zerstört werden. Dann liegen größere und kleinere Fragmente in der Probe vor. (Außerdem könnten eventuelle Antigene denaturieren.) Das gemessene Signal könnte in diesem Fall also auf eine Sättigung der OF mit einigen Antigenen und diversen anderen Zellbestandteilen (vor allem Proteine) zurückzuführen sein. Das würde auch erklären, warum kein BSA-Signal gemessen werden konnte. Diese Interpretation wird gestützt durch die Resultate nach der AK-Injektion: das Signal für die hitzedeaktivierten Zellen mit 529 IU war nur etwa halb so groß wie das für die LPS-Präparation mit 1007 IU. Demnach ist bei der LPS-Präparation die Dichte an Antigenen auf der OF höher. Dass die Signale bei Experimenten mit Leg1P und Leg1G3 höher ausfielen als diejenigen, die mit AK237744 und Leg1G (s. Kapitel 4.1.1.4)

gemessen worden sind, kann als Bestätigung gewertet werden, dass es zumindest andere Paare als AK237744 und Leg1G gibt, die sich affiner zueinander verhalten.

### **5.1.2.2 Experimente mit Leg1P und Leg1G3 als fAK und dAK**

Für weitere Experimente stellte das FzMB in Flüssigkultur gezüchtete *L. pneumophila*-Zellen der Serogruppe 1, Stamm Philadelphia, zur Verfügung (Leg1P), die gemäß dem Protokoll, welches auch für den Gießener Stamm (Leg1G) benutzt worden ist, abgetötet worden waren. Es ist demnach davon ausgegangen worden, dass diese schonende Zellabtötungsmethode die Integrität der Zellen nicht stark beeinträchtigt hat. Für die ersten Experimente mit Leg1G3 als fAK wurden aufgrund der Erfahrungen mit AK237744 ab Kapitel 4.1.1.4 die beiden Leg1G3-Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml verwendet. Dieser Konzentrationsbereich schien aufgrund der Ergebnisse in Punkto Bindungsfähigkeit der immobilisierten AKs bzw. der Notwendigkeit von Blockierungen als adäquat. Die fAKs ließen sich wie erwartet immobilisieren (3916 IU (50 µg/ml) bzw. 5019 IU (100 µg/ml)). Die Injektion von BSA ergab bei 50 µg/ml nur ein sehr kleines Nettosignal, während bei 100 µg/ml keines gemessen wurde. Die Legionellen-Applikation führte zu einem Nettosignalanstieg von 3169 IU (50 µg/ml) bzw. 3129 IU (100 µg/ml). Unter diesen Bedingungen gelang nun erstmals die Immobilisierung von Legionellen auf einer OF mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Die beiden Nettosignale unterschieden sich kaum, so dass davon ausgegangen wurde, dass es unerheblich sei, welche der beiden Antikörperkonzentration für eine adäquate Immobilisierung eingesetzt wird. Das Legionellen-Nettosignal nach Injektion von 50 µg/ml Leg1G3 war sogar leicht höher. Anschließend wurde erneut Leg1G3 injiziert, um das Verhalten des Antikörpers als dAK zu testen. Die Bindungssignale von 5804 IU (50 µg/ml) bzw. 6976 IU (100 µg/ml) zeigten, dass Leg1G3 auch als dAK funktioniert.

Zur Kontrolle dieses Resultats wurde ceteris paribus eine Messung mit *E. coli* durchgeführt. Wie sich zeigte, band auch *E. coli* mit 1155 IU an eine mit Leg1G3 belegte Oberfläche. Das Signal fiel aber um 2000 IU niedriger aus als bei Leg1P. Der Einsatz von Leg1G3 als dAK im *E. coli*-Kontrollexperiment führte zu keinem weiteren Nettosignal-Anstieg. Die Immobilisierung von Leg1G3 auf einer OTS-Oberfläche hat unter diesen Bedingungen zur Folge, dass *E. coli* unspezifisch gebunden wird. Der Antikörper bindet jedoch nicht an *E. coli*, wenn er als dAK frei in Lösung ist. Offenbar hat die Immobilisierung eine Veränderung in der Spezifität des Antikörpers zur Folge. Leg1G3 scheint daher als dAK besser geeignet zu sein. Der „Proof of Principle“ ist mit dem Paar Leg1G3-Leg1P also gelungen. Die gemessenen Sensorsignale bei Legionellen-Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml fielen hoch aus, dass es wahrscheinlich erschien, die Detektions- und Nachweisgrenzen hin zu geringeren Legionellen-Konzentrationen zu verschieben. So könnte sogar eine Quantifizierung der Zellen in einem brauchbaren Konzentrationsbereich möglich sein. Die Resultate der zuvor durchgeführten Experimente dagegen ergaben viel zu kleine Signale, die kaum Raum ließen für Signale bei geringeren Konzentrationen als  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Damit erwies sich als Tatsache, dass AK237744 nur geringe Affinität gegenüber

Leg1G-Zellen besitzt. Offensichtlich präsentiert der hier verwendete Wildtyp-Stamm aus Gießen andere Antigene, die bezüglich der kommerziell erhältlichen Antikörper inkompatibel sind. Offenbar sind die Antigene bei Legionellen selbst auf Stammebene sehr variabel (Brindlet et al., 1989; Helbig et al., 1997). Außer dem AK237744-Leg1G-Paar wurden einige Antikörper getestet, die alle noch schlechtere Ergebnisse mit Leg1G ergaben. Für die Entwicklung antikörperbasierter Bioassays zur Legionellen-Detektion wäre die Identifikation eines gattungs- bzw. artspezifischen Antigens und die Produktion eines entsprechenden Antikörpers sehr hilfreich. Die Experimente zeigen, dass eine Immobilisierung aus einer Ganzzell-Suspension unter den BIAffinity<sup>®</sup>-Bedingungen durchaus möglich ist. Damit scheiden einige zuvor für möglich gehaltene Gründe, warum die Ganzzell-Detektion nicht funktionierte, aus. Die Verwendung eines Flusssystems ist kein grundsätzliches Problem. Auch sind die Signale nicht grundsätzlich sehr klein (siehe Kapitel 5.1.1.4). Allerdings liegen die Legionellen-Nettosignale in derselben Größenordnung wie die Signale, die bei Sättigung der OF mit BSA oder Antikörpern gemessen wurden.

### **5.1.2.3 Experimente mit AK237744 als fAK und Leg1E6 als dAK für Leg1P-Zellen**

Normalerweise werden monoklonale Antikörper eher als dAK eingesetzt. Als fAK werden normalerweise polyklonale AK bevorzugt, da sie in der Regel ein größeres Antigenbindungs-Spektrum besitzen und deshalb ein größeres Spektrum an Arten aus einem gewissen Verwandtschaftszusammenhang gezielt aus einem kruden Bakterienmix selektieren können. Monoklonale AK wie Leg1G3 werden meist als AK zur Detektion und Serotypisierung eingesetzt. Mit dem Antikörper AK237744 lag bereits ein polyklonaler AK gegen *L. pneumophila* der Serogruppe 1 vor, mit dem allerdings alle Versuche Leg1G-Zellen in quantifizierbarer Weise auf OF zu binden, scheiterten. Laut des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin des UKGM handelte es sich bei den Zellen um *L. pneumophila* der Serogruppe 1, eines unbekanntes Wildtyp-Stamms aus Gießen. Da der AK AK237744 gegen dieselbe Art und Serogruppe und den Stamm Philadelphia gerichtet ist, bestand der Verdacht, dass hier auf Stammebene relevante Unterschiede vorliegen, welche die Bindung nicht erlaubt haben. Da mit den Zellen des FzmB nun der Stamm Philadelphia vorlag, bot es sich an, den polyklonalen AK AK237744 als fAK mit den Zellen Leg1P (FzmB) zu testen. In Kapitel 4.1.5.4.1 wurde getestet, ob der kommerziell erworbene Antikörper AK237744 als fAK in Kombination mit Leg1P bessere Zell-Immobilisierungs-Ergebnisse ergibt, als er es mit Leg1G tat. Außerdem wurde der AK Leg1E6 vom FzmB getestet.

Ein Experiment mit AK237744 als fAK und Leg1P-Zellen, welches in Kapitel 4.1.5.4.1 präsentiert wurde, lieferte nach Leg1P-Applikation eine OSD von 2689 IU. Zieht man den Wert von 136 IU ab, der in Kapitel 4.1.1.3.3 als unspezifisches Signal von Leg1-Zellen auf BSA-gesättigten OF ermittelt wurde, bleiben 2553 IU als spezifisches Sensorsignal übrig. Die analogen Versuche Leg1G-Zellen auf OF zu immobilisieren, die mit AK237744 ausgestattet worden waren, lieferte dagegen ein spezifisches Sig-

nal von 114 IU (s. Kapitel 4.1.1.3.3) (unter Berücksichtigung der 136 IU unspezifische Bindung auf BSA). Gegenüber den Signalen, die mit Leg1G3 als fAK und Leg1P-Zellen gemessen worden sind, fallen die Signale bei der Bindung der Leg1P-Zellen mit AK237744 als fAK mit AK237744 um etwa 500 IU niedriger aus (3129 IU mit Leg1G3 vs. 2689 IU mit AK237744) (Kapitel 4.1.5.2). Das spezifische „Capturing“ von Leg1P-Zellen kann demnach auch mit AK237744 erfolgen. Nun ist klar, dass die Leg1G-Zellen trotz Zugehörigkeit zur Serogruppe 1 eine Antigenausstattung besitzen, die nicht von AK237744 erkannt werden kann. AK237744 stellt sich als polyklonaler Antikörper heraus, der zumindest *einen* Wildtyp-Stamm nicht erkennen kann. Das kann aber auch bedeuten, dass eventuell viele regional auftretende Wildtypstämme nicht erkannt werden könnten. Diese Pointe stellt zwar für das angestrebte Ziel eines allgemein einsetzbaren Legionellen-Assays auf Basis der RfS-Plattform ein erhebliches Hindernis dar. Jedoch sollten diese Ergebnisse für die Verwendung von Antikörpern in Legionellen-Assays sensibilisieren, verdeutlichen sie doch die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen. Die Applikation von Leg1E6 als dAK ergab für *L. pneumophila* ein deutliches Bindungssignal während für *E. coli* keine Erhöhung festgestellt werden konnte. Damit erweist sich Leg1E6 wie Leg1G3 als adäquater dAK. Ein direkter quantitativer Vergleich der Signale ist anhand der Versuche nicht möglich, da die Zellen im Experiment mit Leg1G3 als dAK auf einer mit Leg1G3 als fAK ausgestatteten OF gebunden wurden und im Experiment mit Leg1E6 auf einer mit AK237744 ausgestatteten OF.

Bei den hier dargestellten Ergebnissen wurde die unspezifische Bindung, welche in Kapitel 4.1.1.3.3 auf 136 IU beziffert worden ist, in Anschlag gebracht. Da in Kapitel 4.1.1.3.3 mit Leg1G-Zellen gearbeitet wurde und nicht mit Leg1P-Zellen ist zunächst unklar, ob sich dieser Wert auf die hier präsentierten Ergebnisse anwenden lässt. Es ist offensichtlich, dass sich die Leg1G-Zellen anders verhalten als die Leg1P-Zellen. Die Experimente mit hitzedeaktivierten Leg1P-Zellen auf BSA-gesättigten OF lieferten jedoch keinerlei Bindungssignal. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die unspezifische Bindung der Leg1P-Zellen, welche statt mit Hitze mit Thimerosal abgetötet worden sind, zumindest keine höhere unspezifische Bindung zeigen als es die Leg1G-Zellen tun.

Das unspezifische *E. coli*-Bindungssignal auf der OTS-OF mit AK237744 ist mit 709 IU um 446 IU kleiner als das unspezifische Signal von *E. coli* auf der OF mit immobilisiertem Leg1G3 (1155 IU). Dieser Unterschied ist in einem Bereich, in dem es schwer fällt, eine Aussage darüber zu machen, ob AK237744 als fAK besser geeignet ist als Leg1G3. Der Unterschied scheint nicht viel größer zu sein als die Größe, in der Bindungssignale schwanken können. Aufgrund dieses Unterschieds in der unspezifischen Bindung von *E. coli* und der Tatsache, dass polyklonale Antikörper sich als fAK besser eignen, da sie eine breit angelegte Antigen-Vorauswahl treffen, die später mit dAKs genauer untersucht werden kann, wurde entschieden, dass mit AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK weitergearbeitet wird. Sollte der Unterschied auf eine geringere Avidität von AK237744 gegenüber *E. coli*-Antigenen zurück-

zuführen sein, ist die Entscheidung richtig. Liegt der Unterschied im Bereich von Schwankungen und hat nichts mit geringerer Avidität zu tun, dann ist die Entscheidung auch nicht falsch.

#### **5.1.2.4 Experimente mit Leg1E6 als fAK und dAK für Leg1P-Zellen**

Die Ergebnisse, die in Kapitel 4.1.5.4.2 präsentiert worden sind, zeigen, dass auch der Antikörper Leg1E6 sowohl als fAK als auch als dAK einsetzbar ist. Am Ende der Dissoziationsphase wurde eine OSD von 1497 IU erzielt. Mit einer unspezifischen Bindung von 136 IU (s. Kapitel 4.1.1.3.3) kann man von 1361 IU ausgehen. Die OSD fällt hier deutlich kleiner aus als die OSD nach Immobilisierung von Leg1P auf Oberflächen, die mit AK237744 (spezifische Bindung von 2553 IU) bzw. Leg1G3 (3129 IU) ausgestattet worden sind. Der Immobilisierungs-Versuch von *E. coli* ergibt zwar auch ein Signal, ist aber zum Zeitpunkt der dAK-Injektion 3-fach kleiner als bei Leg1P. Leg1E6 als dAK führt im Experiment mit *E. coli* zu keinem Signalanstieg sondern zu einer Signalabnahme um fast 600 IU. Das heißt, dass die *E. coli*-Zellen nur schwach und vorübergehend an Leg1E6 als fAK gebunden haben. Aus diesem Grund mag Leg1E6 die kleinste unspezifische Bindung zumindest von *E. coli* verursachen. Andererseits führt Leg1E6 als fAK zum kleinsten gemessenen Leg1P-Nettosignal unter den drei getesteten AKs. Leg1E6 sollte daher als dAK angewendet werden (s. Kapitel 4.1.5.7).

#### **5.1.2.5 Leg1P-Verdünnungsreihe auf OTS-OF mit AK237744 als fAK und Leg1G3 als dAK**

In Kapitel 4.1.5.5 sind Ergebnisse präsentiert worden, welche Aufschluss über die Möglichkeiten einer Quantifizierung von Legionellen-Zellen mittels RfS geben sollten. Der Antikörper AK237744 wurde unter den Bedingungen immobilisiert, die sich aus den vorhergehenden Experimenten ableiten ließen. Dasselbe gilt für die Blockierung unspezifischer Bindestellen mit BSA. Auf derartig präparierte Oberflächen wurden verschiedene Konzentrationen einer seriellen Verdünnungsreihe von Legionellen-Zellen (Leg1P) appliziert und gemessen. Die Leg1P-Bindungskurven wurden auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet: zum einen wurde die Netto-OSD am Ende der Dissoziationsphase und zum anderen die Steigung der einzelnen Kurven in der initialen linearen Assoziationsphase verwendet. Wie sich herausstellte, konnte die optische Schichtdicke der Leg1P-Zellen nach 600 s Dissoziation in keinen sigmoiden Zusammenhang gebracht werden (Kapitel 4.1.5.5, Abb. 4.41). Die Daten legen zwar eine Sättigung für Konzentrationen  $\geq 1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml nahe, jedoch ist kein linearer Bereich erkennbar. Auch eine untere Nachweisgrenze ist nicht bestimmbar. Offenbar bildet die Immobilisierung von ganzen Legionella-Zellen auf einer AK-ausgestatteten OTS-OF die verschiedenen Konzentrationen nicht in adäquater Weise ab. Möglicherweise hat dies mit der stark unterschiedlich ausfallenden Immobilisierung der Antikörper zu tun. Wie anhand der Kontaktwinkelanalyse und RfS-Experimente zur Immobilisierung von Protein A gezeigt wurde, darf davon ausgegangen werden, dass

die OTS-OF gut reproduzierbar ist. Ein Vergleich der Ergebnisse von Immobilisierungsexperimenten von Protein A und Antikörpern legt nahe, dass die Immobilisierung von Antikörpern auf ansonsten reproduzierbaren OTS-OF im Gegensatz zu Protein A nicht gut reproduzierbar ist. In den Experimenten dieses Kapitels wurde z.B. nach Injektion von AK237744 am Ende der Dissoziationsphase ein mittleres AK-Signal von 7603 IU bzw. eine mittlere Steigung von 139,13 IU/s ermittelt. Die Standardabweichungen fallen mit 1685 IU (22% der mittleren optischen Schichtdicke) bzw. 48,75 IU/s (35% der mittleren Steigung) sehr hoch aus. Dementsprechend fielen auch die Werte für die Blockierung mit BSA aus (Tab. 4.11; Kapitel 4.1.5.5). Für Protein A betrug die mittlere optische Schichtdicke 1788,5 IU und die Standardabweichung 69,25 IU (3,87% der mittleren optischen Schichtdicke). Woran das liegt ist unklar. Möglicherweise ist dem aber geschuldet, dass die Sensorsignale bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen so unterschiedlich ausfallen, dass sie in keinen sinnvollen sigmoiden Zusammenhang gebracht werden können. Die Immobilisierung von Zellen unterschiedlicher Art auf OF, die mit dem fAK AK237744 ausgestattet waren, lieferte andere Ergebnisse bezüglich der Netto-OSD am Ende der Dissoziationsphase als es bei den Experimenten in Kapitel 4.1.5 der Fall war. Dort ließ sich, nach Immobilisierung der Zellen auf der freien OTS-OF aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, mittels eines Fitting-Modells ein sigmoider Zusammenhang zwischen der logarithmierten Konzentration und der Netto-OSD herstellen.

Außerdem wurde getestet, ob sich die Steigung besser eignet, um eine Quantifizierung vorzunehmen. In den ersten Sekunden der Assoziation entwickelt sich das Signal aufgrund von exzessiv vorliegenden Bindestellen für die Zellen auf der OF linear. Erst wenn viele Bindungsstellen besetzt sind und dadurch die Häufigkeit von Bindungsereignissen abnimmt, verlässt der Kurvenverlauf die lineare Phase und strebt einem asymptotischen Verlauf entgegen. Je höher die Konzentration der Zellen ist, desto steiler sollte der lineare Anfangsverlauf der Kurve ausfallen, da Bindungsereignisse desto häufiger sind. In dem Fall kann man die Steigung als quantitatives Maß verwenden. Die berechneten Steigungen wurden gegen den Logarithmus der entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und ebenfalls mit einem sigmoiden Fitting-Modell bearbeitet. Im Fall der Auswertung mittels der Steigungen der Leg1P-Bindungskurven ließ sich auf die Daten zwar ein sigmoides Fitting-Modell anwenden, es konnte aber keine obere Nachweisgrenze ermittelt werden, da über die Steigung bei den verwendeten Konzentrationen keine Sättigung angezeigt wird. Offenbar ist durch diese Methode die Verwendung höherer Konzentrationen möglich als es für die Quantifizierung mittels der Signale am Ende der Dissoziationsphase der Fall ist. Das lässt sich so erklären, dass die OF bei der Steigungsmethode in den ersten Sekunden der Assoziation noch leer bzw. fast leer ist. Eine Erhöhung der Konzentration schlägt sich in den „Bindungsereignissen pro Sekunde“ nieder, die durch das „gemessene Sensorsignal pro Sekunde“ angegeben werden. Die Steigung kann in diesem Fall theoretisch noch höhere Konzentrationen abbilden. Die Methode der Quantifizierung mittels Sensorsignal am Ende der Dissoziati-

onsphase dagegen ist durch die absolute Zahl der Zellen beschränkt, die auf der OF immobilisierbar sind. Offenbar ist in diesem Fall die Grenze für die Quantifizierung hoher Konzentrationen schneller erreicht. Höhere Konzentrationen konnten jedoch nicht vermessen werden, da zu wenig Material für eine weitere Ankonzentrierung der Zellen zur Verfügung stand. Daher konnte auch kein dynamischer Bereich bzw. untere Bestimmungsgrenze angegeben werden, da dafür die Kenntnis des weiteren Verlaufs der Signalentwicklung bis zur Sättigung nötig gewesen wäre. Mit dieser Methode ließ sich jedoch eine untere Nachweisgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml angeben. Bei den niedrigen Konzentrationen ist es jedoch sehr schwierig zu entscheiden, wo ein linearer Assoziationsbereich beginnt und wo er endet. Das Anlegen von Tangenten ist enorm schwierig. Bei Konzentrationen größer als  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml fielen die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  für die angelegten Tangenten noch mit  $R^2 > 0,9$  recht gut aus. Sie sind ein Maß für die Variabilität bzw. Varianz der abhängigen Variablen (Sensorsignal), die durch das verwendete lineare Fitting-Model erklärbar sind. Bei Konzentration kleiner als  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml fiel  $R^2$  mit  $< 0,6$  sehr gering aus. Die Steigungen im Bereich unterhalb von  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml sind also mit einer enormen Unsicherheit belastet. In einem weiteren Schritt ist der Antikörper Leg1G3 als dAK dazu gegeben worden. Prinzipiell besteht die Möglichkeit auch über diesen Antikörper eine Absenkung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu erreichen. Leider spiegelten die Ergebnisse mit dem dAK die Ergebnisse des Legionellen-„Capturings“ mit dem fAK wieder. Weder die Auswertung der optischen Schichtdicken noch die Auswertung der Steigungen lieferten Werte, welche in einen sigmoiden Zusammenhang gebracht werden konnten. Insgesamt ist auch diese Strategie weit davon entfernt, die Legionellen im Bereich der geforderten 100 KBE/100 ml Wasser detektieren zu können. Auch hohe Belastungen von 10000 KBE/100 ml Wasser, die eine sofortige Sanierung des infrage stehenden Wassersystems notwendig machen würden, sind auf diese Weise nicht zu detektieren. Auch hier könnte das Problem durch eine Filtration höherer Volumina zur Anreicherung von Zellen das Problem lösen. Eine Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit der Zellen auf der OF könnte eventuell auch erreicht werden, indem man die Zellen z.B. mit biotinylierten Antikörpern vorinkubiert und sie anschließend auf eine OF appliziert, die zuvor mit ConA-SAv ausgestattet worden ist.

#### **5.1.2.6 Experimente mit Leg1P-Zellen der 4. Charge**

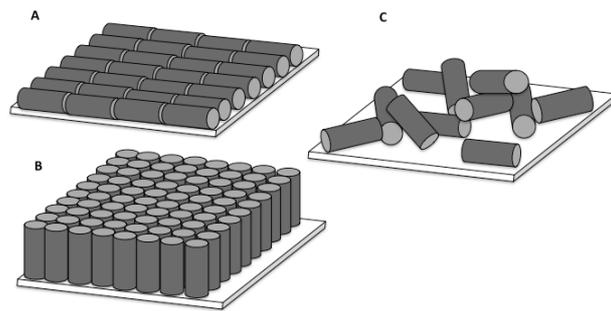
Für weitere Experimente mit den Leg1P-Zellen vom FzmB musste eine neue Charge der Zellen angefordert werden. Allerdings wurden die Zellen der 2. Charge und auch die einer 3. Charge nicht vom AK237744 erkannt. Es erfolgte ein Austausch der Zellen beim FzmB (mündliche Mitteilung von Frau Andrea Helming) und die Lieferung einer 4. Charge. Auch mit dieser Charge konnte nicht an die Arbeiten mit der 1. Charge angeknüpft werden. Die Ergebnisse, welche in Kapitel 4.1.5.6 vorgestellt wurden, zeigen dies deutlich: Leg1P-Zellen der 1. Charge (Leg1P(1)) banden mit einem Signal von 5590 IU an die mit AK237744 ausgestattete OF, während zwei Experimente mit AK237744 und Zellen

der 4. Charge (Leg1P(4)) lediglich Signale von weniger als 200 IU lieferten. Daher wurde statt mit dem polyklonalen fAK AK237744 nun mit dem monoklonalen fAK Leg1G3 (FzmB) weitergearbeitet und statt Leg1G3 wurde Leg1E6 als dAK verwendet. Das behob das Problem nur teilweise. Die optische Schichtdicke, die bei Immobilisierung von Leg1P(4) auf einer Leg1G3-ausgestatteten OTS-OF erzielt worden ist, lag mit 1570 IU weit unter den Ergebnissen, die mittels AK237744 und Leg1P(1)-Zellen erzielt werden konnten. Leg1E6 war als dAK einsetzbar.

Da sich mit den Leg1P(4)-Zellen und AK237744 als fAK deutlich andere Resultate ergaben als in Experimenten mit den Leg1P(1)-Zellen, wurden weitere Experimente mit Leg1P(4)-Zellen unter Verwendung von Leg1G3 als fAK durchgeführt. Die Leg1G3-Immobilisierung liefert auch im Fall des Leg1G3-Antikörpers Ergebnisse mit einer hohen Standardabweichung von 1019,44 IU und einer Spannweite der Signale von 3746 IU (mittleren OSD: 4290,83 IU). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Immobilisierung von AK237744 zeigt zunächst, dass die mittleren optischen Schichtdicken infolge der fAK-Immobilisierung stark unterschiedlich ausfallen. Da die Kontaktwinkelanalyse und die Protein A-Experimente zur Reproduzierbarkeit für eine hohe Reproduzierbarkeit sprechen, kann dies nicht an den verwendeten OTS-OF liegen. Die weit höheren optischen Schichtdicken werden mit dem AK237744 gemessen. Der Grund könnte sein, dass die Experimente mit AK237744 mit einem BIAffinity der neusten Generation (3) durchgeführt worden waren, während die Experimente mit Leg1G3 und den Leg1P(4)-Zellen auf einem Ersatzgerät stattfanden, welches einer früheren Generation angehörte. Es sollte ausgeschlossen sein, dass zwei verschiedene Geräte unterschiedliche Resultate liefern. Andererseits kann ein Gerätefehler nicht ausgeschlossen werden, weil bei dem Gerät der früheren Generation der Messspot 1 trotz wiederholter Kalibrierung des Gerätes ungewöhnlich kleine Signale hervorbrachte, während Messspot 2 Signale lieferte, die auch mit den anderen Generationen gemessen werden konnten. Da auch im Austausch mit dem Ansprechpartner bei Analytik Jena, wo das Gerät zuvor gewartet wurde, kein Grund für dieses Verhalten gefunden werden konnte, sind sicherheitshalber nur Messungen auf Messspot 2 berücksichtigt worden. Ein Vergleich der Ergebnisse von Leg1G3-Immobilisierung im Rahmen der Vorversuche, welche noch unter Verwendung des BIAffinity der neuesten Generation gesammelt worden sind, zeigt, dass die optischen Schichtdicken in drei Experimenten zwischen 4000 IU und 5000 IU liegen. Das entspricht den Ergebnissen, welche mit diesem Antikörper unter Verwendung des BIAffinity der älteren Generation erzielt worden sind. Daher wird davon ausgegangen, dass die Geräte-Generation nicht der Grund für die Abweichungen ist und sich hier Unterschiede in den Affinitäten der Antikörper gegenüber der OTS-OF niederschlagen. Die beiden fAK Leg1G3 und AK237744 zeigen hohe Standardabweichungen und Spannweiten. Im Fall der mittleren optischen Schichtdicken am Ende der Dissoziationsphase betragen die Standardabweichungen 22% (AK237744) bzw. 23,76% (Leg1G3) von diesem Mittelwert, im Fall der Steigungen aber nur 35,02% (AK237744) bzw. 35,22%. Offenbar sind die großen Standardabweichungen typisch für

die Immobilisierung von Antikörpern auf OTS-OF. Im Vergleich fallen die entsprechenden Werte für Protein A-Immobilisierung viel kleiner aus. Für die Immobilisierung von Protein A auf OTS-OF beträgt die Abweichung nur 3,87% von der mittleren optischen Schichtdicke am Ende der Dissoziationsphase (Kapitel 4.1.2; Zusatz).

Jede der auf die fAK-Immobilisierung folgenden Leg1P(4)-Konzentration wurde zweimal gemessen, wodurch zwei vollständige Sets an Experimenten für die Verdünnungsreihe vorliegen. Die beiden Sätze der Verdünnungsreihe lieferten sehr unterschiedliche Kurvenprofile (s. Kapitel 4.1.5.7, Abb. 4.45 A und B). Für die mittleren Signale wurde die Standardabweichung berechnet. Normalerweise ist eine Standardabweichung bei nur zwei Messwerten statistisch nicht sinnvoll. Es ist mathematisch aber nicht falsch. Die Standardabweichung dient hier auch nur der Verdeutlichung, wie stark die Messwerte differieren können. Deshalb sollte der Begriff Standardabweichung in Parenthesen stehen. Gemäß den sehr unterschiedlichen Kurvenprofilen fallen die „Standardabweichungen“ der mittleren Sensorsignale für höhere Leg1P(4)-Zellenkonzentrationen mit Ausnahme der Konzentration von  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml sehr groß aus (s. Kapitel 4.1.5.7, Abb. 4.47). Da die Experimente im Sandwich-Assay-Format mit anderen Settings nur jeweils einmal durchgeführt worden sind, lässt sich nicht sagen, ob sich die großen Standardabweichungen für höhere Leg1P(4)-Zellenkonzentrationen verallgemeinern lassen. Andererseits ist dies zumindest dann zu erwarten, wenn die Konzentrationen der Zellen in einem Bereich liegen, bei dem sich die Sättigung der OF einzustellen beginnt. Aufgrund der Tatsache, dass die Zellen keine globuläre sondern eine zylindrische Geometrie aufweisen, kann man sich unterschiedliche Szenarien vorstellen, wie die Zellen auf der OF angeordnet werden könnten. Abbildung 5.3 zeigt solche Szenarien. Auf jeweils einer OF von gleicher Größe sind in A 28 Zellen, in B 80 Zellen dargestellt. Ob die Signale unter diesen theoretischen Anordnungen verschieden ausfallen, ist nicht klar. Einerseits ist die Schichtdicke in B viel größer als in A. Andererseits ergeben Zellapplikationen, wie die Ergebnisse zeigen, nicht die erwarteten sehr hohen Signale sondern bleiben in der Größenordnung der Signale, die sich bei Protein-Applikationen ergeben. Es ist also jedenfalls nicht der Fall, dass die absolute Schichtdicke der Zell-Schicht sich auch im Signal widerspiegelt. Ob aber nur eine Veränderung des Brechungsindex zu einer so starken Verzerrung der Größenverhältnisse führt scheint zweifelhaft. Wahrscheinlicher erscheint es erstens, dass im Fall von Zellen andere optische Effekte zum Tragen kommen als im Fall von Proteinen. An Letzteren kommt es zur Rayleigh-Streuung, da die Partikelgröße  $d$  kleiner als die Wellenlänge des Lichts ist. Zellen liegen in einer Grö-



**Abb. 5.3: Verschiedene theoretische Anordnungen von Legionellen auf einer OF.**

ßenordnung der Signale, die sich bei Protein-Applikationen ergeben. Es ist also jedenfalls nicht der Fall, dass die absolute Schichtdicke der Zell-Schicht sich auch im Signal widerspiegelt. Ob aber nur eine Veränderung des Brechungsindex zu einer so starken Verzerrung der Größenverhältnisse führt scheint zweifelhaft. Wahrscheinlicher erscheint es erstens, dass im Fall von Zellen andere optische Effekte zum Tragen kommen als im Fall von Proteinen. An Letzteren kommt es zur Rayleigh-Streuung, da die Partikelgröße  $d$  kleiner als die Wellenlänge des Lichts ist. Zellen liegen in einer Grö-

Benordnung, bei welcher die Mie-Streuung bedeutsam wird. Welchen Effekt dies auf die Signalentstehung und Signalverarbeitung hat, ist nicht bekannt und auch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Zweitens ist eine Zelle selbst aus verschiedenen Schichten aufgebaut, so dass bei der Immobilisierung auf einem kleinen Bereich der OF gleich mehrere Schichten addiert werden. Aber wie viele Schichten in die Signalentstehung eingehen und wie sich die absoluten Weglängen und die Brechungsindizes dabei genau verrechnen, ist unbekannt. Außerdem muss beachtet werden, dass die einzelnen Schichten sehr heterogen sind. In den Zellmembranen kommen z.B. viele Proteine vor, die wiederum Brechungsindex-Inhomogenitäten darstellen, an denen es zu weiteren Streuvorgängen kommt, deren Beitrag zum Gesamtsignal unabsehbar ist. Davon auszugehen, dass sich diese Inhomogenitäten im Mittel eliminieren lassen, ist hoch spekulativ. Die beiden Fälle A und B in Abb. 5.3 beziehen sich aber auf theoretische Fälle, welche ausgeschlossen sein dürften. Viel realistischer erscheint der Fall C in Abb. 5.3. Man darf also erstens erwarten, dass es auf der OF zu vielen freien Stellen kommt, deren Fläche addiert in verschiedenen Experimenten „mehr oder weniger“ große sein wird. Dieses „Mehr oder Weniger“ könnte für die hohen Standardabweichungen in den Signalen nach Zellen-Applikation verantwortlich sein. Das bedeutet aber auch zweitens, dass es keine „echte“ Schicht gibt. Wenn man von Schicht spricht, wird eine lückenlose und bezüglich des Brechungsindex homogene Verteilung der Komponenten impliziert. Nur auf solche Schichten ist die physikalische Beschreibung der Grenzflächeneffekte anwendbar. Drittens ist auch nicht klar, was es für das Signal bedeutet, wenn auf einem OF-Segment eine Zelle von einer zweiten überlappt wird.

Anders als im Fall der Experimente mit AK237744 als fAK (Kapitel 4.1.5.5), bei denen die optischen Schichtdicken am Ende der Dissoziationsphase sich nicht mit einem sigmoiden Fitting-Modell haben fitten lassen, ist dies für die Experimente mit Leg1G3-Antikörper möglich gewesen. Dass der Grund für das unterschiedliche Verhalten der Zellen in Verbindung mit den beiden Antikörpern darauf zurückgeführt werden könnte, dass AK237744 ein polyklonaler Antikörper ist und Leg1G3 ein monoklonaler, erscheint ausgeschlossen. Warum die optischen Schichtdicken im Fall von AK237744 und Leg1P(1)-Zellen einerseits und Leg1G3 und Leg1P(4) andererseits in Bezug auf das sigmoide Fitting so unterschiedlich ausfallen, kann folgendermaßen erklärt werden: Wie schon diskutiert, scheint die Affinität der verwendeten AK zu den Leg1P-Zellen der 4. Charge drastisch reduziert. Das hat zur Folge, dass es zu weniger Bindungsereignissen in der gleichen Zeit kommt. Vermutlich wird ein oder werden mehrere Antigen/e von Legionellen der 4. Charge nicht synthetisiert, welche/s in der 1. Charge jedoch existierte/n und zu den entsprechend hohen Bindungssignalen bzw. hohen Steigungen führte. Wenn die Bindungsereignisse weniger häufig sind, heißt das aber nicht notwendigerweise, dass die gemessenen Signale kleiner ausfallen. Denn wenn erst mal Legionellen binden, dann liegen sie unabhängig davon wie viele Antikörper das Bakterium tatsächlich bindet auf der OF vor. Es dürfte für das Signal egal sein, wie viele AK tatsächlich an Antigene auf der OF der Zelle binden. So-

lange die Zelle auf der OF liegt, wie auch immer dort hingekommen, entsteht das gleiche Signal. Der Vergleich von den maximalen  $OSD_{600s}$ , die bei Leg1P(1)-Immobilisierung auf AK237744 gemessen worden sind, mit den entsprechenden maximalen  $OSD_{600s}$  bestätigt das, weil in beiden Fällen tatsächlich ein maximales Signal von etwa 6000 IU gemessen worden ist. Gleichzeitig unterscheiden sich die Steigungen: die größte Steigung in den Experimenten mit AK237744 als fAK und Leg1P(1) betrug etwa 130 IU/s, während sie in den Experimenten mit Leg1G3 als fAK und Leg1P(4) nur etwa 30 IU/s betrug. Außerdem ist die maximale Rate der Anbindung im letzteren Fall schon bei Leg1P(4)-Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml erreicht. Wenn diese Argumentation stimmt, dann lässt sich etwas über die Anwendung der RfS-Methode auf Ganzzell-Applikationen sagen: Offenbar zeigen die vorgelegten Experimente, dass die Messungen besser über die Steigungen der Zellen-Bindungskurven ausgewertet werden. Legt man Wert auf eine obere Bestimmungsgrenze, ist dies durch weniger affine Antikörper erreichbar. An der unteren Nachweisgrenze ändert sich dadurch nichts. Sowohl in den Experimenten mit dem Paar AK237744–Leg1P(1) als auch bei dem Paar Leg1G3–Leg1P(4) liegt sie in einem Signalbereich von  $>1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Die Frage ist, ob sich daran etwas ändern lässt, indem man einen Antikörper verwendet (und findet) der die Affinität von AK237744 und Leg1G3 zu Leg1P(1)-Zellen übersteigt. Vermutlich läuft aber auch unter diesen Bedingungen die OSD auf den gleichen Wert von etwa 6000 IU hinaus wie es bei den hier getesteten Paaren der Fall war. Die Steigungen allerdings könnten dann anders ausfallen. Ist die Affinität des hypothetischen Antikörpers gegenüber einem bestimmten hypothetischen Antigen größer ist die Bindungshäufigkeit bzw. die Bindungsrate größer (sofern die Antigen- und Antikörper-Konzentration konstant ist). Es sollten sich dann auch bei kleineren Konzentrationen steilere Bindungskurven ergeben, wodurch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze vermutlich gesenkt werden kann. Wie groß der Gewinn sein wird, ist schwer abzuschätzen, da bei geringeren Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle in die Nähe der Oberfläche gerät, wo sie binden könnte, auch abhängig von den Dimensionen des Flusskanals ist. Je stärker der Fluss auf einen engen Bereich über der Oberfläche eingeschränkt ist, desto häufiger werden Bindungsereignisse sein. Die hier ermittelte untere Nachweisgrenze von bestenfalls  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml im Fall der optischen Schichtdicke und von etwa  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml im Fall der Steigungen ist angesichts der Legionellen-Grenzwerte in Wasser von 100 KBE/100 ml nicht praktikabel. Selbst hohe Konzentrationen von 10000 KBE/100 ml Wasser sind nicht so nicht detektierbar.

Auch die Kurvenprofile nach Leg1E6-Applikation in den beiden Durchgängen der Verdünnungsreihe zeigen unterschiedliche Kurvenprofile (Kapitel 4.1.5.7, Abb. 4.48). Diese Unterschiede schlagen sich wiederum in den „Standardabweichungen“ der Mittelwerte von je zwei Messungen bei gleicher Konzentration nieder (Abb. 4.49; Kapitel 4.1.5.7). In diesem Fall lässt sich auf die Daten der Steigungen der Bindungskurven nach Leg1E6-Applikation kein sigmoides Fitting-Model anwenden. Die OSDs am

Ende der Dissoziationsphase lassen sich sigmoid fitten. Aufgrund dieser Daten wird nur die untere Nachweisgrenze zwischen  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml bestätigt. Offenbar ermöglicht die Anwendung des dAK keine Verschiebung der Nachweisgrenze in Richtung niedrigerer Konzentrationen.

### 5.2 Experimente zur Detektion von *L. pneumophila*-Zellen im Direct-Assay-Format

In Kapitel 4.1.4 wurden Ergebnisse präsentiert, welche die Möglichkeit eines Legionellen-Assays in Direct-Assay-Format eruieren sollten. Wie sich zeigte, ließen sich die Zellen aufgrund von hydrophober Interaktion immobilisieren. Die hydrophobe Immobilisierung wird durch den Besitz des LPS „Legionaminischen Säure“ („legion aminic acid“) besonders forciert (Neumeister et al., 1998). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Signale im Zuge der Immobilisierung konzentrationsabhängig waren. Leider lag die untere Nachweisgrenze im Fall der Korrelation der Zell-Konzentrationen und der Signale am Ende der Dissoziationsphase im Bereich zwischen  $10^6$  Zellen/ml und  $10^7$  Zellen/ml und im Fall der Korrelation der Konzentration und der Steigungen in den ersten 20 s der Assoziationsphase zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Zellen/ml. Mittels der Nettosignale am Ende der Dissoziationsphase lässt sich die Nachweisgrenze also um eine Größenordnung kleiner als in den Experimenten im Sandwich-Assay-Format (Kapitel 4.1.5.5 und 4.1.5.7) angeben. Von einem dynamischen Bereich kann man kaum reden, da er so eng ausfällt, dass ein sinnvolles Quantifizieren nicht möglich ist. In beiden Fällen kann auf diese Weise das angestrebte Ziel, nicht erreicht werden (s. Technischer Maßnahmewert in Kapitel 5.1.1.7, Zwischenfazit). Da zu diesem Zeitpunkt kein funktionierendes Antigen-Antikörper-System vorlag, konnte keine Detektion durchgeführt werden. Außerdem stand die Frage im Raum, ob mit einem funktionierendem Antikörper-Antigen-System auch die Nachweisgrenze in einen brauchbaren Bereich gesenkt werden könne. Um diese Frage zu klären, wurden die Experimente, welche in Kapitel 4.1.4 präsentiert worden sind mit Leg1P, wiederholt. Zunächst wurde im Rahmen der Vorversuche mit Leg1P-Zellen und FzmB-AKs ein „Proof of Principle“ im Direct-Assay-Format durchgeführt (Kapitel 4.1.5.3). Leg1P und *E. coli* lieferten bei der Immobilisierung sehr ähnliche Nettosignale von 2554 IU und 2611 IU. Das Sensorsignal fällt bei der direkten Leg1P-Applikation kleiner aus als die entsprechenden Signale im Sandwich-Assay-Format (Kapitel 4.1.5.2), bei denen ein Signal von ca. 3100 IU gemessen worden ist. Die Ausstattung der OF mit Antikörpern scheint die Bindungswahrscheinlichkeit von Legionellen-Antigenen zu erhöhen. Dagegen minimiert die fAK-Ausstattung der OF die Bindung von *E. coli*: im SAF wurden 1155 IU gemessen, im DAF dagegen 2611 IU. Die Injektion des Antikörpers Leg1G3 als dAK im Fall von Legionellen führt zu einem Signalanstieg von 2223 IU. Auch dieses Sensorsignal fällt wesentlich kleiner aus als das Sensorsignal nach Applikation von Leg1G3 als dAK im SAF (Kapitel 4.1.5.2) mit 6976 IU. Das bestätigt die Vermutung, dass die Ausstattung der OF mit fAK zu einer höheren Dichte von Legionellen-Antigenen auf der OF führt als dies bei der DAF-

Strategie der Fall ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiterer Satz von Experimenten mit einer Leg1P-Verdünnungsreihe durchgeführt. Allerdings standen zu diesem Zeitpunkt keine Leg1P-Zellen der ersten Charge mehr zur Verfügung, weshalb Leg1P(4)-Zellen verwendet werden mussten. Die Immobilisierung von Leg1P(4)-Zellen führte zu Signalen am Ende der Dissoziationsphase, die im Gegensatz zu den in Kapitel 4.1.4 mit Leg1G-Zellen gemessenen Signalen nicht mit der Zell-Konzentration korrelierten (Kapitel 4.1.5.8). Im Fall der Steigungen dagegen konnte in beiden Fällen ein sigmoides Fitting-Model angewendet werden, welches in beiden Fällen eine untere Nachweisgrenze zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Zellen/ml lieferte. Die Ergebnisse von Kapitel 4.1.4 legen jedoch nahe, dass die Verwendung der Signale am Ende der Dissoziationsphase zum Festlegen der unteren Nachweisgrenze im DAF besser geeignet sind, da sich dadurch die untere Nachweisgrenze gegenüber der Verwendung der Steigungen um eine Größenordnung auf einen Bereich zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Zellen/ml verringern lässt. Die Ergebnisse in Kapitel 4.1.5.8 stellen jedoch den Befund, dass sich die Signale am Ende der Dissoziationsphase zuverlässig mit der Konzentration korrelieren lassen stark in Frage. Die Daten weisen also die Methode der Steigungen als zuverlässiger aus. Im Gegensatz zu den Experimenten in Kapitel 4.1.4 wurde in denen des Kapitels 4.1.5.8 ein dAK eingesetzt. Die Verwendung von Leg1E6 führt leider nicht zu einer Senkung der unteren Nachweisgrenze. Auch hier scheint sowohl im Fall der Steigungen als auch der Signale am Ende der Dissoziationsphase die untere Nachweisgrenze auf den schon bei der Immobilisierung der Zellen festgestellten Bereich von  $10^7$  bis  $10^8$  Zellen/ml hinauszulaufen. Eine Korrelation der Steigungen und der Signale am Ende der Dissoziationsphase mit der Zell-Konzentration war wegen des Ergebnisses bezüglich der Zell-Konzentration von  $8,25 \cdot 10^8$  Zellen/ml nicht möglich. Das Ergebnis ließ sich in einem zweiten Experiment reproduzieren. Ein Grund für dieses Verhalten kann nicht angegeben werden. Auch in diesem Fall ließen sich demnach keine Ergebnisse erzielen, die für die Trinkwasserkontrolle in einem brauchbaren Bereich liegen.

### 5.3 Experimente mit Lektinen als Fänger oder Detektor für Legionellen-Zellen (Leg1P(1))

Eine andere Methode bestimmte Analyten nachzuweisen, bedient sich der Lektine. Bakterien tragen viele Oberflächenmerkmale, an denen Lektine binden können: Peptidoglykane, Teichonsäuren, Lipopolysaccharide etc. Aufgrund dieser Vielfalt sind Lektine ein oft eingesetztes Mittel z.B. bei der Identifikation und Taxonomie von Bakterien (Slifkin & Doyle, 1990). In der Biosensorik verwendeten beispielsweise Serra et al. ConA, um *E. coli*-Zellen mittels elektrochemischer Quarz Crystal Microbalance (EQCM) nachzuweisen (Serra et al., 2008). An Legionellen können nur sehr wenige Lektine binden. Positive Ergebnisse wurden mit *Aloe arborescens*-, *Mangifera indica*- und *Persea americana*-Lektinen erzielt (Doyle et al., 1982). Das nächste Experiment wurde daher mit dem *Persea americana*-Lektin als Fängerlektin durchgeführt. Außerdem ist bekannt, dass im Core-Polysaccharid der Legionellen-LPS Mannose vorkommt (Moll et al., 1997). Deshalb wurde zunächst getestet, ob sich die Zellen mit-

tels hydrophob immobilisierten ConA auf einer OF binden ließen. In einem ersten Experiment mit Leg1P(1)-Applikation nach hydrophober ConA-Immobilisierung wurden nur Bindungssignale von etwa 50 IU erzielt. Die Zellen binden also nicht an eine OF, die mit ConA als Fängerlektin ausgestattet ist. Vermutlich ist der Grund, dass die Mannose im Core-Polysaccharid der LPS für (immobilisiertes) ConA nicht zugänglich ist. Alternativ wurde das *Persea*-Lektin mittels hydrophober Wechselwirkungen auf einer OTS-OF immobilisiert. Das Sensorsignal viel allerdings mit nur 320 IU sehr klein aus. Die Zugabe von BSA zur Blockierung unspezifischer Bindestellen führte zu einem entsprechend hohen Sensorsignal. Eine Leg1P(1)-Injektion führte zu einem Signal von nur 75 IU. Das schlechte Ergebnis nach Leg1P(1)-Applikation wurde zunächst darauf zurückgeführt, dass offenbar nur sehr wenig *Persea*-Lektin auf der Oberfläche gebunden worden ist. Offensichtlich ist das Lektin nicht gut durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der OF immobilisierbar. Daher wurde geprüft, ob das *Persea*-Lektin geeignet ist, an Leg1P(1)-Zellen zu binden, welche zuvor mit Hilfe von Leg1G3 als fAK auf der Oberfläche immobilisiert worden waren. Wie erwartet ergab die Leg1P(1)-Zellen-Applikation auf einer mit Leg1G3 ausgestatteten OF ein gutes Bindungssignal (4107 IU). Die Injektion der *Persea*-Lektin-Probe führte auch nur zu einem sehr geringen Nettosignalzuwachs. Daher musste davon ausgegangen werden, dass die *Persea*-Strategie im Falle der Leg1P(1)-Zellen nicht funktioniert. Der Grund könnte sein, dass die Bedingungen, unter denen die Leg1P(1)-Zellen kultiviert worden waren, nicht zu der Ausbildung von Strukturen führten, an die das *Persea*-Lektin binden konnte. Slifkin und Doyle zeigten, dass auch die Bindung von Lektinen an Legionellen-Zellen stark von den Kulturbedingungen abhängt (Slifkin & Doyle, 1990). Der besseren Übersicht wegen, muss man den Gesamtzusammenhang Revue passieren lassen: Mit den Leg1-Zellen aus Gießen und AK237744 konnten keine adäquaten Bindungsereignisse erzielt werden. Mit den Zellen Leg1P der 1. Charge vom FzMB und AK237744 dagegen schon. Allerdings scheiterten Versuche mit Leg1P-Zellen vom FzMB aus den Chargen 2, 3 und 4 und AK237744. Dafür konnte der Antikörper Leg1G3 die Leg1P(4)-Zellen binden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei den Leg1-Zellen aus Gießen (*L. pneumophila*, Stamm unbekannt) entweder um einen speziellen Gießener Wildtyp-Stamm handelt, der zum Stamm Philadelphia hinreichend unähnlich ist oder dass sich seine OF-Strukturen unter den Kulturbedingungen am Institut für Umweltmedizin und Hygiene des UKGM verändert haben. Bei den Leg1P-Zellen *L. pneumophila*, Stamm Philadelphia) vom FzMB der 1. Charge und den späteren Chargen scheint es aber an den Kulturbedingungen zu liegen, dass die Zellen im zweiten Fall nicht binden. Die Kulturbedingungen müssen in subtiler Weise unterschiedlich gewesen sein, da keine absichtlichen Änderungen der Bedingungen vorgenommen worden sind. So ist anzunehmen, dass solche Veränderungen auch die Bindungsfähigkeit von *Persea*-Lektinen verhindert haben. Die Arbeiten mit Lektinen wurden eingestellt, da es nicht zielführend erschien Lektine kovalent an die Chip-OF zu binden, um dann mit Zellen zu arbeiten, die offensichtlich nicht von *Persea*-Lektin gebunden werden konnten. Auch wurden keine

anderen Lektine verwendet, da sie zu dem Zeitpunkt nicht erhältlich waren. Die Strategie mit Lektinen ist grundsätzlich jedoch sehr vielversprechend. Erfolgreiche Anwendungen im Rahmen von QCM-Methodik finden sich bei Safina et al. für pathogene Enterobakterien mit einer Nachweisgrenze von  $10^3$  Zellen/ml (Safina et al., 2008) und bei Shen et al. für *E. coli*-Bakterien mit einem dynamischen Bereich von  $7.5 \times 10^2$  Zellen/ml bis  $7.5 \times 10^7$  Zellen/ml (Shen et al., 2007). Vielversprechend wäre auch der Ansatz, ein 1997 von Venkataraman et al. identifiziertes Gal/GalNAc-Lektin aus *Hartmannella vermiformis* als Fänger- oder Detektor-Molekül zu verwenden. Das 170 kDa-Protein leistet offenbar einen entscheidenden Beitrag bei der Anheftung von *L. pneumophila* an *H. vermiformis* (Venkataraman et al.; 1997).

### Zwischenfazit

Die Grundfrage war, ob sich die RfS-Methode für Ganzzellbiosensorik besser eignete als SPR. Durch die Dimensionen des Evaneszenten Feldes von einigen 100 nm ist der Raum über der OF, in dem gemessen werden kann, für Analyten in der Größe von Bakterien sehr eingeschränkt. Möglicherweise ist das der Grund dafür, dass laut einem Review von Ivnitzky et al. SPR-basierte Ganzzell-Bioassays lediglich untere Nachweisgrenzen im Bereich von  $10^5$ - $10^7$  Zellen/ml erreichen. Die RfS-Methode beruht nicht auf Evaneszenten Feldern, so dass der Messbereich nur durch die halbe Kohärenzlänge des eingesetzten Lichts definiert (s. Kapitel 1.1.3.1.3) ist. Durch die Höhe der Flusszelle wird dem Messbereich aber eine praktische Grenze von 125  $\mu\text{m}$  gesetzt. Die in dieser Arbeit in verschiedenen Ansätzen eruierten unteren Nachweisgrenzen bei der Detektion von *L. pneumophila*-Zellen mittels RfS, stimmen mit den von Ivnitzky et al. für SPR angegebenen unteren Nachweisgrenzen überein. Demnach ist die RfS-Methode für Ganzzell-Bioassays jedenfalls für Legionellen der SPR-Methode nicht überlegen. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Kulturmethode nach wie vor als Goldstandard unter den Legionellen-Detektionsmethoden betrachtet werden müssen.

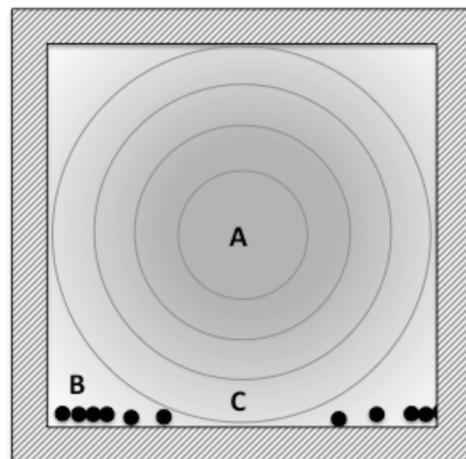
## 5.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Chips mit immobilisierten Legionellen

### 5.4.1. Sandwich-Assay-Format mit *Leg1P(4)* Zellen und *Leg1G3* als fAK

Die REM-Bilder einer OF, auf der zuvor *Leg1P(4)*-Zellen mittels immobilisiertem *Leg1G3* gebunden worden waren, zeigten fadenförmige Strukturen, deren Durchmesser von etwa 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  und deren Länge zwischen 2,2 und 7,2  $\mu\text{m}$  betrug, wobei nur Strukturen gemessen worden sind, die klar als abgeschlossene Körper erkennbar waren. Bei einigen Strukturen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sie bis zu 20  $\mu\text{m}$  lang sind. Der Durchmesser entspricht den Literaturwerten von 0,3-0,7  $\mu\text{m}$

(s. Kapitel 1.3), während nur 13,3 % der Strukturen den Literaturwerten einer Länge von 2-3  $\mu\text{m}$  entsprachen. Die meisten sind größer als 4  $\mu\text{m}$ . Allerdings ist bekannt, dass Legionellen besonders in Kultur auch fadenartige Strukturen aus mehreren Zellen bilden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass hier einige sogenannte „giant cells“ vorliegen: bis zu 20  $\mu\text{m}$  große Zellen, die unter Kulturbedingungen (im Gegensatz zu Naturbedingungen) entstehen können. In den Kontroll-Aufnahmen außerhalb des Flusskanals sind zwei Zellen zu sehen, welche aber auch nachträglich verursachte Kontaminationen darstellen könnten. Aufgrund der Kontroll-Aufnahme und den passenden Dimensionen kann man die Bilder der fädigen Strukturen als Beleg für ganze stäbchenförmige Zellen auf der Oberfläche akzeptieren. Vermutlich sind die Zellen etwas eingefallen, da die Chips nach dem Experiment getrocknet wurden. Es wurden keine besonderen Trocknungsprotokolle verwendet. Nach dem Experiment wurden die Chips lediglich in einem verschlossenen Plastikröhrchen, das zusätzlich mit Parafilm abgedichtet worden ist, unter einer „Lamina-Air-Flow“ gelagert. In der Zeit bis zum REM-Experiment konnten die Chips samt Zellen trocknen. Eventuell sind die abgebildeten Zellen gerade im Durchmesser sogar etwas größer gewesen.

An den Außenrändern des Flusskanals liegen sehr viele Zellen vor. Zwischen den Zellen ist sehr viel Platz, so dass keine einheitliche Schicht zu erkennen ist. Außerdem können Mehrfachschichten ausgeschlossen werden. Allerdings ist ebenfalls zu erkennen, dass die Zellen sich teilweise überkreuzen bzw. überlappen. Es ist nicht klar, was an Signal entsteht, wenn sich Bereiche überlappen. Der überlappende Zellbereich könnte eventuell die Ursache für einen Beitrag eines lokalen Signals zum Gesamtsignal sein, wobei nicht klar ist, wie dieses aussieht und wie es mit den anderen Signalen durch die Software prozessiert wird. Vielleicht kommt es aber durch die Überlappung zu keiner Änderung der Lichtverhältnisse. Dann wäre der Sensor für solche Überlappungen blind. In diesem Fall könnten die Signale von zwei Zellen, die sich teilweise überlappen anders ausfallen, als es der Fall wäre, wenn die Zellen nebeneinander lägen. Ist der Sensor für solche Stellen jedoch nicht blind, ist völlig unkalkulierbar, welchen Beitrag zum Signal solche Überlappungen liefern. Beide Fälle könnten ein Grund für große Standardabweichungen (z.B. Kapitel 4.1.5.7) und Signalentwicklungen sein, bei denen die Signale nicht mit den Zellkonzentrationen korrelieren (z.B. Kapitel 4.1.5.8). Außerdem ist zu



**Abb. 5.7: Querschnitt-Schema des Strömungsprofils in einem Flusskanal mit rechteckigem Querschnitt.** A – Mitte des Flusses; B – Fluss in der Nähe zweier Wände; C – Fluss in der Nähe einer Wand. Schwarze Kreise – auf der OF immobilisierte Zellen. Der Farbverlauf zeigt die unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten in der Flusszelle: dunkle Bereiche  $\rightarrow$  höhere Geschwindigkeit, helle Bereiche  $\rightarrow$  geringere Geschwindigkeit.

erwarten, dass sich bei höheren Zellkonzentration die Zellen eventuell stärker überlappen als bei niedrigeren Konzentrationen. Dann sind zwar mehr Zellen auf der OF aber viele Teile überlappen sich. Die Signalentwicklung würde anders verlaufen als in Fällen mit weniger Überlappung. Das ist wahrscheinlich der Grund, warum die Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphasen sich häufig nicht mit den Zellkonzentrationen korrelieren ließen. Damit ist indirekt auch bestätigt, dass sich im Fall von RIFs-Ganzzellenanwendungen die Steigungen in der Anfangsphase der Bindung besser zur Quantifizierung eignen als die Signale am Ende der Dissoziationsphasen. Einige weitere Interpretationen betreffen die Sigmoiden aus Kapitel 4.1.4 und 4.1.5.7 einerseits und die aus Kapitel 4.1.5.5 andererseits. Die Sigmoiden bezüglich der Signale am Ende der Dissoziationsphase in Kapitel 4.1.4 und 4.1.5.7 zeigen bei den hohen Legionellen-Konzentrationen eine Sättigung der Oberfläche an, da sie in ein Plateau übergehen. Das weist auf Sättigung der Oberfläche hin. Die REM-Bilder zeigen, dass die Sättigung nicht derart ist, dass die OF komplett bedeckt ist. Je nach dem, wie die Zellen auf der OF zu liegen kommen, ist mehr oder weniger viel der OF tatsächlich bedeckt. Aus geometrischen Gründen ist zu erwarten, dass je größer die Zellen sind, desto größer werden auch die zu erwartenden freien OF-Abschnitte sein. Kleinere Zellen würden sich wahrscheinlich dichter anordnen. Der Verlauf der Leg1P(1)-Signale am Ende der Dissoziationsphase in Kapitel 4.1.5.5 ließ sich zwar nicht sigmoid fitten, jedoch scheinen die Signale eine Sättigung der OF ab einer Zell-Konzentration von  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml nahe zu legen. Sie entsprechenden OSD beliefen sich auf Werte zwischen 5000 IU und 6000 IU.

Ein weiterer interessanter Punkt, der sich aus den REM-Bildern ergibt, ist der folgende: Die Zellen scheinen bevorzugt in den Randbereichen des Flusskanals zu liegen zu kommen. Sollten die REM-Bilder repräsentativ für die Situation an allen Stellen unter dem Flusskanal sein, dann gibt es auf der OF in der Mitte des Flusskanals einen Bereich, in dem keine Zellen gebunden werden. Zellen findet man erst weiter in Richtung Rand des Flusskanals. Mit Hilfe von einigen strömungsdynamischen Überlegungen lässt sich das wie folgt erklären. In Flusszellen der Art des BIAffinity<sup>®</sup> herrscht ein laminarer Strom. Der zugrundeliegenden Theorie zufolge zeigen Flüssigkeiten im Strom, z.B. durch ein Rohr, ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil (Durst, 2006, S. 409). Aufgrund der inneren Reibung, d.h., der Kraftwirkungen der Flüssigkeitsmoleküle untereinander und mit der OF des Rohres, kommt es zu einem Energieverlust, der an den Oberflächen des Rohres am größten ist. Hier ist die Geschwindigkeit am geringsten. Je weiter entfernt von den OF der Wände sich ein Teilchen bewegt, desto schneller ist es. So ergibt sich das parabolische Strömungsprofil. Im Flusskanal ist die Situation etwas anders. Wegen der rechteckigen Geometrie der Flusszelle ist der Flusskanal im Querschnitt rechteckig. In den Ecken ist daher die Geschwindigkeit am kleinsten (Abb. 5.7) und in der Mitte der Flusszelle am höchsten (A). Die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen in den Bereichen der Ecken binden, ist am größten. Über der Chip-OF von den Ecken (B) in Richtung des mittleren Chipbereichs (C) wird die Geschwindigkeit immer größer während die Bindungswahrscheinlichkeit wegen der höheren

Scherkräfte in diesem Bereich abnimmt. Offenbar reicht die Geschwindigkeit im Bereich C aus, um eine Bindung zu verhindern. Der Befund wäre sehr erstaunlich, da die Experimente stets bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt wurden, was eine sehr geringe Geschwindigkeit ist. Als drittes ergibt sich aus Abb. 4.53 B (Kapitel 4.1.8.1), dass sich die Zelle in den Ecken zufällig ablagern (oben in der Abb.), während sie in Richtung Mitte (unten in der Abb.) sich deutlich entlang der Strömungsrichtung ausrichten. In diesem Kontext ist auch Abb. 4.53 E (Kapitel 4.1.8.1) interessant: Die Aufnahme wurde in der Mitte des Kanals gemacht, jedoch am Übergang zum überkreuzenden Kanal des vorherigen Experiments, in welchem auch Legionellen immobilisiert worden sind. Das Bild zeigt mehrere ungewöhnliche Häufchen von Legionellen. Vermutlich ist hier die Situation aufgenommen worden, in der die Zellen aus dem untersuchten Flusskanal auf den Bereich getroffen sind, in dem schon Zellen im Zuge des vorherigen Experiment immobilisiert worden waren. Die Häufchenbildung in der Mitte des Kanals lässt sich nun so erklären, dass die im Experiment zuvor immobilisierten Zellen als eine Art Geschwindigkeitsschwelle wirkten und sich Zellen aus dem Strom aufgrund dessen absetzten. Diese Deutung mag als Überinterpretation kritisierbar sein, sie führt jedoch zu folgender Überlegung: Man könnte auf der Oberfläche in gewissen Abständen Geschwindigkeitsschwellen künstlich einführen, um die Geschwindigkeit an der Oberfläche gerade in der Mitte des Kanals zu senken. (Anmerkung: Es wurde schon bei der geringsten Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  gearbeitet). Auf diese Weise ließe sich möglicherweise die Oberflächenbelegung verbessern und auch die Detektions- bzw. Bestimmungsgrenze nach unten verlagern, da zu erwarten ist, dass die Bindungswahrscheinlichkeit steigt.

Mit dem fAK AK237744 und Leg1P(4) konnten keine nennenswerten Signale erzielt werden (s. Kapitel 4.1.5.6). Es wurde vermutet, dass dies auf eine veränderte Antigenexpression zurückzuführen sei. Daher wurde in darauf folgenden Experimenten auf das Antigen-Fängerantikörper-Paar Leg1P(4)-Leg1G3 gesetzt. Die Signale fielen bei der Antigen-Antikörper-Paarung AK237744-Leg1P(1)-Zellen (erste Charge) mit 5000 IU bis 6000 IU höher aus als bei der Paarung Leg1G3-Leg1P(4)-Zellen (vierte Charge) mit 4000 IU bis 5000 IU (s. Kapitel 4.1.5.6, Abb. 4.43 und 4.44). Das unterschiedliche Sättigungsverhalten könnte nicht nur mit veränderter Antigenexposition zu tun haben sondern auch mit der Größe der Zellen. Wie die Bestimmung der Zelllänge in Kapitel 4.1.7.3 zeigte, beläuft sich die durchschnittliche Länge der Leg1P(1)-Zellen auf 3  $\mu\text{m}$ . In der Stichprobe sind 65 % der Zellen nicht länger als 3  $\mu\text{m}$ . Leg1P(4)-Zellen dagegen sind durchschnittlich 5  $\mu\text{m}$  lang und nur 13,3 % der Zellen sind weniger als oder gleich 3  $\mu\text{m}$  lang. In Charge 1 liegen also wesentlich mehr Zellen vor, die weniger als oder gleich 3  $\mu\text{m}$  lang sind. Es ist zu erwarten, dass kleinere Zellen die OF dichter beladen werden. Es wurden nur einige Stichproben-Bilder von Chips gemacht, auf denen Leg1P-Zellen der 1. Charge zu sehen sind. Diese Bilder zeigen Bereiche in der Nähe der Flusskanalmitte. In den Bereichen nahe der Mitte ist die Dichte immobilisierter Zellen geringer (Kapitel 4.1.7.1). Aufnahmen aus den Randbereichen, wo den Bildern in Kapitel 4.1.7.1 zufolge die Zelldichte wesentlich höher ist,

fehlen für Leg1P(1)-Zellen. Daher bleibt die Behauptung, dass kleinere Zellen dichtere Anordnungen auf der OF bilden theoretisch plausibel, empirisch aber unbestätigt. Wie zuvor schon diskutiert, wurde versichert, die Zellen der Chargen 1, 2, 3 und 4 seien unter gleichen Kulturbedingungen gewachsen. Laut Frau Helming (FzmB) wurde wegen der Probleme mit den Chargen 2 und 3 eine neue Probe von Legionellen beim Robert-Koch-Institut bestellt, weil die Vermutung bestand, dass die bisher verwendeten Zellen nicht mehr in Ordnung sein könnten. Trotzdem verhielten sich auch die Chargen, die von dieser neuen Probe abgeleitet worden sind, anders als die Zellen der ersten Charge. Vor dem Hintergrund der Erfahrungen mit den Legionellen und ihren sehr variablen Verhaltensweisen liegt es nahe, dass Legionellen wesentlich sensibler für kleine Abweichungen in den Kulturbedingungen sind als andere Bakterien und daher mit recht großen Änderungen ihres Verhaltens in antikörperbasierten Tests reagieren. Das erklärt auch, warum sich Legionellen bisherigen Versuchen entzogen, Antikörper-basierte Bioassays zu ihrem schnellen und verlässlichen Nachweis zu entwickeln. Wie in der Einleitung beschrieben, sind noch immer Kulturnachweise auf selektiven Medien oder PCR-basierte Methoden nötig, um Legionellen nachzuweisen. Wenn die Zellen der ersten Charge nun nicht nur in ihrer Antigenexpression sondern auch in ihrer Größe von den Zellen der vierten Charge abweichen, kann das angesprochene unterschiedliche Sättigungsverhalten erklärt werden: Die kleineren Zellen der 1. Charge werden aus geometrischen Gründen eine dichtere Anordnung auf der OF bilden, als es bei den großen Zellen der 4. Charge der Fall ist. Sollten Legionellen auch in der Natur tatsächlich sowohl in Antigenexpression als auch in Größe stark variieren, sollte dies bei zukünftigen Projekten bedacht werden. Allerdings ist bisher nicht bekannt, dass dies so sei. Die unterschiedliche Größe der Zellen könnte bei der Zellzahlbestimmung mittels Turbidimetrie bei einer Wellenlänge von 600 nm zu einem Fehler geführt haben. Wie bereits diskutiert ist die Methode nur für *E. coli* genau. Die REM-Bilder zeigen jedoch, dass ein nicht unerheblicher Teil der Zellen der 4. Charge (Leg1P(4)) mit 5 µm Länge fast doppelt so lang sind, wie die Zellen der 1. Charge (Leg1P(1)) und damit auch deutlich von den angegebenen Literaturwerten für Legionellen abweichen (0,3 µm-0,7µm im Durchmesser und 2 µm in der Länge). Der Fehler könnte also größer ausfallen, als ursprünglich angenommen.

#### **5.4.2 Direct-Assay-Format mit Leg1P(1) Zellen**

Auf dem Chip, auf denen Leg1P(4)-Zellen immobilisiert worden sind, wurden weniger Zellen gefunden als auf dem Chip, welcher mit einem fAK ausgestattet war. Stattdessen wurden viele Strukturen gefunden, welche nicht als Zellen erkennbar waren. Diese wiederum wurden nicht auf dem Chip gefunden, auf dem das Experiment im SAF durchgeführt worden war. Die Bakterien, die im SAF und im DAF verwendet worden sind stammten aus der gleichen Stammsuspension. Daher ist davon auszugehen, dass die Bestandteile, welche sich auf der OF des Chips aus dem DAF-Experiment finden, auch

in der Probe vorhanden waren, die für das SAF-Experiment in Kapitel 4.1.7.1 verwendet worden ist. Das bedeutet, dass die Ausstattung der Chip-OF mit fAK und BSA gegenüber solchen Verschmutzungen blockiert. Demnach sind unerwartet viele Bestandteile in den Proben vorhanden, die im DAF co-immobilisiert werden. Einerseits tragen sie so zum Sensorsignal bei andererseits könnten sie gegenüber Legionellen blockieren. Die unteren Nachweisgrenzen, die in den Experimenten im DAF bestimmt worden sind (Kapitel 5.1.5.3 und 5.1.5.8), enthalten also auch Signalanteile, welche gar nicht durch Legionellen verursacht worden sind. Demnach dürfte die untere Nachweisgrenze für reine Legionellen-Suspensionen höher ausfallen als in diesen Experimenten.

### **5.5 Ergebnisse der ConA-SAv-Mannan-Experimente (RIFS)**

Ein Zweck der Experimente dieses Kapitels war, eine mehrfach-verwendbare OF für Bioassays zu entwickeln. Wie in Kapitel 1.2.2 dargelegt, sind biosensorische Methoden oft teuer, da die verwendeten Biochips nur einmal verwendbar sind. Darüberhinaus sollte durch die Etablierung einer derartigen OF der Proof of Principle für das im AK Keusgen durchgeführte Drittmittelprojekt „Multiprot“ erfolgen. In dem Projekt ging es um die Entwicklung eines „Enhancer-Moduls“ für Lateral Flow Assays (LFA). Mit LFA können sehr niedrig konzentrierte Analyten oft nicht nachgewiesen werden. Ein praktisches Beispiel stellen LSD-Tests dar. LSD wird vom Organismus sehr schnell abgebaut. Aufgrund der biologischen Halbwertszeit von 3-5 Stunden sind im Urin nach kurzer Zeit noch weniger als 1 ng/ml LSD enthalten (Baselt & Cravey, 1995). Bei einer Drogenkontrolle vor Ort wird darum auf einen LSD-Test verzichtet. Ein einfach durchzuführender LSD-Test auf LFA-Basis könnte sehr hilfreich sein. In Kapitel 1.4.4 wurde ein Konzept für regenerierbare OF für Biosensoren vorgestellt. Eine Übertragung dieses Konzepts auf LFAs würde ein Enhancer-Modul für LFAs realisieren. Ein Analyt in einem großen Volumen könnte im LFA-Enhancer-Modul appliziert werden und anschließend das Lösungsmittel entfernt werden. Die Applikation eines kleinen Volumens einer Regenerationslösung könnte den Analyten wieder aufnehmen, was eine Ankonzentration des Analyten bedeuten würde, und einer Nachweis-Reaktion zuführen.

#### **5.5.1 Mannan-Funktionalisierung auf APTES-OF 1**

Die ersten Funktionalisierungen wurden gemäß dem zur Mannanfunktionalisierung durchgeführt, wie es im AK Keusgen entwickelt und von Markus Hartmann auf Mikroskopierdeckgläsern im Zusammenhang mit SPI-Experimenten verwendet worden ist (Protokoll Mannan I; Kapitel 3.2.1.2). Das Protokoll wurde einfach auf die Glaschips von Analytik Jena angewendet. Das Sensorgramm zu einem der ersten Versuche, welche mit dem BIAffinity durchgeführt worden sind, zeigt auf MSP1 starke Artefakte, so dass Daten, die über diesen Messspot gewonnen wurden, nicht auswertbar waren.

Unter MSP2 bleibt die Aufzeichnung der Immobilisierungssignale während der BSA-Injektion artefaktfrei. Es wurde davon ausgegangen, dass BSA nicht an Polysaccharide binden kann. Da BSA aber an die OF bindet, kann man davon ausgehen, dass unspezifische Bindestellen vorhanden sind. Mit anderen Worten: die Mannanfunktionalisierung erfolgt nicht derart, dass sie selbst zu einer Blockierung von BSA von der OF führt. Es sind also unspezifische Bindungsstellen vorhanden.

Einige Minuten nach dem Start der ConA-SAV-Injektion (FP) kommt es auch unter MSP2 zu Artefakten, in Form eines abrupten Signalabfalls und anschließendem allmählichen Anstiegs. „Rechnet“ man die Artefaktbildung heraus, erhält man ein ConA-SAV-Immobilisierungssignal von 1940 IU. Allerdings ist keineswegs sicher, dass das Signal ohne Artefaktbildung nicht anders hätte ausfallen können. Unter diesen Voraussetzungen konnte jedoch für die Regeneration unter Verwendung von aMP ein Regenerationserfolg von 48,8% berechnet werden. Die Regeneration mit aMP ist diesem Experiment zufolge also möglich, wenn auch nur zu etwa 50%.

Zu derartigen Artefaktbildungen kann es durch Luftblasen im System, im Pufferreservoir und den Probenbehältern kommen. Um die Wahrscheinlichkeit für Luftblasen im System zu minimieren, wurde mit entgastem Puffer gearbeitet. Wenn Luftblasen in dem durchsichtigen Schlauch beobachtet werden konnten, der Flüssigkeit aus dem System in den Abfallbehälter transportiert, wurde dies als Hinweis auf Luft im System angesehen. In solchen Fällen wurden weitere Systemspülungen durchgeführt, bis keine Blasen mehr auftraten. Da Luftblasen meist in das System geraten, bevor der Strom über den eingelegten Chip und die beiden Messspots geht, sind Artefakte auf beiden Messspots zu erwarten. In diesem Fall traten die Artefakte jedoch nur über MSP 1 auf, der in der zeitlichen Reihenfolge nach dem MSP 2 erreicht wird. Wahrscheinlicher ist es demnach, dass die OF zwischen MSP 2 und MSP 1 verunreinigt war und die Verunreinigungen durch den Pufferstrom in Richtung MSP1 transportiert worden sind. Allerdings wurde streng darauf geachtet, dass die OF nicht verschmutzen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Mannanfunktionalisierung nicht stabil geblieben ist und während der Experimente Teile der Mannan-OF abgetragen worden sind. Manchmal treten solche Artefakte auch bei Fehlern in der Dichtung zwischen Flusszelle und Sensorchip auf.

Der gleiche Chip wurde nun mit 2% SDS gespült, um die Proteine, die nicht durch aMP von der OF entfernt worden sind, zu denaturieren. Das Ergebnis zeigt, dass diese die Proteine von der OF entfernte. Dann sollte ein Proof of Principle-Versuch durchgeführt werden, in Rahmen dessen ConA-SAV, bAK und ein Analyt immobilisiert werden sollten, gefolgt von einer Regenerationslösung. Zunächst wurde erneut mit BSA blockiert. Das BSA-Signal viel mit 250 IU kleiner aus als im Versuch davor (337 IU). Möglicherweise hat SDS nicht alle Proteine von der OF entfernt, so dass nun weniger BSA gebunden worden ist. ConA-SAV lieferte mit 879 IU bzw. 851 IU ebenfalls weniger Signalanstieg als im Experiment zuvor. Der bAK lieferte ein sehr kleines Signal von etwa 60 IU und der Analyt von etwa 260 IU. Wie aus den Erfahrungen der Legionellen-Experimente hervorgeht, sind derart kleine Signale

nicht unbedingt auf spezifische Bindungen zurückzuführen. Unspezifische Bindungen scheinen hier wahrscheinlicher. Aufgrund dessen, dass mit aMP im ersten Versuch nur zu 50% regeneriert werden konnte, wurde nun mit 2% SDS regeneriert. SDS denaturiert die Proteine auf der OF und führt negative Ladungen ein, was die Löslichkeit der Proteine verstärkt. Es verwundert daher nicht, dass das Signal dafür spricht, dass sämtliche Proteine von der OF entfernt worden sind. Dass die Regeneration zu mehr als 100% erfolgt, könnte an Brechungsindexänderungen durch SDS erklärt werden. Die unterschiedlichen Signale nach BSA-Injektion im ersten und zweiten Experiment können daher wahrscheinlich nicht auf Proteinreste aus dem ersten Experiment zurückgeführt werden, welche die SDS-Spülung überstanden. In diesem zweiten Versuch kam es auf beiden Messspots zu keinerlei Artefakten, was für die These spricht, dass sie im ersten Versuch durch Verunreinigungen oder durch einen Abbau der OF (der im zweiten Experiment nicht weiter stattfand) verursacht worden sind.

Auf der gleichen OF wurde nun eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in denen jeweils zuerst mit BSA blockiert worden ist und danach ConA-SAv unterschiedlicher Konzentration immobilisiert worden ist. Danach wurde jeweils mit 2% SDS regeneriert. Die halblogarithmische Auftragung der Bindungssignale nach ConA-SAv (Abb. 4.61 A) suggeriert einen sigmoiden Verlauf. Die BSA-Signale sollten jedoch konstant sein, schwanken jedoch relativ stark, vor allem bei den Experimenten, bei denen höhere ConA-SAv-Konzentrationen verwendet worden sind. Dass die ConA-SAv-Signalentwicklung irreführend sein könnte, zeigt die Auftragung der ConA-SAv- und BSA-Signale gegen die Reihenfolge der Experimente. Abbildung 4.61 B zeigt auf der x-Achse die ConA-SAv-Konzentration des 1., 2., 3. etc. Experiments. Nun erkennt man, dass die BSA-Signale trotz konstanter Konzentration und konstantem Volumen immer weiter abnehmen. Der Trend ist auch im Fall von ConA-SAv zu erkennen. Das legt nahe, dass die der Chip mit jedem Versuch „altert“. Wiederholte Protein-Applikationen gefolgt von 2% SDS sorgen dafür, dass sich die möglichen Sensorsignale bei einem Wert von etwa 500 IU einpendeln. Wie die Bindungskurven nach SDS-Zugabe (Abb. 4.60) zeigen, führt SDS zu einer etwa 100%-igen Regeneration. Die „Chip-Alterung“ scheint daher unabhängig von der Entfernung der Proteine zu sein. Mit anderen Worten: es sind wahrscheinlich nicht akkumulierende Proteine, welche nicht durch SDS von der OF gewaschen worden sind, dafür verantwortlich, dass die ConA-SAv-Bindekapazität der OF nachlässt. Es könnte aber auch sein, dass SDS etwas bewirkt, wodurch der Brechungsindex an der OF so geändert wird, dass eventuell noch vorhandene Proteine „signal-mäßig“ maskiert werden.

Um den Befund zu bestätigen wurde das Experiment noch einmal auf dem gleichen Chip wiederholt, jedoch wurde er um 180° gedreht, so dass unter den Messspots eine unbenutzte OF zu liegen kommt. Diesmal wurde die Reihenfolge so gewählt, dass das erste Experiment mit der geringsten

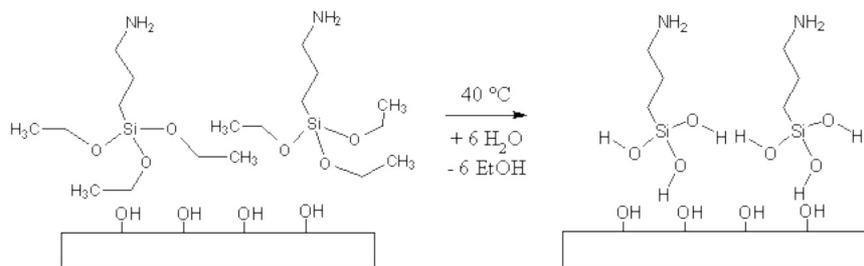
ConA-SAv-Konzentration durchgeführt worden ist und das letzte Experiment mit der höchsten Konzentration endete. Abbildung 4.63 A und B zeigen wieder eine halblogarithmische Darstellung der Signale gegen die Konzentration des ConA-SAv (BSA-Konzentration konstant) und eine Darstellung in der Reihenfolge der durchgeführten Experimente. Wie sich zeigt, decken sich die beiden Abbildungen (der Unterschied ergibt sich aus der halblogarithmischen Darstellung in A und der nicht-halblogarithmischen Darstellung in B). Von einem sigmoiden Zusammenhang der ConA-SAv-Konzentration und den entsprechenden Signalen, kann man nicht sprechen. Aus B geht hervor, dass die niedrigsten Konzentrationen zunächst recht hohe Signale liefern. Bei 50  $\mu\text{g/ml}$  ConA-SAv ist das Signal am niedrigsten und steigt bei höheren Konzentrationen allmählich an. Erst eine Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  ergibt ein Signal der Höhe der niedrigsten Konzentrationen. Gleichzeitig fällt das Signal, welches die BSA-Blockierung liefert, kontinuierlich ab und „pendelt“ sich auf einem Niveau von ca. 100 IU ein. Der BSA-Signal-Verlauf scheint auch hier auf eine „Alterung“ hinzudeuten. Der jähe Signalarückgang nach ConA-SAv-Immobilisierung von 50  $\mu\text{g/ml}$  könnte einen plötzlichen Verlust von Mannan auf der OF bedeuten. Allerdings steigen die Signale im Folgenden wieder je höher die ConA-SAv-Konzentration wird. Möglicherweise handelt es sich hier aber um unspezifische Bindungen auf der OF, die unter massiver ConA-SAv-Präsenz einsetzt. Dass die OF von mäßiger Qualität ist, zeigt auch das Ensemble von Beispiel-Sensorgrammen, welche in Abb. 4.64 gezeigt werden. Den Sensorgrammen liegen mehrere Chips zugrunde. Sie spiegeln die Häufigkeit von Artefakten auf verschiedenen Chips wieder (besonders B, C, D aber auch A (MSP1 wegen ausufernder Artefakte nicht gezeigt) und F). Außerdem wird deutlich, dass die Immobilisierbarkeit von BSA sehr unterschiedlich ausfallen (Abb. 4.64 E und F) und die Regeneration mit aMP trotz mehrerer Injektionen fehlschlagen kann (Abb. 4.64 A).

Die Ergebnisse sind sehr rätselhaft und unerwartet. Es kommt zu Phänomenen, die letztlich nicht geklärt werden können. Eine naheliegende Vermutung ist, dass die APTES-Funktionalisierung auf den RfS-Chips nicht den gewünschten Erfolg ergab. Möglicherweise fand eine APTES-Bindung an der OF nur teilweise statt, so dass sich hier ein APTES-OF mit häufigen Vakanzen (Stellen ohne APTES) etablierte aber keine homogene APTES-OF. Teilweise scheinen es, als seien Artefakte auf ein „Wegbrechen“ von Oberflächenstrukturen zurückzuführen. Der Grund könnte sein, dass die Bindung von APTES oder einer anderen Komponente nicht stabil genug ausfällt. Möglicherweise ist die Qualität des Glases oder Verarbeitungsschritte bei der Herstellung dafür verantwortlich (was nicht in Erfahrung gebracht werden konnte). Dass sich Mannan zumindest teilweise auf der OF findet, dafür spricht das erste Experiment dieses Kapitels (Abb. 4.58). Die OF mit immobilisiertem ConA-SAv konnte 50% regeneriert werden. Wenn man die Immobilisierbarkeit von ConA-SAv als notwendige und seine Entfernung mittels eines um die spezifische Zuckerbindestelle konkurrierenden Monosaccharids als hinreichende Bedingung für die Präsenz von Mannan auf einer OF ansieht, dann sprechen 50% Regene-

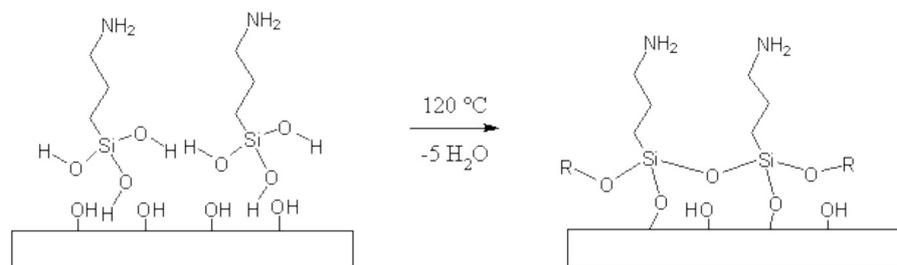
## 5 | DISKUSSION

ration zumindest für eine teilweise Mannanpräsenz. Der nicht-entfernte Protein-Teil könnte unspezifisch gebunden haben. Es liegt also nahe, dass die Mannanbelegung, wenn sie stattfand, sehr lückenhaft ist.

Daher wurde bei der APTES-Chemie angesetzt. Das Protokoll (Protokoll Mannan II; Kapitel 3.2.1.3) wurde ergänzt durch einen 2-Stunden-Inkubationsschritt in einem ddH<sub>2</sub>O-Bad bei 40 °C, der nach der Inkubation in APTES-Lösung und den drei Reinigungsschritten in Toluol, Methanol und ddH<sub>2</sub>O stattfand. Anschließend wurden die Chips 40 min bei 120 °C in einem Ofen inkubiert. Das Wasserbad sollte für eine vollständige Hydrolyse des APTES sorgen:



Der anschließende Inkubationsschritt im Ofen dient der Beschleunigung der Kondensationsreaktion:



Da der Verdacht bestand, dass die Mannan-OF erhebliche Vakanzen aufwies, wurden für die ersten Experimente mit dem neuen Protokoll je drei BSA-Injektionen (50 µl, 2000 µg/ml) vorgenommen, um sicher zu stellen, dass eine OF, die eventuell weiterhin erhebliche Vakanzen aufwies, genügend zu blockieren. Aus den Bindungskurven in den Abb. 4.65 A und B geht hervor, dass die beiden zusätzlichen BSA-Injektionen nicht notwendig sind, um die OF zu blockieren. Die anschließende ConA-Injektion führte zu einer Assoziation und die aMP-Regeneration zu einer deutlichen Abnahme der Signale zwischen 88% und 113%. Die aMP-Injektionen bewirkten ein deutlich verändertes Dissoziationsverhalten, so dass der Signlrückgang nach aMP-Injektion auf die spezifische Konkurrenz von aMP und Mannan um die ConA-Bindestellen zurückgeführt werden kann. Damit sind die notwendige und hinreichende Bedingung für die Mannan-Präsenz erfüllt.

Im nächsten Experiment (Abb. 4.66, Übersicht; Abb. 4.67 A (Detail)) wurde nur noch mit einer BSA-Injektion blockiert. Danach wurden drei ConA-Injektionen (je 50  $\mu$ l, 50  $\mu$ g/ml) jeweils gefolgt von aMP-Injektionen (150  $\mu$ l, 10% + 620 mM NaCl) durchgeführt. Auch in diesem Experiment konnte auf diese Weise nachgewiesen werden, dass Mannan auf der OF präsent ist. Darüberhinaus zeigt das Experiment, dass die OF mehrmals (drei mal) benutzbar ist und die Regeneration zu 95% bis 100% ausfällt.

Auch bei der darauffolgenden Injektion von ConA-SAv-FP (50  $\mu$ l, 50  $\mu$ g/ml) ließ sich eine Bindungskurve beobachten sowie eine erfolgreiche Regeneration mit insgesamt 96,6% nach zweimaliger aMP-Injektion (150  $\mu$ l, 10% + 620 mM NaCl). Die Signale, die durch äquimolare Mengen an ConA und ConA-SAv, verursacht worden sind, unterscheiden sich stark ( $OSD(ConA) \leq 828$  IU und  $OSD(ConA-SAv) \leq 1400$  IU). Dafür sind vermutlich Brechungsindexänderungen infolge der Fusion von ConA und SAv verantwortlich. Welche Rolle die Dimensionen des Proteins spielen ist unklar, da der Anteil des Brechungsindex an der Signalveränderung nicht klar ist. Aus diesem Experiment geht hervor, dass die Mannan-Bindfähigkeit des ConA-Teils von ConA-SAv erhalten bleibt. Das zeigt die Tatsache, dass ConA-SAv immobilisierbar und aMP-regenerierbar ist.

Als letzte in diesem Experiment wurde wieder ConA-SAv (50  $\mu$ l, 50  $\mu$ g/ml) injiziert gefolgt von einem bAK und fünf aMP-Injektionen. Die OSD nach ConA-SAv-Injektion viel mit 1318 IU sehr ähnlich aus zu der vorherigen ConA-SAv-Injektion in diesem Experiment. Die Applikation eines bAK führte zu einem weiteren Anstieg des Signals um 1280 IU. Demnach lässt sich ein bAK auf einer derartigen OF binden. Allerdings schlägt die Regeneration mit aMP selbst nach fünfmaliger Injektion fehl. Es konnte lediglich eine Gesamtregeneration von 22,2% erzielt werden. Die Bindung des bAK scheint die Gegebenheiten auf der OF zu verändern. Möglich ist, dass die Bindung des bAK durch die SAv-Domäne des ConA-SAv zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften des ConA-Teils führt, so dass die Mannan/ConA-SAv-Bindung stärker ausfällt als die zwischen Mannan/ConA-SAv/bAK. Aufgrund der Tatsache, dass AKs bei der Biotinylierung zumeist mehrfach biotinyliert werden, kann es aber auch zur Vernetzungen von ConA-SAv-Einheiten durch bAKs kommen, die für Regenerationslösungen schwerer zugänglich sind oder welche nicht leicht von der OF zu entfernen sind, weil sie „schollenartige“ Strukturen bilden.

Der Vergleich der Bindungskurven, welche bei den Antikörperapplikationen im Rahmen der Arbeiten mit Legionellen erzielt worden (z.B. Protein A 50  $\mu$ g/ml) sind und der Höhe der Bindungskurven, die mit ähnlichen Konzentrationen ConA und ConA-SAv erzielt worden sind, zeigt, dass im Rahmen der Legionellen-Versuche wesentlich höhere Signale messbar sind. Das kann eventuell auf unterschiedli-

che Brechungsindex-Gegebenheiten zurückzuführen sein. Dennoch bleibt angesichts der recht kleinen Signale, welche auf Mannan-OFen gemessen worden sind, ein gewisser Restzweifel, da höhere Signale erwartet worden sind. Möglicherweise ist auch hier die Mannanfunktionalisierung nicht so stark ausgefallen, dass die OF eine hohe Kapazität für ConA- bzw. ConA-SAv-Bindung hätte. Andererseits sind bei diesen Experimenten Artefakte wesentlich seltener aufgetreten. Abbildung 4.68 zeigt einige Beispiele, bei denen es zu Artefakten kam (Abb. 4.68 B) bzw. bei denen keine Immobilisierung von BSA (Abb. 4.68 A) bzw. keine Immobilisierung von ConA-SAv möglich war (Abb. 4.68 C). All das weist darauf hin, dass die Mannanfunktionalisierung auch mit den Modifikationen in der APTES-Chemie nicht wie erwartet ausfällt. Auch hier scheint es Fälle gegeben zu haben, in denen OF-Abschnitte unter den MSPs zu liegen kamen, auf denen kein Mannan präsent war. Dass Artefakte seltener vorkommen, könnte daran liegen, dass instabil gebundene Komponenten der OF-Chemie bereits im Wasserbad entfernt worden sind. Dadurch könnte die Häufigkeit von Artefakten durch Abtragungen von der OF im Pufferstrom verringert worden sein. Dass es sich um ein Dichtungsproblem handeln könnte, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

### 5.5.2 Mannan-Funktionalisierung von OTS-Oberflächen

Da es sich bei dem hier verwendeten Mannan um ein Produkt handelt, welches aus *S. cerevisiae* gewonnen wird, könnten noch Membranproteine im Mannan enthalten sein (Kapitel 1.4.3). Da Membranproteine in den Transmembranbereichen hydrophob sind, könnten diese als Anker zur Bindung von Mannan auf hydrophoben OF dienen. Um herauszufinden, ob in dem verwendeten Mannan Protein-Reste enthalten sind, wurde eine SDS-PAGE mit Mannan zweier Konzentrationen und Dextran als Negativkontrolle (da es als proteinfrei deklariert ist) und einem Proteinmarker (PAGERuler) als Positivkontrolle durchgeführt. Der Proteinnachweis wurde mittels Coomassie-Brillant Blau erbracht. Wie die Abb. 4.69 zeigt, sind in der Markerreihe Proteine gelaufen. In der Reihe der Negativkontrolle kam es zu keiner Färbung. Da Dextran dieses Produkts max. 6 kDa groß ist, wurde streng darauf geachtet, dass das Gel nicht zu lange läuft, so dass eventuell angefärbtes Dextran unterhalb des Bereichs erscheinen müsste, in dem die Markerbande für Proteine von 10-15 kDa erscheint. Da das nicht der Fall ist, kann man davon ausgehen, dass es, wie erwartet, zu keiner Interaktion zwischen Zuckern (am Beispiel von Dextran) und Coomassie Brillant Blau kommt. Daraus lässt sich schließen, dass die Färbung in den beiden Mannanreihen auf eine Interaktion von Proteinen und dem Farbstoff zurückzuführen ist. Demnach scheinen Proteine in der Mannanfraktion enthalten zu sein.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein Versuch unternommen, OTS-Chips unter Ausnutzung der Wechselwirkung zwischen hydrophoben Membranproteinen und der OTS-OF mit Mannan zu funktionalisieren. Ein RfS-Experiment mit einem solchen Chip ist in Abb. 4.70 zu sehen. In diesen Experimenten war das ConA-SAv in PBS pH 7,3 gelöst (Glycerol wurde bei der Umpufferung aus HEPES

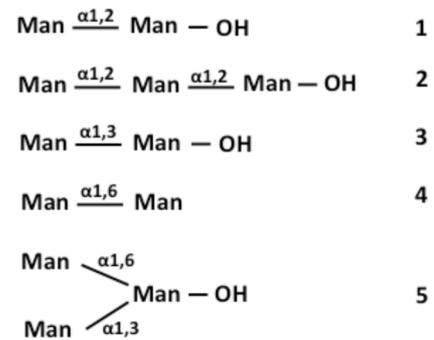
weitgehend entfernt). BSA-Blockierung, ConA-Applikation und aMP-Regeneration (85,7%) führten zum Nachweis von Mannan auf der OF. Demnach funktioniert diese Art der Mannanfunktionalisierung von OTS-Chips.

In den nächsten Schritten wurden ConA-SAv (100 µg/ml, 80 µl), bAK (100 µg/ml, 80 µl) und ein Analyt (50 µg/ml, 80 µl) nacheinander appliziert. Auch ConA-SAv lässt sich immobilisieren, sowie der bAK. Die Analyt-Injektion lieferte nur ein Signal von 149 IU. Die aMP-Regeneration führte nur zu einem 5,7%-igen Signlrückgang. Auch hier ist also ConA-SAv mit bAK und Analyt mit aMP nicht von der OF zu entfernen. Außerdem ist merkwürdig, dass der Analyt nur ein sehr geringes Signal produziert, obwohl der Analyt (humanes Fibrinogen) im Set mit dem empfohlenen Antikörper erworben wurde. Möglicherweise sind die antigenbindenden Antikörper epitope nicht zugänglich. Das wäre der Fall, wenn ein großer Teil der AK unspezifisch an das ConA-SAv binden würde. In einem weiteren Test wurde nochmals eine ConA-SAv-Injektion vorgenommen. Erstaunlicherweise wurde ein weiterer Signalanstieg um 3029 IU registriert. Das zeigt, dass durchaus noch neues Material auf der OF registriert werden kann. Die Regeneration mit aMP schlägt jedoch fehl. Vermutlich hat ConA-SAv bevorzugt an mehrfach biotinylierte AK gebunden, die zuvor auf der OF immobilisiert worden waren.

Daraufhin wurden Experimente mit verschiedenen Regenerationsmitteln unternommen. Die Regeneration mit einem thermodynamisch favorisierten Zucker stellt den Idealfall dar, weil dadurch die Integrität des Konstrukts ConA-SAv/bAK/Analyt nicht zerstört wird. Das Monosaccharid  $\alpha$ -Methylmannopyranosid gilt in der Literatur als das ConA-affinste Monosaccharid (Schwarz et al., 1993). Die anderen hier verwendeten Regenerationsmittel zielen alle auf die Denaturierung oder Veränderung der Struktur zumindest des ConA-Teils des ConA-SAv ab, so dass die Mannan-ConA-Bindung aufgehoben wird. Abbildung 4.71 A zeigt den ersten Teil der Experimente, in denen auf die Präsenz des Mannan auf der OF mittels Applikation von BSA, ConA und aMP getestet worden ist. Aus der Abbildung und Tab. 4.16 geht hervor, dass sowohl die Blockierung mit BSA als auch die ConA-Immobilisierung recht unterschiedlich ausfallen. Das spiegelt sich auch in den Standardabweichungen der OSD-Mittelwerte für die BSA-Signale ( $OSD_{MW}=839,2$  IU,  $StDev=191,1$  IU und  $SPW=467$  IU) und viel stärker in denen für ConA ( $OSD_{MW}=4292,5$  IU,  $StDev=1715,9$  IU und  $SPW=4059$  IU) wider. Die erzielten Regenerationen betragen zwischen 82,8% und 93,1%. Bei diesen Experimenten kam es zu keinen Artefakten, welche auf Abbauprozesse auf der OF schließen lassen. Auch wurde in keinem Experiment gefunden, dass sich kein Mannan auf der OF befand. Insofern stellt diese Art der Funktionalisierung eine sehr gute Alternative dar. Andererseits zeigen die BSA-Signale, dass die Blockierungen unter verschiedenen Messspots unterschiedliche Signale ergeben, was auf eine gewisse Diversität in der OF-Belegung durch die Mannan-Protein-Komplexe hindeutet. Entsprechendes zeigen die ConA-Signale. An manchen OF-Abschnitten scheint es mehr ConA-Bindestellen zu geben als auf an-

## 5 | DISKUSSION

deren Abschnitten. Die Regeneration fällt mit >80% zufriedenstellen aus. Das kann bedeuten, dass ein gewisser Teil des ConA trotz Blockierung unspezifisch an die OF bindet. Andererseits sind unspezifische Bindestellen mittels BSA blockiert worden. Das ConA-SAv nicht mit BSA interagiert geht aus den Versuchen mit ConA-SAv auf OTS-OF hervor. Dabei wurden keine Hinweise auf eine derartige Interaktion gefunden. Es ist aber bekannt, dass ConA an verschiedene Oligosaccharide wesentlich stärker bindet als an Monosaccharide. Laut Mandal et al. beträgt der  $K_a$ -Wert für die Bindung nativen ConAs bei pH 7,2 an aMP  $0,82 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Für die Bindung von ConA an die in Abb. 5.8 dargestellten Oligomere wurden mittels Kalorimetrie höhere  $K_a$ -Werte bestimmt. Für **1** wurde ein  $K_a$ -Wert von  $K_a = 4,17 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ , für **3** ein  $K_a$ -Wert von  $K_a = 3,79 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , für **4** ein  $K_a$ -Wert von  $K_a = 1,34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  und für das Trimanosid in **5** ein  $K_a$ -Wert von  $K_a = 3,37 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Der große Unterschied in der Affinität der Trimanoside zeigt, dass ConA für Trimanoside eine erweiterte Bindungsstelle besitzt (Mandal et



**Abb. 5.8: Verschieden Oligosaccharide für die Mikrokolorimetrische Daten vorliegen.**

al., 1994). Wie aus Abb. 1.12 in Kapitle 1.4.3 hervorgeht, besteht Mannan aus einem „Backbone“ aus  $\alpha 1,6$  gebundenen Mannose-Einheiten und  $\alpha 1,2$  bzw.  $\alpha 1,3$  gebundenen Verzweigungen. Es darf also davon ausgegangen werden, dass gerade an Verzweigungspunkten, an welchen drei Mannose-Einheiten aufeinander treffen, eine besonders hohe Affinität herrscht. Der ConA-Teil des ConA-SAv könnte hier so stark gebunden haben, dass eine Regeneration mit aMP aus thermodynamischen Gründen keine besondere Wirkung zeigt. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll Oberflächen mit Mannose-Dimeren aufzubauen und Trimannoside in Regenerationslösungen einzusetzen. Auch die Applikation von ConA-SAv im weiteren Verlauf fällt sehr unterschiedlich aus ( $OSD_{MW} = 1039,2 \text{ IU}$ ,  $StDev = 505,4 \text{ IU}$  und  $SPW = 1275 \text{ IU}$ ) (Abb. 4.71 B; Tab. 4.16). Die Immobilisierung von bAK lieferte bei gleicher Konzentration und gleichem Volumen wie ConA ein durchschnittliches Signal von  $OSD_{MW} = 809,8 \text{ IU}$  ( $StDev = 417,9 \text{ IU}$  und  $SPW = 1016 \text{ IU}$ ). Spannweite und Standardabweichungen scheinen im Einklang mit jenen von ConA-SAv zu sein. Außerdem zeigt sich erwartungsgemäß, dass je höher das ConA-SAv-Signal ausfiel desto höher fiel auch das bAK Signal aus. Allerdings konnte bei Analyt-Applikation nur ein Signalanstieg von durchschnittlich  $76,4 \text{ IU}$  beobachtet werden. Auch hier wurde das Antikörper-Antigen-Paar „anti-Fibrinogen-AK“-„humanes Fibrinogen“ verwendet.

Nach der Applikation der drei Komponenten ConA-SAv, bAK und Analyt erfolgte die Regeneration und anschließend eine weitere Applikation von BSA und ConA-SAv gleicher Konzentration und gleichen Volumens wie zuvor. Dies diente dem Test, inwieweit die OF durch die Regenerationslösungen beeinträchtigt worden sein könnten. Bei intakter Mannan-OF sollte ConA-SAv immobilisierbar und

aMP-regenerierbar sein. Idealerweise müsste nicht nochmals mit BSA blockiert werden. Die Experimente zeigten zunächst, dass alle Regenerationsmittel im Fall von ConA-SAv/bAK/Analyt effektiver waren als aMP. Tween 20 führte allerdings nur zu einer 25,3%-igen Signalreduktion und scheidet daher als Regenerationsmittel aus. HCl (2%) zeitigte eine 83%-ige Regeneration. Die BSA-Bindung nach der HCl-Regeneration liefert nur ein Signal von 158 IU. Das bedeutet möglicherweise, dass die Blockierung von der Regeneration nicht betroffen war. Allerdings konnten 100 µg/ml ConA-SAv anschließend nur noch eine Signalerhöhung von 460 IU bewirken. Die folgende aMP-Regeneration betrug lediglich 1,8%. Offenbar führt HCl zu einem Verlust des Mannans. Damit scheidet HCl als adäquate Regenerationslösung aus. Auch nach der Regeneration mit Tween20 und NaOH konnte kein weiteres BSA immobilisiert werden. NaOH scheint aber trotzdem mehr zu bewirken als die Denaturierung des Komplexes ConA-SAv/bAK/Analyt, da es zu einer 130%-igen Signalreduktion führt. Bei NaOH wird ebenfalls vermutet, dass es Mannan und auch das Silan von der OF entfernt. Im Fall von Tween20 lässt sich relativ viel ConA-SAv immobilisieren, jedoch schlägt auch hier die aMP-Regeneration fehl. Der Fall wird ähnlich bewertet wie der der aMP-Regeneration. Während letztere zu keiner Entfernung von Proteinen von der Mannan-OF zu führen scheint, ergibt sich für Tween20 lediglich eine 25%-ige Regeneration. Möglicherweise betrifft die auch eventuell unspezifisch gebundenes ConA-SAv, welches gar nicht spezifisch an Mannan gebunden hat. Eventuell entfernte es gerade die Menge Protein von der OF, welche bei der ConA-Regeneration mit aMP nicht entfernbar war. Wenn dieser ConA-Teil nicht besonders fest an hochaffine Mannanstellen gebunden hat sondern unspezifisch, dann könnte mit einer aMP-Tween20-Kombination eventuell eine 100%ige Regeneration von ConA erreicht werden. In beiden Fällen bleibt also viel ConA-SAv/bAK-Konstrukt auf der OF. Die hohen Signale von ConA-SAv und die unerwartete fehlende aMP-Regeneration könnten dadurch erklärbar sein, dass das neu applizierte ConA-SAv nicht nur an Mannan sondern auch an freie Biotine an den mehrfach biotinylierten AK bindet.

Im Fall von Triton X-100 fällt das Signal um 227%. Die BSA-Applikation liefert einen Signal-Anstieg um 1436 IU. Triton X-100 hat demnach auch die Blockierung zu Anfang des gesamten Experiments (also vor der ersten ConA-Injektion) stark beeinträchtigt. Außerdem fiel das BSA-Signal zu Beginn des Experiments mit 591 IU viel geringer aus, als das BSA-Signal im letzten Teil des Experiments mit 1436 IU. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Triton X-100 alle Protein inklusive derjenigen von der OTS-OF entfernt, die über hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert worden sind, also auch die hydrophoben Mannan-Ankerproteine als auch das BSA. Demnach kann auch nicht beurteilt werden, ob Triton X-100 auf das ConA-SAv den gewünschten Effekt hatte: die Veränderung der Konformation, so dass die Bindung an Mannan gelöst wird. Es besteht die Möglichkeit, dass Mannan samt Ankerproteinen und gebundenem ConA-SAv/bAK/Analyt-Konstrukt von der OF gelöst worden ist.

Die Mannan-Immobilisierungs-Alternative auf OTS-Oberflächen entpuppt sich also als wenig hilfreich, wenn es um die Regeneration des Gesamtkonstrukts geht. ConA und ConA-SAv können mit aMP zufriedenstellend von der OF entfernt werden. Möglicherweise verbessert ein Tween20-Zusatz die Wirkung. Mit bAK und Analyt gelingt die Regeneration bisher nicht.

### 5.5.3 Mannan-Funktionalisierung auf APTES-OF 2

#### 5.5.3.1 Vergleichsuntersuchung

Die bisher gezeigten Ergebnisse waren nicht besonders zufriedenstellend. Zum Abschluss der Arbeiten wurde noch eine Vergleichsuntersuchung durchgeführt, in der alle bisherigen Funktionalisierungsmethoden einander gegenübergestellt werden sollten. Außerdem wurden einige Detailänderungen am Protokoll vorgenommen, welche aufgrund der gesammelten Erfahrungen im Zuge sowohl der Legionellen- als auch der Mannan-Experimente gewonnen worden waren. Um auszuschließen, dass eventuell die Chemikalien für die Probleme in den zuvor durchgeführten Experimenten verantwortlich sein könnten, wurden sie gegen neue ausgetauscht. Die veränderten Arbeitsschritte sind in Tab. 4.19 zusammengefasst. Die RfS-Experimente sind alle mit vorheriger BSA-Blockierung (500 µg/ml, 80 µl) durchgeführt worden. Die ConA-Immobilisierbarkeit und aMP-Regenerierbarkeit (PBS pH 7,3) wurde hier als Maß für das Vorkommen von Mannan verwendet. Auf jedem Chip wurden zwei Experimente durchgeführt und mit den Mittelwerten von Messungen unter MSP2 gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.73 zusammengefasst worden.

In dem Kontrollexperiment aktOF wurde ConA ohne vorherige BSA-Blockierung über eine lediglich mit Piranha-Lösung aktivierte OF geleitet. Wie sich zeigt, lässt sich ConA auf diese Weise auf der OF immobilisieren. Eine im Anschluss durchgeführte aMP-Injektion führte nur zu einer 8,7%-igen Signalverringerng. Unter der Voraussetzung, dass Immobilisierbarkeit von ConA und Regenerierbarkeit durch aMP notwendige und hinreichende Bedingungen für die Präsenz von Mannan auf der OF sind, kann man schließen, dass ConA in diesem Experiment nur unspezifisch bindet. Im Kontrollexperiment aktOF+M wurde ein Chip, welcher mittels Piranha-Lösung aktiviert worden war, in einer Mannan-Lösung inkubiert. Es zeigt sich, dass sich auch auf diesem Chip ConA sowohl immobilisieren als auch zu 61,3 % bzw. 68,8 % aMP-regenerieren lässt. Der deutliche Unterschied im Regenerationsexperiment zeigt offenbar, dass eine Mannan-Immobilisierung aufgrund von hydrophilen Wechselwirkungen zwischen Mannan und einer Piranha-aktivierten OF möglich ist. Da die aMP-Lösung in PBS denselben Salzgehalt aufwies, wie der Puffer in dem das RfS-Experiment durchgeführt worden ist, kann man davon ausgehen, dass die Regenerationswirkung tatsächlich auf die Konkurrenz zwischen aMP und Mannan um die ConA-SAv-Bindestelle zurückzuführen ist. Im Versuch KP wurde ein mittleres

Signal von 1493 IU gemessen und eine Regeneration von 132% im ersten und 74,2% im zweiten Experiment. Demnach kann bei Anwendung von Protokoll Mannan I ein durchschnittlich doppelt so hohes ConA-Signal gemessen werden, wie auf einem Chip mit hydrophil adsorbiertem Mannan. Andererseits ist das ConA-Signal im Vergleich zu OTS+M und aktOF relativ klein, was darauf schließen lässt, dass bei weitem nicht soviel Mannan immobilisiert worden sein könnte, wie es die Kapazität des Chips erlauben würde. Im Fall von NP wird nur ein mittleres ConA-Signal von 348,5 IU gemessen. Die Regeneration fällt mit 102,1 und 133,4% sehr hoch aus. Das sieht zunächst aus, als seien die 348,5 IU auf eine spezifische ConA-Mannan-Bindung zurückzuführen. Andererseits lässt sich im aktOF-Experiment (ohne Mannan), in welchem ConA nur unspezifisch binden konnte, nach aMP-Injektion ein Signlrückgang von 408,8 IU (8,7%) beobachten. Der Signlrückgang im Experiment NP von 348,5 IU unterscheidet sich also nicht von dem in Experiment aktOF. Signale in dieser Größe enthüllen offenbar den Effekt von aMP-Lösungen auf unspezifisch gebundenes ConA. Demnach kann auch bezweifelt werden, dass sich auf diesem Chip Mannan befunden hat. Der Unterschied zu Experiment KP bestand darin, dass in NP eine Inkubation von 2 h in einem Wasserbad von 40°C auf die APTES-Funktionalisierung folgte. Da die ConA/aMP-Experimente nach Mannan I (KP) die Präsenz von Mannan zeigen, kann geschlossen werden, dass das Wasserbad einen negativen Effekt auf die Mannanfunktionalisierung hat. Es liegt nahe, anzunehmen, dass APTES nur schwach an die OF gebunden hat und sich im Wasserbad wieder von der OF löste. Silane binden zunächst über Wasserstoffbrückenbindungen an die OF, müssen dann aber zu Kondensationsreaktionen angeregt werden. In der Tat fallen die Resultate der ConA-Immobilisierung (6153,5 IU) und Regeneration (90 %) im Experiment NP+220°C besser aus als in NP und KP ohne Hitze-Schritt. Wenn es allerdings richtig ist, dass das Wasserbad in NP dazu führte, dass kein Mannan auf der OF ankommt, weil kein APTES zur Bindung bereitsteht, müsste das Wasserbad in NP+220°C denselben Effekt gehabt haben. Allerdings scheint die Behauptung, dass in NP kein Mannan auf der OF ist, zu stark zu sein, da nur insgesamt vier OF-Segmente mit den Messspots beobachtet worden sind. Es ist durchaus möglich, dass die ineffektive Methoden der APTES-Funktionalisierung in Experiment NP auch hier erfolgreich war aber nur an wenigen Stellen auf dem Chip. Diese Stellen müssen aber nicht diejenigen gewesen sein, die unter den Messspots zu liegen kamen. Das würde auch erklären, warum in den vorherigen Kapiteln nach Chipdrehung teilweise völlig andere Ergebnisse erzielt worden sind als vor der Chipdrehung. Das betrifft sowohl die Reproduzierbarkeit als auch das Phänomen, dass nach Chipdrehen teilweise keine Immobilisierung/Regeneration möglich war, wo es vor Drehen noch möglich war oder dass auf manchen Chips gar keine Immobilisierung/Regeneration möglich war während auf anderen schon. So könnte die erfolgreichere Immobilisierung in NP+220°C dadurch erklärt werden, dass hier OF-Segmente unter den Messspots zu liegen kamen, in denen APTES-Moleküle auf der OF das Wasserbad überstanden haben und durch den Hitze-Schritt zur kovalenten Bindung an die OF und zur Poly-

merisierung untereinander angeregt worden sind. Das Wasserbad könnte eventuell dafür gesorgt haben, dass zu lose gebundenes APTES von der OF entfernt worden ist, so dass Mannan nur auf APTES-stabilen OF-Bereichen gebunden worden ist. Das würde erklären, warum die Artefakt-Häufigkeit bei den Arbeiten mit den Mannan II-Chips (entspricht NP+220°C wobei in Kapitel 4.3.1.2 der Hitze-Schritt bei 120°C stattfand) geringer war als bei den Experimenten mit Mannan I-Chips (entspricht KP).

Der bei weitem größte Erfolg wurde auf OF erzielt, die gemäß Mannan III funktionalisiert worden sind (Kapitel 3.2.1.4). Damit wird selbst die ConA-Immobilisierung auf OTS-Mannan-Chips in den Schatten gestellt (OTS+M). Mit einem mittleren Signal von 77907,5 IU lieferte die ConA-Immobilisierung die größten Signale, welche im Rahmen dieser Arbeit gemessen worden sind. Auch die Regeneration viel mit >90% sehr gut aus. Demnach ist die Mannanfunktionalisierung am erfolgreichsten, wenn keine Wasserbad-Inkubation stattfindet. Kritisch ist aber ein Hitze-Schritt von 220°C für 15 min. Nun ist die Frage, warum sich KP und KP+220°C so stark unterscheiden? Denn die APTES-Moleküle werden ja durch den Hitze-Schritt nicht auf der OF eingeführt sondern vermutlich nur kovalent verankert. Die Einführung von APTES muss aber schon vorher stattfinden. Warum sollte APTES wieder (zumindest in großen Teilen) von der OF verschwinden? In NP liegt es nahe, das Wasserbad dafür verantwortlich zu machen. Andererseits könnte APTES, welches nicht kovalent gebunden hat (etwa wenn der Hitze-Schritt fehlt) auch im Zuge des restlichen Funktionalisierungsverfahrens von der OF gelöst worden sein. Allein die BDDG-Inkubation dauert 12 h und die in Mannan-Lösung weitere 24 h. Das könnte ausreichen, dass sich APTES, welches ohne Hitze-Schritt offenbar zum Großteil nur lose an der OG gebunden vorliegt, von der OF ablöst. Dass eine erfolgreiche APTES-Silanisierung auf RfS-Chips anders verläuft als auf Gold oder Mikroskopierdeckgläschen, könnte am verwendeten Material liegen. Glas kann von unterschiedlicher Qualität sein und kommt in verschiedenen Typen vor. Genauere Informationen zum Glas waren nicht zugänglich. Die Rolle des getrockneten Toluols kann an dieser Stelle nicht bewertet werden, da kein Kontrollversuch mit nichttrockenem Toluol durchgeführt worden ist, in dem nicht auch eine andere Variable verändert worden war. Es wird trotzdem empfohlen, trockenes Toluol zu verwenden, da die Wasserbedingungen als kritisch einzustufen sind. Das gilt auch für das Toluol, welches für die Reinigung zwischen Piranha-Bad und APTES-Inkubation verwendet wird. Somit erweist sich das Protokoll Mannan III als brauchbar.

### **5.5.3.2 Wiederholte ConA-Immobilisierung**

Aufgrund des Erfolgs mit dem Mannan III-Protokolls wurden einige weitere Experimente durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob sich ConA mehrmals immobilisieren und regenerieren lässt (Abb. 4.74). Die OSD nach BSA-Blockierung betrug 1679 IU und viel damit wesentlich geringer aus als die BSA-Blockierung bei den Versuchen KP+220°C. Die OSD nach ConA-Injektion fiel ebenfalls viel

geringer aus als bei den beiden KP+220°C-Experimenten. Statt durchschnittlich 77907,5 IU betrug der OSD-Anstieg nach den drei Injektionen hier 23567 IU, 16047 IU und 18816 IU. Die Regenerationen fielen mit 91,5%, 96% und 96,2% wieder sehr hoch aus. Trotzdem die ConA-Bindekapazität wieder wesentlich höher ausfällt als bei Chips, welche gemäß Mannan I und Mannan II funktionalisiert worden sind, werden bei weitem nicht die Signale erreicht, die für KP+220°C gemessen worden sind. Nun wäre zu erwarten, dass wenn weniger ConA an Mannan bindet, der Grund dafür in einer kleineren Menge Mannan auf der OF liegt. Dann wäre zu erwarten, dass die BSA-Blockierung größer ausfällt. Das ist jedoch nicht der Fall. Während BSA-Blockierung in diesem Experiment eine OSD von 1679 IU lieferte, betragen die OSDs in den beiden KP+220°C-Experimenten 7158 IU. Obwohl die geringer ausfallende Bindung von ConA an Mannan indiziert, dass sich hier weniger Mannan auf der OF befindet, indiziert das ebenfalls geringere BSA-Signal, dass dadurch nicht mehr unspezifische Bindestellen auf der OF vorhanden sind. Möglicherweise spielt hier der Umstand eine Rolle, dass Mannan ein Naturprodukt ist und daher verschieden lange Polysaccharidketten einschließt. Man sollte aber erwarten, dass sich diese Unterschiede nicht so stark auswirken. Eine andere Überlegung ergibt sich aus Versuchen, mit dem gleichen Protokoll (Mannan III) Dextran zu immobilisieren (Dextran statt Mannan). Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht präsentiert worden, aus Platzgründen und wegen der Tatsache, dass sie alle negativ ausfielen. Chemisch sollte es keinen Unterschied machen, ob OH-Gruppen von Dextran oder Mannan mit dem BDDG-Linker reagieren. Deshalb ist zu vermuten, dass die Mannan-Funktionalisierung tatsächlich nicht über Zucker-OH-Gruppen stattfand sondern über funktionelle Seitengruppen in den Protein-Anteilen des Mannans. Epoxidringe wie in BDDG reagieren mit Nucleophilen durch Ringöffnung. Die Reaktion ist stark pH-abhängig. OH-Gruppen reagieren mit Epoxiden am besten bei pH 11-12, Aminogruppen bei pH 9 und SH-Gruppen bei pH 7,5-8,5 (Schütz, 2000). Der pH-Wert von pH 10 bei Mannan-Inkubation nach BDDG-Funktionalisierung ist also nicht ideal, kann aber nicht höher gewählt werden, da das Glas unter höheren pH-Werten unbeständig wird. Es ist also anzunehmen, dass Aminogruppen im Protein-Anteil des Mannans eine wichtige Rolle spielen. Doch auch hier ist unklar, wie das Phänomen der unterschiedlichen ConA-Bindungssignale dadurch erklärt werden könnte. Das Experiment zeigt, dass die Mannan-OF nach Protokoll Mannan III mehrmals mit ConA belegt und mit aMP-Lösung regeneriert werden kann.

### **5.5.3.3 Unterschiedliche ConA-Konzentrationen**

In einem weiteren Experiment (Abb. 4.75) wurde ConA unterschiedlicher Konzentrationen auf eine OF immobilisiert, die zuvor nach Mannan III-Protokoll funktionalisiert worden ist. In drei Experimenten ergab sich eine durchschnittliche BSA-OSD von 2223 IU (StDev=239,3 IU), die gut reproduzierbar sind. Die OSDs nach ConA-Applikation verhalten sich wie erwartet. Je höher die Konzentration desto höher das Signal. Die beiden ConA 100µg/ml-Applikationen ergeben ein sehr ähnliches Signal und

liegen in dem Bereich, in dem auch die ConA 100 µg/ml-Signale im Experiment (Abb. 4.17) liegen. Die Chips der letzten beiden Versuche (Abb. 4.74 und 4.75) stammen aus demselben Funktionalisierungsvorgang. Der Chip aus dem Experiment, welches in Abb. 4.72 B (Mannan III-Protokoll (KP220+°C) im Zuge der Vergleichsuntersuchung funktionalisiert worden ist) dargestellt ist, stammt aus einem anderen Funktionalisierungsdurchgang. Offenbar sind Chips eines Funktionalisierungsvorgangs untereinander vergleichbar jedoch nicht Chips aus unterschiedlichen Funktionalisierungsvorgängen. Auch die Regeneration fällt mit >87% vergleichbar hoch aus, wobei aufgrund zu weniger Messergebnisse keine statistische Absicherung dieser Behauptung durchführbar ist. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass eine Blockierung unspezifische Bindestellen mit BSA offenbar nicht nötig ist. Bei einem Versuch ohne vorherige BSA-Blockierung wurde mit gleicher ConA-Konzentration ein vergleichbares Signal für ConA 100 µg/ml gemessen. Auch die Regeneration schien durch das Auslassen der BSA-Blockierung nicht beeinträchtigt.

### **5.5.3.4 Sättigung der Mannan-OF mit ConA**

Zuletzt stellt sich die Frage, wie viel ConA auf einer solchen OF immobilisiert werden kann? Dazu wurde ein Experiment mit einem Chip desselben Funktionalisierungsvorgangs (wie in Kapitel 4.3.1.4.3) unternommen, in welchem zuerst mit BSA blockiert wurde (damit ein Vergleich zur BSA-Blockierung der anderen Versuche möglich ist) (Abb. 4.76). Danach wurde ConA der Konzentration 100 µg/ml immobilisiert und mit aMP-regeneriert, um die Mannanpräsenz auf der OF zu verifizieren. Mit 2553 IU fiel die BSA-Immobilisierung vergleichbar aus. Die ConA 100 µg/ml-Injektion blieb mit 10117 IU hinter denen der Experimente in Abb. 4.72 und 4.74 weit zurück. Das zeigt, dass es auch bei Chips des gleichen Funktionalisierungsvorgangs zu größeren Unterschieden kommen kann. Darauf folgend wurden neun ConA 100 µg/ml-Injektionen vorgenommen. Die OSD belief sich dann auf 18137 IU. Die Dissoziationsphase war zum Zeitpunkt der aMP-Injektion noch nicht abgeschlossen, so dass die OSD sich vermutlich weiter verringert hätte. aMP-Injektion führt zu einer Regeneration von 64,5 %. Die massive ConA-Immobilisierung hat vermutlich dazu geführt, dass es Bereiche auf der OF gibt, in denen ConA so dicht gebunden hat, dass keine Regeneration möglich ist. Dies kann u.U. dadurch geschehen, dass aMP nicht in die Nähe der ConA-Bindestellen geraten konnte oder in dem ConA bei entsprechend homogener Anordnung eine Kristallstruktur bildet. Die verminderte Regeneration in diesem Experiment gegenüber den vorhergehenden Experimenten legt das nahe.

### **5.5.3.5 Regeneration der Mannan III-OF mit aMP und TritonX 100**

Nachdem die Ergebnisse der Tests auf Chips, die gemäß Protokoll Mannan III funktionalisiert worden waren, so gut ausgefallen sind, wurde nochmals an zwei Beispielen die Regeneration des Gesamt-

konstrukts aus ConA-SAv/bAK/Analyt getestet. Zum einen wurde wieder eine aMP-Lösung verwendet und zum anderen eine TritonX 100-Lösung. In den Kapiteln zuvor fiel die Regeneration der OF mit aMP sehr gering aus, wenn zuvor das Gesamtkonstrukt immobilisiert worden war. In Kapitel 5.1.3.1 wurde TritonX 100 im Rahmen der Experimente mit mannanfunktionalisierten OTS-OF getestet. Die Ergebnisse sind so interpretiert worden, dass TritonX 100 nicht nur das Gesamtkonstrukt sondern auch den Blockierer und die Mannoproteine von der OF entfernt hat. Es konnte deshalb nicht festgestellt werden, ob TritonX 100 auch den gewünschten Effekt hatte: das ConA-SAv/bAK/Analyt-Konstrukt vom Mannan zu lösen. Die Mannanfunktionalisierung gemäß Protokoll Mannan III setzt gegenüber Protokoll Mannan IV aber wieder auf kovalente Bindung von Mannan an die Glasoberfläche. Deshalb sollte nun getestet werden, ob TritonX 100 in der Lage ist, das Konstrukt von der OF zu entfernen, ohne die Mannan-OF zu beeinträchtigen. Der Test auf Präsenz von Mannan auf der OF mit ConA und Regeneration mit aMP fiel positiv aus. Auch die Komponenten ConA-SAv, bAK und Analyt konnten problemlos immobilisiert werden. Die Regeneration mit aMP fiel mit 15,8% erwartungsgemäß wieder sehr gering aus. Die Regeneration mit TritonX 100 dagegen gelang mit 83,2%, so dass sich die Regeneration mit der vorherigen aMP-Wirkung insgesamt auf 85,9% belief. Die anschließende ConA-Injektion lieferte ein Bindungssignal, das in seiner Stärke dem gleich, welches bei der zweiten ConA-Injektion im Rahmen des Tests auf Mannan-Präsenz gemessen worden war. Auch die folgende aMP-Injektion verlief erfolgreich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die TritonX 100-Injektion 1. das Konstrukt ConA-SAv effektiv von der OF entfernen kann und 2. die Mannan-OF davon nicht beeinträchtigt wird. In Punkt zwei unterscheidet sich die OF nach Protokoll Mannan III von der OF gemäß Protokoll Mannan IV (Mannan auf OTS-OF). Der Proof of Principle für eine regenerierbare Oberfläche ist demnach geglückt.

## 5.6 Mannan-Funktionalisierung von Mikrotiterplatten

Nachdem in Kapitel 4.3.1.3 festgestellt worden ist, dass sich Mannan durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisieren lässt, entwickelte sich die Idee Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit Mannan zu funktionalisieren. Wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt, erwies es sich als schwierig, die richtigen Bedingungen zur Immobilisierung und Regeneration von ConA-haltigen Fusionsproteinen auf Mannan zu eruieren. Mit Mannan funktionalisierte Mikrotiterplatten könnten hilfreich sein, um in einem einzigen Set von gleichzeitigen Experimenten mehrere Bedingungen, welche Immobilisierung und Regeneration betreffen, zu testen. Außerdem könnten so schnell und effektiv verschiedene Varianten von ConA-haltigen Fusionsproteinen parallel getestet werden. Im Zuge dieser Arbeiten wurde ein Protokoll erarbeitet, mit welchem Mikrotiterplatten funktionalisiert werden können. Die Tests erfolgten mit ConA. Schließlich wurden einige beispielhafte Experimente mit ConA-SAv durchgeführt, um den Wert der Methode zu verdeutlichen.

### 5.6.1 Immobilisierung von Mannan auf Polystyrol

Das Experiment wurde durchgeführt um Aufschluss über die Einsetzbarkeit der verfügbaren Materialien zu erhalten. Es zeigte sich, dass eine Mannan-Immobilisierung nicht ausreicht, um unspezifische Bindungen von AK-HRP zu unterdrücken. Es ist notwendig mit BSA zu blockieren, um den Hintergrund, den AK-HRP erzeugt, zu minimieren. Das steht im Widerspruch zu den Biosensorexperimenten. Bei Versuchen ohne BSA-Blockierung auf Chips, die nach Protokoll Mannan III funktionalisiert worden waren (Kapitel 4.3.1.4.3 und 4.3.1.4.5), zeigte sich, dass eine BSA-Blockierung nicht notwendig ist. Einerseits unterscheiden sich die Bedingungen darin, dass bei den Mikrotiterplatten-Experimenten Mannan adsorptiv immobilisiert worden ist, während bei dem erwähnten Biosensorexperimenten die Funktionalisierung mittels kovalenter Kopplungschemie stattfand. Andererseits finden Biosensorexperimente im Fluss statt, während bei den Mikrotiterplatten-Experimenten nur ein Rüttler zum Einsatz kam.

Außerdem wurde festgestellt, dass die Farbreaktion am stärksten war, wenn ConA auf eine mannanfunktionalisierte und BSA-blockierte OF gegeben wird. Das Ergebnis wurde als Bestätigung interpretiert, dass sich Mannan auf der OF befand. Die Mannanfunktionalisierung von Mikrotiterplatten ist demnach möglich. Wie das darauf folgende Experimenten zur Pufferabhängigkeit der Mannan-Immobilisierung zeigte ist es irrelevant, ob in Borat-Puffer pH 10, PBS pH 7,3, ddH<sub>2</sub>O oder HEPES pH 6,6 gearbeitet wird. Die Immobilisierung in ddH<sub>2</sub>O erscheint angesichts der Resultate am sinnvollsten, da sie mit minimalem Aufwand möglich ist. Bei Versuchen mit unterschiedlicher Mannan-Konzentration konnte in je vier Experimenten kein wesentlicher Unterschied in den OD<sub>MWS</sub> festgestellt werden, so dass im Folgenden stets mit einer Konzentration von 1 mg/ml Mannan in ddH<sub>2</sub>O gearbeitet worden ist. Bezüglich der Inkubationszeit, die für die ConA-Immobilisierung in Mikrotiterplatten notwendig ist, konnte gezeigt werden, dass es für das Resultat keine wesentliche Rolle spielt, ob länger als 30 min inkubiert wird. Angesichts der Zeitersparnis erschien es sinnvoll, im Folgenden 30 min zu inkubieren. Im Hinblick auf die BSA-Blockierung wurde gefunden, dass es bei Konzentrationen bis zu 100 µg/ml BSA zu einem relativ hohen Hintergrundsignal kommt. Erst ab einer BSA-Konzentration von 250 µg/ml wurde die unspezifische AK-HRP-Bindung an Polystyrol minimal (Abb. 4.84). Im Folgenden wurde daher mit 200 µl BSA einer Konzentration von 250 µg/ml blockiert. Durch Experimente mit unterschiedlichen ConA-Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass ab einer ConA-Konzentration von 100 µg/ml keine höheren Signale erzielt werden können (Abb. 4.84).

Eine wichtige Frage ist, inwiefern sich der Puffer und der pH-Wert auf die Immobilisierung von ConA auswirken. Experimente mit ConA einer Konzentration von 50 µg/ml in verschiedenen Puffern lieferten Resultate, die sich signifikant unterschieden. Bei dieser Konzentration konnte mit HEPES pH 6,8 und PBS pH 7,3 die größte Farbstoff-Entwicklung festgestellt werden. Offenbar hat der Puffer selbst

wenig Auswirkungen auf die Immobilisierbarkeit von ConA, da die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Immobilisierungen in HEPES pH 6,8 und PBS pH 7,3 nicht signifikant sind. Andererseits fallen die  $OD_{MWS}$  im Falle von PBS pH 6 und PBS pH 8 signifikant kleiner aus als bei HEPES pH 6,8 und PBS pH 7,3. Daraus lässt sich schließen, dass der pH-Wert für das Immobilisierungsergebnis der kritische Faktor ist und nicht die Art des Puffers. Im Fall von ConA 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sind die Unterschiede nicht signifikant. Die Immobilisierung von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ConA in den vier Puffersystemen führt zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie für die ConA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS pH 7,3 und HEPES pH 6,8 erzielt worden sind. Die vierfach höhere Konzentration führt also unter den Pufferbedingungen PBS pH 6 und HEPES pH 8 im gleichen Zeitraum von 1 h zu einer vergleichbaren OF-Belegung mit ConA wie es für eine ConA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS pH 7,3 und HEPES pH 6,8 der Fall ist. Das deutet darauf hin, dass pH-Werte um pH 7 eine schnellere Assoziation begünstigen bzw. eine schnelle Dissoziation hemmen. Die vierfach höhere Konzentration erhöht die Wahrscheinlichkeit von Bindungsergebnissen derart, dass die langsamere Assoziation bei pH-Werten von 6 und 8 kompensiert wird. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine OF, die mit dem Fusionsprotein ConA-SAv belegt worden ist, in Puffern bei pH 6 bzw. pH 8 in Verbindung mit bAK und Analyt eventuell leichter regenerierbar ist, da die Dissoziation unter diesen Bedingungen begünstigt sein könnte. Dies gilt jedoch nur, wenn die ConA-SAv-Bindungseigenschaften gegenüber Mannan durch die Bindung des biotinylierten AKs verändert werden. Wenn der Grund für das Fehlschlagen der Regeneration die Quervernetzung von ConA-SAv-Einheiten durch mehrfach biotinylierte Antikörper ist, würde diese Maßnahme nicht greifen.

Die Regenerationsexperimente (Kapitel 4.3.2.1.8) bestätigen die RfS-Daten insofern, dass aMP einen deutlichen regenerierenden Effekt hat. Nicht bestätigt wird dagegen der RfS-Befund, dass sich die Proteine durch 2% SDS von der OF entfernen lassen. Vermutlich ist in diesem Mikrotiterplatten-Experiment im Fall von SDS ein Fehler unterlaufen, der unbemerkt blieb. Das gleiche könnte für 70% Ethanol gelten, was als wahrscheinlich gilt, da die Wells, die für Ethanol vorgesehen waren direkt neben denen lagen, in die SDS pipettiert worden ist.

Für die ANOVA mussten die Daten für SDS, Ethanol und die Kontrolle (ohne Regeneration) ausgeschlossen werden, da ansonsten keine Varianzhomogenität vorlag. Ein Tukey-Test zeigte, dass bei allen paarweisen Vergleichen signifikante Unterschiede festzustellen sind. Da hier aber nur eine Auswahl aller Daten verwendet wurde, empfiehlt es sich den Sidak-Test anzuwenden, der bei solchen Untergruppen eine größere Teststärke besitzt. Wenn dieser Test angewendet wird, zeigt sich, dass der Effekt von 10% aMP gegenüber 1% HCl zu keinem signifikant verschiedenen Ergebnis führt. Allerdings deuten die Ergebnisse des Kapitels 4.3.1.3 (Diskussion in Kapitel 5.3.1.3) darauf hin, dass HCl zu einem Verlust von Mannan führt. Das wurde an dieser Stelle nicht untersucht. EDTA mit aMP ergab keine signifikante Verbesserung des Regenerationsergebnisses. EDTA ist ein Chelator, der zweiwertige Ionen sehr stabil bindet. Die Erwartung, dass er die Bindung von ConA an Mannan löst oder

schwächt, indem er ihm die Ionen ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) entzieht, wird demzufolge enttäuscht. Die Vorstellung basierte auf der Vermutung, dass sich das Protein bei Verlust der Ionen entfaltet. Tatsächlich geht aus der ConA-Literatur hervor, dass ConA in Abwesenheit der Ionen teilweise entfaltet vorliegt und spricht dann von der „unlocked“-Konformation. Aber auch ohne Metallionen liegen 10% des ConA in der „locked“-Konformation vor. In Anwesenheit von Mannose verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen „locked“- und „unlocked“-Konformation in die Richtung der „locked“-Konformation. Mannose hat also einen „locked“-Konformation-stabilisierenden Effekt. Der Zusatz von EDTA zu aMP könnte also wirkungslos geblieben sein, weil zum einen das aMP der Wirkung von EDTA entgegenwirkt und zum anderen dies auch von der Bindung von Mannan an ConA erwartet werden kann. Deshalb erscheint auch der Einsatz von EDTA ohne aMP für Regenerationszwecke wenig erfolgversprechend.

Alle anderen in den statistischen Vergleich eingeschlossenen Reagenzien erwiesen sich aMP gegenüber als überlegen. Besonders die beiden chaotropen Substanzen Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff erwiesen sich in der verwendeten Konzentration als effektiv. Die Effektivität von Harnstoff ist signifikant größer als die von Guanidiniumhydrochlorid, wobei der Unterschied sehr klein ausfällt. Guanidiniumhydrochlorid im Vergleich mit Guanidiniumhydrochlorid plus aMP führt zu keinen signifikanten Unterschieden. Angesichts der denaturierenden Wirkung von Guanidiniumhydrochlorid entwickelt aMP keine weitere Wirksamkeit. Anders fällt der Vergleich von Harnstoff und Harnstoff plus aMP aus. Im letzteren Fall ist die Regenerationwirkung größer. Hier liegt ein signifikanter Unterschied vor, so dass ein anderer Wirkmechanismus wahrscheinlich ist. Welcher Mechanismus das sein könnte, ist unbekannt. Dem Harnstoff überlegen ist nur noch NaOH. Wie die RfS-Experimente jedoch zeigen, die in Kapitel 4.3.1.3 präsentiert worden sind, ist anzunehmen, dass auch hier NaOH zum Verlust von Mannan führte. Am besten wird zum Zweck der Regeneration 10% aMP, 8 M Guanidiniumhydrochlorid oder 6 M Harnstoff (plus eventuell 10% aMP) verwendet. Da bekannt ist, dass im Falle von ConA-SAv/bAK die Regeneration mit aMP nicht erfolgreich ist, sollte zu diesem Zweck eines der beiden anderen Mittel verwendet werden.

### 5.6.2 Experimente mit ConA-SAv-FP

Mit dem erarbeiteten Setup wurden einige Experimente mit dem ConA-SAv-Fusionsprotein durchgeführt. Aus Zeit- und Materialmangel konnten die Experimente nicht sehr weit geführt werden. Daher haben die hier diskutierten Ergebnisse, auch wenn sie einige relevante Daten liefern, eher exemplarischen Charakter, um die Möglichkeiten des Setups zu demonstrieren.

Der Einfluss des Puffers auf die Immobilisierung von ConA-SAv wurde getestet sowie verschiedene Blockierungsreagenzien. Da die ConA-SAv-Aufreinigung im Zuge der Herstellung des Proteins die höchste Ausbeute liefert, wenn Glycerol im Puffer das Protein stabilisiert, wurde in die Untersuchung auch ein HEPES-Puffer mit 5,5% Glycerol (HEPES 2) einbezogen. Glycerol bindet an Proteine und er-

höht ihre Löslichkeit in wässrigen Puffern. Allerdings führt Glycerol bei Proteinen auch zu einer kompakteren Konformation (Vagenende et al., 2009). Andererseits erhöht es auch die Löslichkeit. Glycerol könnte demnach einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des ConA-SAv haben.

Die Untersuchung ergab, dass sich Tween und PEG unter keinen der getesteten Bedingungen als Blockierer eignen. Eine Kombination von PBS als Immobilisierungspuffer und BSA als Blockierer führte zu den besten Resultaten. Der Candor-Blockierer führte unter HEPES-Bedingungen gegenüber den PBS-Bedingungen zu einer Reduktion unspezifischer Bindungen. Im Fall von HEPES 2 (mit Glycerol) führte er sogar zu einem besseren Ergebnis als BSA in HEPES 2. Diese Kontroll-Experimente, deren Daten mittels hellgrauer Balken dargestellt werden, sind jedoch nicht sehr aussagekräftig, da sie jeweils nur einem Experiment entstammen. Glycerol scheint darüberhinaus dafür verantwortlich zu sein, dass die ODs in HEPES 2 geringer ausfallen (der Unterschied der ODs, die in den HEPES 3- und HEPES 2-Experimenten bei BSA-Blockierung auftraten, sind laut Sidak-Test signifikant). Auch die Unterschiede bei den Resultaten der PBS- und der HEPES 3-Experimente ist signifikant. HEPES 3 ohne Glycerol scheint offenbar die Bindung von ConA-SAv zu begünstigen. Das scheint anders zu sein als im Fall von ConA. In Kapitel 4.3.2.1.7 wurde gezeigt, dass ConA-Immobilisierung in HEPES 3 gegenüber PBS pH 7,3 zu keinen signifikant verschiedenen Daten führt. In dieser Hinsicht verhält sich ConA-SAv anders als ConA. Um eine effektive Immobilisierung mit möglichst geringem Hintergrund zu erreichen, scheint BSA als Blockierer und PBS als Puffer eine gute Wahl zu sein und wurde für alle folgenden Experimente verwendet.

Es wurde auch der Einfluss verschiedener Puffer und Blockierern auf die Regeneration mit aMP untersucht (Kapitel 4.3.2.2.2). Bei der statistischen Auswertung wurde ein Wert mittels eines Grubb's Test als Ausreißer erkannt. Der Wert wurde aber nicht verworfen, da solche Tests nicht unreflektiert zum Ausschluss von Daten führen dürfen. Der Grund, warum hier davon abgesehen wurde, ist, dass für den Grubb's Test die Daten normalverteilt sein müssen. Laut Kolmogorov-Smirnov- und Lilliefors-Test ( $\alpha=0,05$ ) sind die Daten zwar normalverteilt jedoch nicht Shapiro-Wilk zufolge. Shapiro-Wilk-Tests besitzen bei kleinem Stichprobenumfang (<50) eine wesentlich höhere Teststärke als der Kolmogorov-Smirnov- bzw. Lilliefors-Test. Es gibt demnach gute Gründe, dem Shapiro-Wilk-Test zu folgen. Dann aber ist der Grubb's Test nicht adäquat. Außerdem schien der Wert weder biologisch, noch methodisch oder chemisch nicht unmöglich zu sein. Der Ausschluss war demnach nicht zu rechtfertigen. In diesen Experimenten war bei erfolgreicher aMP-Regeneration eine stark verminderte OD zu erwarten. Durch aMP sollte ConA-SAv von der OF entfernt worden sein, so dass das HRP-Nachweissystem kein Substrat detektiert. Die Ergebnisse zeigen, dass nur unter PBS pH 7,3-Bedingungen und BSA-Blockierung eine aMP-Regeneration möglich ist. Das Kontrollexperiment (hellgrauer Balken) zeigt, dass durch aMP-Behandlung keine neuen unspezifischen Bindestellen eingeführt werden. Wenn es stimmt, wie im vorherigen Kapitel diskutiert, dass HEPES 3 die Assoziation

gegenüber HEPES 2 (mit 5,5% Glycerol) begünstigt, dann zeigt dieses Experiment, dass die aMP-Regeneration in HEPES 3 ebenfalls effektiver ist als in HEPES 2. Glycerol könnte demnach, durch seinen stabilisierenden bzw. kompaktierenden Effekt die Assoziation von ConA-SAv hemmen. Andererseits stabilisiert es aber auch an Mannan gebundenes ConA-SAv derart, dass die Regeneration mit aMP weniger effektiv ist. Aus diesem Grund sollte auf Glycerol in Puffern bei Arbeiten mit ConA-SAv verzichtet werden.

Im Rahmen der Kontrollexperimente im Hinblick auf einen „Proof of Principle“ wurde getestet, inwiefern die einzelnen Komponenten (ConA-SAv, BSA, bAK, Analyt, aAK-HRP) mit einander agieren, um falsch positive Resultate auszuschließen. Sind alle Komponenten anwesend, wird eine hohe OD von 0,729 gemessen. Fehlt der bAK, welcher den Kaninchen-Antikörper als Analyten bindet, kommt es zu einer sehr hohen aber signifikant verschiedenen OD von 0,647. Demnach bindet das Antikörper-HRP-Konjugat an eine der anderen Komponenten auf der OF. Fehlt auch der Analyt, befindet sich nur noch Mannan, BSA und ConA-SAv auf der OF. Die OSD sinkt dann auf 0,295. Das zeigt, dass der Analyt ohne bAK starke unspezifische Wechselwirkungen mit dem ConA-SAv, dem Mannan oder dem BSA eingeht. Es zeigt aber auch, dass eine deutliche Wechselwirkung von ConA-SAv, Mannan oder BSA einerseits und dem AK-HRP-Konjugat andererseits besteht. Wenn alle Komponenten fehlen und nur Mannan ohne BSA auf der OF vorhanden ist, trifft das AK-HRP-Konjugat auf keinen Partner mit dem es spezifisch oder unspezifisch interagieren könnte. Die OD ist dann mit 0,056 am geringsten. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion von Mannan oder BSA mit dem AK-HRP-Konjugat für die unspezifischen Signale verantwortlich ist, die bei fehlendem bAK und fehlendem Analyten und gleichzeitiger Präsenz von ConA-SAv festgestellt worden sind. Die oben genannte OD von 0,295 geht also im Wesentlichen auf eine Interaktion von ConA-SAv mit dem AK-HRP-Konjugat zurück. Wenn der Analyt bei gleichzeitigem Fehlen von ConA-SAv und bAK appliziert wird, fällt die OD mit 0,187 bei der Detektion durch das AK-HRP-Konjugat wieder höher aus (gegenüber der OD von 0,056). Das AK-HRP-Konjugat bindet spezifisch an den Analyten, jedoch nur sehr wenig an ein BSA-blockierte Mannan-OF. Das zeigt, dass eine gewisse unspezifische Bindung des Analyten an BSA existiert. Fehlt nur ConA-SAv und wurden bAK und Analyt inkubiert bevor mit AK-HRP detektiert wird, ergibt sich mit einer OD von 0,208 kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Experiment, in dem bAK und ConA-SAv fehlten. Demnach ändert die Applikation des bAK nichts an der festgestellten Präsenz des Analyten auf einer bAK und ConA-SAv-freien OF. Daraus kann man schließen, dass bAK nicht unspezifisch an die BSA-blockierte Mannan-OF bindet. Damit ist bekannt, dass weder ConA-HRP, bAK noch der Analyt in starke unspezifische Wechselwirkungen mit der BSA-blockierten Mannan-OF treten. D.h., dass die spezifische Bindung bei Präsenz aller Komponenten gegenüber der unspezifischen Bindung, die ohne ConA-SAv möglich sind, deutlich wird. Gleichzeitig ist festgestellt worden, dass der Analyt eine recht starke unspezifische Wechselwirkung mit ConA-SAv zeigt. Ob der

Analyt nun unspezifisch mit ConA-SAv oder spezifisch mit bAK interagiert, ist für den „Proof of Principle“ irrelevant, da die Bedingungen für eine Entfernung des Gesamtkomplexes untersucht werden. Zu diesem Zweck wird bAK auf der OF gebunden. Die bAK-Bindung an die OF wurde mittels der RiFS-Experimenten (in Kapitel 4.3.1.2, Abb. 6.67 C; Kapitel 4.3.1.3, Abb. 4.70; Kapitel 4.3.1.4.5, Abb. 4.78) nachgewiesen. So kann davon ausgegangen werden, dass das Setup für einen „Proof of Principle“ geeignet ist. Dieses Experiment stellt für die RiFS-Experimente einen wichtigen Kontrollversuch dar, weil er zeigt, dass eine Wechselwirkung von bAK bzw. Analyt mit der BSA-blockierten Mannan-OF von geringer Bedeutung ist.

Für den folgenden „Proof of Principle“ (Kapitel 4.3.2.2.4) wurde aMP als Regenerationsmittel-Referenz verwendet und mit der Wirkung der Regenerationslösungen verglichen, welche sich in Kapitel 4.3.2.1.8 als am effektivsten im Zusammenhang mit ConA-Experimenten erwiesen hatten: 6 M Guanidinhydrochlorid, 6 M Guanidinhydrochlorid+10% aMP, 8 M Harnstoff, 8 M Harnstoff+10% aMP. Außerdem wurde zum Vergleich ein Kontrollexperiment ohne jede Regeneration durchgeführt.

Wie schon in den RiFS-Experimenten konnte mit aMP allein keine Regeneration erreicht werden, wenn ConA-SAv, bAK und Analyt gemeinsam vorlagen. Die aMP-Applikation führt gegenüber der Kontrolle zu keinem signifikanten Unterschied. Auch Harnstoff und ein Harnstoff-aMP-Mix erwiesen sich als ungeeignet (kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle). Lediglich die Regeneration mit Guanidinhydrochlorid-Lösungen führte zu einer Regeneration, wobei der Zusatz von aMP keine signifikante Veränderung bewirkte. Das Ergebnis ist ernüchternd, da selbst mit Guanidinhydrochlorid nur eine Regeneration von 64,6% erreicht werden konnte. TritonX 100 bleibt demnach, wie die RiFS-Experimente zeigten, die beste Lösung.

Im letzten Experiment wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, um zu untersuchen, ob verschiedene Antikörper unterschiedliche Wirkungen bei der Regeneration hervorrufen können. Dazu wurde für die beiden Antikörper aLeg und baLeg wieder ein Satz Experimente auf BSA-blockierten Mannan-OF mit und ohne Regeneration unternommen. Diese Messungen dienen der Referenz für die Regenerationsexperimente. Der Antikörper baLeg ist die biotinylierte Version von aLeg. Auf diese Weise sollte die Auswirkung von Biotin bzw. die unspezifische Interaktion von ConA-SAv und Antikörper festgestellt werden. Die Regeneration wurde mit 10% aMP als Regenerations-Referenz durchgeführt. Der Wert dient dem Vergleich mit der Regenerationslösung 10% aMP+6 M Guanidinhydrochlorid. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde die unspezifische Bindung des Antikörpers an die BSA-blockierte Mannan-OF getestet, um mögliche falsch positive Resultate zu erkennen. Auf einen Analyten wurde hier verzichtet, da die Regenerationsschwierigkeiten offenbar vom Antikörper abhängen, der auf ConA-SAv folgt und nicht vom Analyten.

## 5 | DISKUSSION

Die Anwesenheit des nichtbiotinylierten Antikörpers aLeg hat in der Negativ-Kontrolle ohne ConA-SAv-Immobilisierung zu einer OD von 0,058 geführt. Die Positiv-Kontrolle (FP/aLeg) mit einer OD von 0,315 ist davon signifikant verschieden. Das bedeutet, dass es zu einer deutlichen unspezifischen Interaktion zwischen nichtbiotinylierten Antikörpern (hier: aLeg) und ConA-SAv kommen kann. Darüber hinaus zeigt die Tatsache, dass die OD nach aMP-Behandlung (FP/aLeg/aMP) gegenüber der Positivkontrolle (FP/aLeg) nicht signifikant reduziert ist, dass unspezifische Bindungen nicht-biotinylierter Antikörper die aMP-Regeneration verhindern können. Es ist demnach nicht allein auf die Bindung des Biotins zurückzuführen, dass die Regeneration fehlschlägt. In diesem Experiment führt nicht mal die Regeneration mit dem aMP-Guanidinhydrochlorid gegenüber der Positiv-Kontrolle (mit ConA-SAv (FP); ohne Regeneration) zu einer signifikanten Veränderung in der OD.

In den Experimenten mit dem biotinylierten aLeg wurde eine vergleichbare OD für die Negativ-Kontrolle (ohne ConA-SAv (FP); ohne Regeneration) gemessen. Hier fällt jedoch die Positiv-Kontrolle wesentlich höher aus, so dass hier von einer spezifischen Bindung des AK via Biotin gesprochen werden kann. Allerdings ist der Anteil der unspezifischen Bindung von bAK an ConA-SAv durch den Versuch mit dem gleichen aber nicht-biotinylierten AK bekannt. Der Anteil, der für FP/aLeg ermittelt worden ist, beträgt 49,9% der OD (Abb. 4.92 A), welche für FP/baLeg (Abb. 4.92 B) gemessen worden ist. Auch im Fall von baLeg kommt es zu keiner signifikanten Regenerationswirkung mit aMP. Mit dem aMP-Guanidinhydrochlorid-Mix wurde jedoch eine gegenüber aMP signifikante OD-Reduktion erreicht. Zur Erinnerung: im Fall der unspezifischen Bindung des nicht-biotinylierten aLeg-AK an ConA-SAv konnte weder mit aMP noch mit dem aMP-Guanidinhydrochlorid eine Regeneration erreicht werden. Im Fall des baLeg war mit aMP auch keine Regeneration möglich. Mit dem aMP-Guanidinhydrochlorid-Mix dagegen belief sich die Regeneration auf 63,9%. Das es nur im Zusammenhang mit Guanidinhydrochlorid und biotinylierten aLeg-AKs zu einer Regeneration kommt, legt nahe, dass die Wirkung des Guanidinhydrochlorid etwas mit dem biotinylierten AK zu tun hat. Angesichts der Tatsache, dass der Regenerationserfolg von 63,9% dem prozentualen Anteil der unspezifischen Bindung des nicht-biotinylierten aLeg-AKs von 49,9% sehr nahe kommt, entsteht der Verdacht, dass die Phänomene durch folgendes Szenario erklärt werden können: bAKs binden spezifisch via Biotin und/oder unspezifisch an ConA-SAv. Der ConA-SAv-Anteil auf der OF, der bAK via Biotin bindet, lässt sich nicht mit aMP aber mit Guanidinhydrochlorid von der Mannan-OF entfernen, während der ConA-Anteil, an welchen bAK unspezifisch gebunden hat, fest am Mannan gebunden. Es lässt sich also das Fazit ziehen, dass im Zusammenhang mit ConA-SAv nur biotinylierte Antikörper verwendet werden können, deren unbiotinylierte Variante nicht unspezifisch an ConA-SAv bindet. Andernfalls wird die Regeneration derart gehemmt, dass das System nur eingeschränkt nutzbar ist.

## 6. Zusammenfassung

### Einleitung

Verlässliche und effiziente Methoden der Legionellen-Detektion sind für den Bereich der Hygiene in öffentlichen Gebäuden überaus wichtig. Die Legionellose ist eine der häufigsten Todesursachen infolge von nosokomial erworbenen Infektionen. Die etablierten Legionellentests liefern erst nach 3-7 Tagen Ergebnisse. Eine schnellere Methode wird dringend gebraucht. Beispielsweise werden Biosensoren in vielen Bereichen der Analytik eingesetzt. Allerdings lässt sich auf den entsprechenden Sensorchips nur jeweils ein Experiment durchführen. Diese Einschränkung kostet Material und Geld.

### Ziel

Es sollte am Beispiel des klinisch relevanten Bakteriums *Legionella pneumophila* die Einsetzbarkeit der RfS-Plattform BIAffinity® von Analytik Jena für die Ganzzellbiosensorik untersucht werden. Angestrebt wurde eine Senkung der Detektionsgrenze unter diejenigen, die bisher mittels SPR erzielt worden sind ( $10^5$ - $10^7$  CFC/ml). Im Erfolgsfall sollte ein Legionellen-Assay entwickelt werden. Außerdem sollte eine Technik zur Funktionalisierung von Oberflächen mit Mannan auf die BIAffinity-Glaschips übertragen werden und auf derartigen Oberflächen (OF) die Funktionsfähigkeit des Concanavalin A-Streptavidin-Fusionsproteins (ConA-SAv) nachgewiesen werden. ConA-SAv sollte dann als Linkerprotein zwischen biotinylierten Antikörpern (bAK) und einem Analyten einerseits und der Mannan-OF andererseits etabliert werden. Die Mannan-OF mit gebundenem ConA-SAv/bAK/Analyt-Konstrukt sollte mit geeigneten Regenerationsmitteln regenerierbar sein.

### Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Technik der Octadecyltrimethoxysilan (OTS)-Funktionalisierung von Glas-OF erfolgreich auf BIAffinity-Glaschips übertragen und durch die Verwendung von trockenem Toluol die Reproduzierbarkeit verbessert. Erstmals wurde gezeigt, dass sich ganze Zellen mittels RfS unter Verwendung eines Flusssystems sowohl im Sandwich Assay Format (SAF) als auch im Direct Assay Format (DAF) nachweisen lassen. Die Anwesenheit von ganzen Zellen auf der OF wurde mittels REM nachgewiesen. Im SAF konnten untere Nachweisgrenzen zwischen  $1,5 \cdot 10^7$  und  $8,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml sowohl im Fall der Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase (DP) als auch im Fall der Verwendung der Steigungen ermittelt werden. Im DAF lag die untere Nachweisgrenze im besten Fall zwischen  $1,5 \cdot 10^6$  und  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Sensorsignal am Ende der DP) bzw.  $1,5 \cdot 10^7$  und  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Steigungen). Durch die Applikation von dAKs konnte keine Verringerung der unteren Nachweisgrenze erreicht werden. Mit Protokoll Mannan III und Mannan IV konnten

BIAffinity-Glaschips erfolgreich mit Mannan funktionalisiert werden. Mit derartigen OF konnte die Funktionsfähigkeit des ConA-SAv durch seine Bindung an und Entfernung von der OF mittels  $\alpha$ -Methylmannopyranosid (aMP) nachgewiesen werden. Auf ConA-SAv-ausgestattete Mannan-OF konnten erfolgreich bAKs und Analyten gebunden werden. Die Regeneration durch aMP bei Anwesenheit von bAKs und Analyten schlug allerdings fehl. Auf OF nach Protokoll IV führte die Anwendung der Regenerationslösungen Tween20, HCl, NaOH und TritonX 100 zu erheblichen Beeinträchtigungen der Mannan-OF. Im Fall von Mannan-OF nach Protokoll III gelang die Regeneration ohne Beeinträchtigung mittels 0,1% TritonX 100. Außerdem wurde ein Protokoll zur Funktionalisierung von Mikrotiterplatten-Wells mit Mannan erarbeitet.

### **Diskussion**

Die RfS erweist sich für Ganzzell-Anwendungen der SPR als nicht überlegen (Ivnitzky et al., 2000). Auch die angestrebte untere Nachweisgrenze von mindestens 10000 Zellen/100 ml wurde nicht erreicht. Eine Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern oder eine Anreicherung der Zellen durch Filtration erscheint daher als unabdingbar. Eine Quantifizierung der Zellen erweist sich als schwierig, weil die Sensorsignale am Ende der Dissoziationsphase nicht zuverlässig mit den Zellkonzentrationen korrelierten. Der Grund ist offenbar, dass die Zellen auf der OF keine im physikalischen Sinne wohl definierte Schicht bilden. Durch REM konnten große leere Bereiche auf einer OF festgestellt werden und häufige Überlappungen der Zellen. Die Korrelation zwischen der Steigung in der Anfangsphase der Bindung und der Konzentration ist offenbar zuverlässiger, da Überlappungen etc. in der Anfangsphase keine große Rolle spielen. Legionellen erwiesen sich als sehr „launische“ Organismen, die unter verschiedenen Kulturbedingungen unterschiedliche Verhaltensweisen generieren. Das betrifft besonders die Antigenpräsentation und die Größe der Zellen. Die erfolgreiche Mannanfunktionalisierung von BIAffinity-Glaschips gelingt offenbar nur unter Verwendung von trockenem Toluol und einem Hitzeschritt bei 220°C. Leider sind die Ergebnisse auf diesen Oberflächen nicht gut reproduzierbar. Der Grund dafür ist unklar. Das Fehlschlagen der Regenerationsfähigkeit mit aMP nach Applikation von ConA-SAv, bAK und Analyten steht der intendierten mehrmaligen Anwendung solcher OF entgegen. Bei einem aMP-Regenerationsversuch mit einem biotinylierten und dem gleichen aber nichtbiotinylierten AK im entwickelten Mikrotiterplatten-Setup konnte gezeigt werden, dass auch im Falle des nichtbiotinylierten AKs die aMP-Regeneration fehlschlägt. Das zeigt, dass ConA-SAv ein ausgeprägtes Potential haben könnte, unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Komponenten (hier dem nichtbiotinylierten AK) einzugehen. Das scheint beim Fehlschlagen der aMP-Regeneration eine entscheidende Rolle zu spielen. Es sollte demnach nur mit bAKs gearbeitet werden, deren nichtbiotinylierte Form keine unspezifischen Wechselwirkungen mit ConA-SAv zeigen.

## 5. Summary

### Introduction

Reliable and efficient methods for the detection of *Legionella pneumophila* germs are of utmost importance for maintenance of hygienic standards in public buildings. Legionellosis is one of the most frequent causes of death as a result of nosocomial infections. Established tests for *Legionella* yield reliable results within 3 to 7 days at the earliest. Faster methods are urgently required. Biosensors are an often used tool in a wide range of analytics. However, only one experiment can be conducted on one appropriate sensor-chip, a limitation that is costly in material and money.

### Aims

The aim of the study was to test the applicability of the RfS-platform BIAffinity® by Analytik Jena for detection purposes in the field of whole cell biosensorics using the example of the clinically relevant germ *L. pneumophila*. The aim was a reduction of the detection limit to a level beyond the detection limits achieved by using SPR ( $10^5$ - $10^7$  CFC/ml). In the case of success an assay for the detection of *Legionella* cells was to be developed. Moreover, the aim was to transfer a method for the functionalization of surfaces with mannan to chips used in the BIAffinity®. On such surfaces the functionality of a recombinant Concanavalin A-Streptavidin-fusionprotein (ConA-SAv) was to be proven. Subsequently, ConA-SAv was to be established as a linker protein between the mannan surface and biotinylated antibodies (bAK). A surface equipped with an ConA-SAv/bAK/analyte-construct should be regenerative on application of appropriate solutions for regeneration.

### Results

In this study a method for functionalization of surfaces using octamethyltrimethoxysilane (OTS) was successfully applied on glass chips used in the BIAffinity. The reproducibility of the results was improved by using dry toluene. For the first time it was shown that whole cells are detectable with a RfS-biosensor equipped with a microfluidic cartridge using both a sandwich-assay-format (SAF) and a direct-assay-format. The presence of whole cells on the surface was ascertained by REM. In the case of the SAF the lower detection limit amounted to  $1,5 \cdot 10^7$  -  $8,25 \cdot 10^7$  cells/ml using both the net-signals at the end of the dissociation phase and the slopes of the binding curves. Using the DAF the lower detection limit amounted to  $1,5 \cdot 10^6$  -  $1,5 \cdot 10^7$  cells/ml (net signals at the end of the dissociation phase) and  $1,5 \cdot 10^7$  -  $1,5 \cdot 10^8$  cells/ml (slopes), respectively. On application of detection antibodies no further reduction of the detection limit was achieved. Application of the protocols Mannan III and Mannan IV BIAffinity glass chips were successfully functionalized with mannan. Using such surfaces the functionality of the ConA-SAv was proven by showing its binding to mannan and its removal from the surface using methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (aMP). On surfaces equipped with

ConA-SAv biotinylated antibodies and analytes were successfully immobilized. Unfortunately, the removal of the construct failed when bAKs and analytes were present on the surface. Surfaces functionalized according protocol Mannan IV were severely impaired upon usage of Tween20, HCl, NaOH und TritonX 100. In the case of the functionalization of the surfaces using protocol Mannan III the regeneration was successful without impairment upon application of TritonX 100. Moreover, a protocol for the functionalization of the wells of microtiter plates was successfully established.

### **Discussion**

According to this study the RfS method was not shown to be superior to the SPR method in whole cell detection (Ivnitzky et al., 2000). The intended lower detection limit of at least 10000 cells/100 ml was not be achieved. A pre-incubation of cells with antibodies or an enrichment by filtration seems to be inevitable. A quantification of cells turned out to be problematic because the cell concentrations did not reliably correlate with the net signals at the end of the dissociation phase. The reason may be that the cells on the surface do not form a well-defined layer in the physical sense. Using REM a lot of cell-free areas were found on the surface as well as many overlappings of individual cells. The correlation of cell concentrations and the slopes in the initial binding phase seem to be more reliable since overlappings do not impinge on the signal development at the beginning of the experiment. Legionella proved to be a very “fickle“ organism because it behaves differently under different culture conditions concerning the antigene presentation and the size of the cells.

The functionalization of the surfaces apparently succeeds only upon usage of dry toluene and in combination with a heat step at 220°C. Unfortunately, the results obtained on such surfaces are not well reproducible. The failure of the regeneration when the whole ConA-SAv/ bAK/analyte is present on the surface is a severe obstacle for the intended repeated use of the surfaces. An aMP-regeneration experiment in mannan-functionalized microtiter plate wells with a biotinylated and a not biotinylated but otherwise identical antibody showed that the regeneration failed in both cases. This shows that ConA-SAv may have a distinctive potential for unspecific binding with other biomolecules (here: not biotinylated antibodies). In this light this seems to be of crucial importance for the failure of the aMP-regeneration. It is recommended to test not biotinylated antibodies for unspecific binding towards ConA-SAv before usage.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Akkoyun, A. & Bilitewski, U. Optimisation of glass surfaces for optical immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **17**, 655–64 (2002).
2. Albers, U. *et al.* Expression of *Legionella pneumophila* paralogue lipid A biosynthesis genes under different growth conditions. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 3817–29 (2007).
3. Avramescu, A. *et al.* Biosensors designed for environmental and food quality control based on screen-printed graphite electrodes with different configurations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **374**, 25–32 (2002).
4. Barker, J., Lambert, P. a & Brown, M. R. Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **61**, 3503–10 (1993).
5. Barlen, B., Mazumdar, S. D. & Keusgen, M. Immobilisation of biomolecules for biosensors. *Physica Status Solidi (a)* **206**, 409–416 (2009).
6. Baselt, R. & Cravey, R. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. (Chemical Toxicology Institute, 1995).
7. Batteiger, B., Newhall, W. J. & Jones, R. B. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *Journal of Immunological Methods* **55**, 297–307 (1982).
8. Beattie, G. M. *et al.* Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. *Diabetes* **48**, 1013–9 (1999).
9. Behling, G. *Legionellenproblematik im Trinkwasser Vorkommen, Infektion, Gefahrenpotenzial, Prävention und Sanierung*. FLUGS Fachinformationsdienst **1947**, 1–9 (2004).
10. Beyer, D., Knoll, W., Ringsdorf, H., Elender, G. & Sackmann, E. Covalently attached polymer mono- and multilayers on silanized glass substrates. *Thin Solid Films* **284-285**, 825–828 (1996).
11. Bolshakova, A. V *et al.* Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* **86**, 121–8 (2001).
12. Bretscher, M. & Munro, S. Cholesterol and the golgi apparatus. *Science* **261**, 1280–1281 (1993).
13. Brindle, R. J., Bryant, T. N. & Draper, P. W. Taxonomic investigation of *Legionella pneumophila* using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 536–539 (1989).
14. Brooks, S. L., Ashby, R. E., Turner, A. P. F., Calder, M. R. & Clarke, D. J. Development of an online glucose sensor for fermentation monitoring. *Biosensors* **3**, 45–56 (1987).
15. Brown, R. D., Koenig, S. H. & Brewer, C. F. Conformational equilibrium of demetalized Concanavalin A. *Biochemistry* **21**, 465–9 (1982).

## 7 | LITERATURVERZEICHNIS

16. Brzoska, J. B., Azouz, I. Ben & Rondelez, F. Silanization of solid substrates: A step toward reproducibility. *Langmuir* **10**, 4367–4373 (1994).
17. Butler, J. E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods (San Diego, Calif.)* **22**, 4–23 (2000).
18. Butler, J. E. *et al.* The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *Journal of Immunological Methods* **150**, 77–90 (1992).
19. Carratalà, J. & Garcia-Vidal, C. An Update on *Legionella*. *Current Opinion in Infectious Diseases* **23**, 152–157 (2010).
20. Catrenich, C. E. & Johnson, W. Virulence conversion of *Legionella pneumophila*: a one-way phenomenon. *Infection and Immunity* **56**, 3121–5 (1988).
21. Cazalet, C. *et al.* Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Research* **18**, 431–41 (2008).
22. Chart, H., Smith, H. R., La Ragione, R. M. & Woodward, M. J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 1048–58 (2000).
23. Chrispeels, M. J., Hartl, P. M., Arndt, S. & Faye, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10021–10024 (1986).
24. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* **102**, 29–45 (1962).
25. Coers, J. *et al.* Identification of lcm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Molecular Microbiology* **38**, 719–736 (2000).
26. Cooper, M. a. Optical biosensors in drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* **1**, 515–28 (2002).
27. Costerton, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* **41**, 435–64 (1987).
28. Costerton, J. W. *The Biofilm Primer*. (Springer Verlag, 2007). at <http://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=MbtCOHwAilQC&pgis=1>
29. Cras, J., Rowe-Taitt, C., Nivens, D. & Ligler, F. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 683–688 (1999).
30. Cremer, P., Nagel, D., Böttcher, B. & Seidel, D. Fibrinogen: Ein koronarer Risikofaktor. *Diagnose & Labor* **42**, 28–35 (1992).
31. Cummings, R. D. & Doering, T. L. in *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R., JD, E. & Al., E.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>

32. D’Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clinica Chimica* **412**, 1749–61 (2011).
33. Datta, S., Barlen, B., Kämpfer, P. & Keusgen, M. Biosensors and Bioelectronics Surface plasmon resonance ( SPR ) as a rapid tool for serotyping of *Salmonella*. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 967–971 (2010).
34. DeChancie, J. & Houk, K. N. The Origins of femtomolar protein–ligand binding: Hydrogen bond cooperativity and desolvation energetics in the Biotin–(Strept)Avidin binding site. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 5419–5429 (2007).
35. Delanghe, J. R., De Buyzere, M. L., de Scheerder, I. K., Faust, U. & Wieme, R. J. Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *Clinical Biochemistry* **22**, 115–119 (1989).
36. Dewaele, C., Mussche, P. & Verzele, M. Endcapping of high performance liquid chromatography packings derived from silica gel. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **5**, 6–10 (1982).
37. Diamandis, E. P. & Christopoulos, T. K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* **37**, 625–36 (1991).
38. Diaz-Maurino, T., Blanco, R. & Albert, A. Fibrinogen and fibrin interaction with Concanavalin A dimer and its influence on coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **799**, 45–50 (1984).
39. Dixon, H. B. F. Defining a lectin. *Nature* **292**, 192 (1981).
40. Domagala, T. *et al.* Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* **18**, 11–29 (2000).
41. Dorer, M. S., Kirton, D., Bader, J. S. & Isberg, R. R. RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathogens* **2**, e34 (2006).
42. Doyle, R. J., Nedjat-Haiem, F., Miller, R. D. & Keller, K. F. Interaction between plant agglutinins and *Legionella* specie. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 973–975 (1982).
43. Durst, F. *Grundlagen der Strömungsmechanik*. (Springer, 2006).
44. DVGW Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V. Technisch-wissenschaftlicher Verein. *Arbeitsblatt W 551 -Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen, Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen*. (2004).
45. Edelstein, P. H. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 697–699 (1982).
46. Edelstein, P. H., Snitzer, J. B. & Finegold, S. M. Isolation of *Legionella pneumophila* from hospital potable water specimens: comparison of direct plating with guinea pig inoculation. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 1092–1096 (1982).

## 7 | LITERATURVERZEICHNIS

47. Edelstein, P. H. Laboratory diagnosis of infections caused by Legionellae. *European Journal of Clinical Microbiology* **6**, 4–10 (1987).
48. Ernst, E. & Resch, K. L. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of Internal Medicine* **118**, 956–63 (1993).
49. Fankhauser, C. *et al.* Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 26365–74 (1993).
50. Faye, L. & Chrispeels, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of Concanavalin A in jack-bean. *Planta* **170**, 217–224 (1987).
51. Ferguson, M. a, Homans, S. W., Dwek, R. a & Rademacher, T. W. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science (New York, N.Y.)* **239**, 753–9 (1988).
52. Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 506–526 (2002).
53. Fields, B. S. The molecular ecology of Legionellae. *Trends in Microbiology* **4**, 286–290 (1996).
54. Finklea, H. *et al.* Formation of an organized monolayer by solution adsorption of octadecyltrichlorosilane on gold: Electrochemical properties and structural characterization. *Langmuir* **2**, 239–244 (1986).
55. Fliermans, C. B. *et al.* Ecological distribution of . *Applied and environmental Microbiology* **41**, 9–16 (1981).
56. Fogh-Andersen, N. & D'Orazio, P. Proposal for standardizing direct-reading biosensors for blood glucose. *Clinical Chemistry* **44**, 655–9 (1998).
57. Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P., Medina, M. B. & Gehring, A. G. Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnology Techniques* **12**, 571–576 (1998).
58. Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A. & Embley, T. M. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *Journal of General Microbiology* **137**, 1215–1222 (1991).
59. Füchslin, H. P., Kötzsch, S., Keserue, H.-A. & Egli, T. Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry. Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 264–74 (2010).
60. Gaits, F. & Hahn, K. Shedding light on cell signaling: interpretation of FRET biosensors. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* **2003**, PE3 (2003).
61. Gao, L. Y. & Kwaik, Y. a. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology* **2**, 79–90 (2000).

62. Gao, L. & Kwai, Y. A. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infection and Immunity* **67**, 862–870 (1999).
63. Garrity, G. M., Brown, A. & Vickers, R. M. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: Two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 609–614 (1980).
64. Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. *Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology*. (Springer Verlag, 2004).  
doi:10.1007/bergeysoutline200405
65. Gauglitz, G. Direct optical sensors: Principles and selected applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 141–55 (2005).
66. George, J. R., Pine, L., Reeves, M. W. & Harrell, W. K. Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **11**, 286–291 (1980).
67. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 217–24 (2006).
68. Gilbert, P., Collier, P. J. & Brown, M. R. W. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1865–1868 (1990).
69. Glick, J. & Garber, N. The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Journal of General Microbiology* **129**, 3085–90 (1983).
70. Goldstein, I. J., Reichert, C. M. & Misaki, A. Interaction of Concanavalin A with model substrates. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* **234**, 283–296 (1974).
71. González, M. *et al.* Interaction of Biotin with Streptavidin: Thermostability and conformational changes upon binding. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 11288–11294 (1997).
72. Hair, M. L. & Hertl, W. Reactions of chlorosilanes with silica surfaces. *The Journal of Physical Chemistry* **73**, 2372–2378 (1969).
73. Hammer, B. K. & Swanson, M. S. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular Microbiology* **33**, 721–731 (1999).
74. Hänel, C. Parameteroptimierung für zwei Verfahren zur markierungsfreien Analyse biomolekularer Wechselwirkungen. (2003).
75. Harrison, F. L. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *Journal of Cell Science* **100** ( Pt 1, 9–14 (1991).
76. Hartmann, M., Nikitin, P. & Keusgen, M. Innovative analytical system for screening on lectins. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 28–34 (2006).
77. Hayden, R. T. *et al.* Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct

- fluorescence antigen detection, and culture. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2618–26 (2001).
78. Helbig, J. H. *et al.* Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 838–840 (2003).
  79. Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C. & Lück, P. C. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2841–2845 (1997).
  80. Henderson, I. R., Owen, P. & Nataro, J. P. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology* **33**, 919–32 (1999).
  81. Hendrickson, W. a *et al.* Crystal structure of core Streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2190–4 (1989).
  82. Hoge, C. W. & Breiman, R. F. Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections. *Epidemiologic Reviews* **13**, 329–340 (1991).
  83. Holmberg, A. *et al.* The Biotin-Streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–10 (2005).
  84. Homans, S. W. *et al.* Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* **333**, 269–272 (1988).
  85. Horwitz, M. a. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**, 27–33 (1984).
  86. Hünig, S., Märkl, G. & Sauer, J. in *Einführung in die apparativen Methoden in der Organischen Chemie - Ein Tutorial zum Organischen Praktikum als Hypertextsystem* (P, K.) (Universität Regensburg, 2001).
  87. Ida, N. *et al.* Analysis of heterogeneous beta A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 22908–22914 (1996).
  88. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E. & Stricker, S. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* **12**, 317–325 (2000).
  89. Jang, L.-S. & Liu, H.-J. Fabrication of protein chips based on 3-Aminopropyltriethoxysilane as a monolayer. *Biomedical Microdevices* **11**, 331–8 (2009).
  90. Jang, W.-J., Huh, M.-S., Park, K.-H., Choi, M.-S. & Kim, I.-S. Evaluation of an Immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Orientia tsutsugamushi* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**, 394–398 (2003).

91. Jarosik, G. P. & Hansen, E. J. Identification of a new locus involved in expression of Haemophilus influenzae type b lipooligosaccharide. *Infection and Immunity* **62**, 4861–4867 (1994).
92. Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E. & Rai, B. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **341**, 136–42 (2010).
93. Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. & Bhakdi, S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1247–1252 (1995).
94. Joseph, C. A., Watson, J. M., Harrison, T. G. & Bartlett, C. L. R. Nosocomial Legionnaires' disease in England and Wales, 1980–92. *Epidemiology and Infection* **112**, 329–346 (1994).
95. Jung, Y., Jeong, J. Y. & Chung, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *The Analyst* **133**, 697–701 (2008).
96. Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanaviciene, A., Kirlyte, J. & Ramanavicius, A. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Analytical Chemistry* **82**, 6401–8 (2010).
97. Kehrel, M., Dassinger, N., Merkl, S., Vornicescu, D. & Keusgen, M. A novel approach for increasing sensitivity in lateral flow assays: Development of an enrichment module based on polyethylene sintered bodies. *Physica Status Solidi (a)* **209**, 917–924 (2012).
98. Kennedy, J. F., Palva, P. M. G., Corella, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M. & Coelho, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers* **26**, 219–230 (1995).
99. Keusgen, M. Biosensors: New approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **89**, 433–444 (2002).
100. Kim, D. C. & Kang, D. J. Molecular recognition and specific interactions for biosensing applications. *Sensors* **8**, 6605–6641 (2008).
101. King, H. C., Fields, B. S., Shotts, E. B. & White, E. H. Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infection and Immunity* **59**, 758–763 (1991).
102. Kirk, D. W. The electrochemical formation of Au(I) hydroxide on gold in aqueous potassium hydroxide. *Journal of The Electrochemical Society* **127**, 1069 (1980).
103. Kocourec, J. & Hofejsi, V. Defining a lectin. *Nature* **290**, 188 (1981).
104. Köhler, W., Prokop, O. & Kühnemund, O. Routine identification of group-C streptococci by means of an agglutinin (protectin) from the albumen gland of the edible snail, *Helix pomatia*. *Journal of Medical Microbiology* **6**, 127–30 (1973).
105. Kooistra, O., Lüneberg, E., Knirel, Y. A., Frosch, M. & Zähringer, U. N-Methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry* **269**, 560–572 (2002).

## 7 | LITERATURVERZEICHNIS

106. Kratz, A., Ferraro, M., Sluss, P. M. & Lewandrowski, K. B. Laboratory Reference Values. *The New England Journal of Medicine* **351**, 1548–1563 (2004).
107. Kreitmeier, P. Einführung in die apparativen Methoden in der Organischen Chemie. at <[http://www.chm.tu-dresden.de/oc2/Modul\\_OC\\_II/Praktikum/Trocknung.pdf](http://www.chm.tu-dresden.de/oc2/Modul_OC_II/Praktikum/Trocknung.pdf) >
108. Kress, H. *et al.* Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11633–11638 (2007).
109. Krüss GmbH. Krüss GmbH Glossar. (2014). at <<http://www.kruss.de/de/service/schulungstheorie/glossar/>>
110. Leckband, D. & Langer, R. An approach for the stable immobilization of proteins. *Biotechnology and Bioengineering* **37**, 227–37 (1991).
111. Leonard, P., Hearty, S., Quinn, J. & O’Kennedy, R. A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance. *Biosensors & Bioelectronics* **19**, 1331–5 (2004).
112. Licastro, F., Barbieri, L., Krajhanzi, A., Kocourek, J. & Stripe, F. A cortical lectin from the oocytes of *rutilus rutilus* stimulates mitogenic activity and release of soluble factors from human lymphocyte cultures and inhibits protein synthesis in a cell-free system. *International Journal of Biochemistry* **23**, 101–105 (1991).
113. Lohninger, H. Grundlagen der Statistik (Ebook). (2012). at <[http://www.statistics4u.info/fundstat\\_germ/](http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/)>
114. Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1383**, 9–36 (1998).
115. Lottspeich, F. & Zorbas, H. *Bioanalytik*. (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998).
116. Lück, P. C., Wenchel, H.-M. & Helbig, J. H. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1160 (1998).
117. Lüneberg, E. *et al.* Cloning and functional characterization of a 30 kb gene locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **290**, 37–49 (2000).
118. Lüneberg, E. *et al.* Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *The Journal of Experimental Medicine* **188**, 49–60 (1998).
119. Mandal, D. K., Kishore, N. & Brewer, C. F. Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and Ovalbumin to Concanavalin A. *Biochemistry* **33**, 1149–56 (1994).
120. Mäntele, W. *Biophysik*. 165 (UTB GmbH, 2012).

121. Matinlinna, J. P., Lassila, L. V. J., Ozcan, M., Yli-Urpo, A. & Vallittu, P. K. An introduction to silanes and their clinical applications in dentistry. *The International Journal of Prosthodontics* **17**, 155–64 (2004).
122. Matsuda, T., Kabat, E. A. & Surolija, A. Carbohydrate binding specificity of the basic lectin from Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). *Molecular Immunology* **26**, 189–195 (1989).
123. Mazumdar, S. D. *Surface plasmon resonance (SPR) biosensor for rapid detection of Salmonella and Salmonella infections. (Diss., Philipps-Universität Marburg)*. (2008).
124. Mazumdar, S. D., Barlen, B., Kämpfer, P. & Keusgen, M. Surface plasmon resonance (SPR) as a rapid tool for serotyping of *Salmonella*. *Biosensors & Bioelectronics* **25**, 967–71 (2010).
125. Mazumdar, S. D., Hartmann, M., Kämpfer, P. & Keusgen, M. Rapid method for detection of *Salmonella* in milk by surface plasmon resonance (SPR). *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 2040–6 (2007).
126. McCubbin, W. D. & Kay, C. M. Molecular weight studies on Concanavalin A. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **44**, 101–109 (1971).
127. McDonnell, J. M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 572–577 (2001).
128. McGovern, M. E., Kallury, K. M. R. & Thompson, M. Role of solvent on the silanization of glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir* **10**, 3607–3614 (1994).
129. Miao, J. *et al.* Imaging whole *Escherichia coli* bacteria by using single-particle x-ray diffraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 110–2 (2003).
130. Min, W., Dunn, A. J. & Jones, D. H. Non-glycosylated recombinant pro-Concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *The EMBO Journal* **11**, 1303–1307 (1992).
131. Mohammad, K. & Esen, A. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blots. *Journal of Immunological Methods* **117**, 141–145 (1989).
132. Moll, H., Knirel, Y. A., Helbig, J. H. & Zähringer, U. Identification of an  $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  8)-Kdo disaccharide in the inner core region and the structure of the complete core region of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydrate Research* **304**, 91–95 (1997).
133. Murdoch, D. R. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 64–9 (2003).
134. Murga, R. *et al.* Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* **147**, 3121–3126 (2001).
135. Myszka, D. G., Morton, T. a, Doyle, M. L. & Chaiken, I. M. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophysical Chemistry* **64**, 127–37 (1997).

## 7 | LITERATURVERZEICHNIS

136. Nakajima, T., Yazawa, S., Kogure, T. & Furukawa, K. Purification and characterization of N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from *Falcata japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta* **964**, 207–212 (1988).
137. Ng, V. L., York, M. & Hadley, W. K. Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 337–338 (1989).
138. Notsu, H., Kubo, W., Shitanda, I. & Tatsuma, T. Super-hydrophobic/super-hydrophilic patterning of gold surfaces by photocatalytic lithography. *Journal of Materials Chemistry* **15**, 1523 (2005).
139. Nowell, P. C. Phytohemagglutinin : An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research* **20**, 462–466 (1960).
140. Osterholtz, F. D. & Pohl, E. R. Kinetics of the hydrolysis and condensation of organofunctional alkoxysilanes: a review. *Journal of Adhesion Science and Technology* **6**, 127–149 (1992).
141. Patankar, N. A. On the modeling of hydrophobic contact angles on rough surfaces. *Langmuir* **19**, 1249–1253 (2003).
142. Peng, B., Rhe, J. & Johannsmann, D. Homogeneously aligned liquid-crystal polymer brushes. *Advanced Materials* **12**, 821–824 (2000).
143. Peumans, W. J. & Damme, E. J. M. Van. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **15**, 199–228 (1998).
144. Qian, W. *et al.* Immobilization of antibodies on ultraflat polystyrene surfaces. *Clinical chemistry* **46**, 1456–63 (2000).
145. Quijoch, F. Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 287–315 (1986).
146. Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Madani, R., Rahbarizadeh, M. H. & Omidfar, K. Preparation and characterization of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Hybridoma* **19**, 413–417 (2000).
147. Reece, G. N., Becker, J. W. & Edelman, G. M. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1525–1547 (1975).
148. Rehm, H. *Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics*. (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2006).
149. Reingold, A. L. *et al.* *Legionella pneumonia* in the United States: The distribution of serogroups and species causing human illness. *Journal of Infectious Diseases* **149**, 819–819 (1984).
150. Reznik, G. O., Vajda, S., L., S. C., Cantor, C. R. & Takeshi, S. Streptavidins with intersubunit crosslinks have enhanced stability. *Nature Biotechnology* **14**, 1007–1011 (1996).
151. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 54–61 (2000).

152. Ricucci, D. & Siqueira, J. F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* **36**, 1277–88 (2010).
153. Roche, R. J. & Moxon, E. R. Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis infections of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends in Microbiology* **3**, 304–309 (1995).
154. Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V & Keevil, C. W. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1585–1592 (1994).
155. Ron, H., Matlis, S. & Rubinstein, I. Self-assembled monolayers on oxidized metals. 2. Gold surface oxidative pretreatment, monolayer properties, and depression formation. *Langmuir* **14**, 1116–1121 (1998).
156. Rossier, O., Starkenburg, S. R. & Cianciotto, N. P. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' Disease pneumonia. *Infection and Immunity* **72**, 310–321 (2003).
157. Rowbotham, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33**, 1179–1183 (1980).
158. Safina, G., Vanlier, M. & Danielsson, B. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. *Talanta* **77**, 468–472 (2008).
159. Saha, K., Bender, F. & Gizeli, E. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Analytical Chemistry* **75**, 835–42 (2003).
160. Schönherr, H. & Vancso, G. J. *Scanning Force Microscopy of Polymers. Scanning Force Microscopy of Polymers: , Springer Laboratory, ISBN 978-3-642-01230-3. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010 -1*, (Springer Verlag GmbH, 2010).
161. Schönherr, H. & Vancso, G. J. *Scanning Force Microscopy of Polymers. Scanning Force Microscopy of Polymers 25–75* (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-01231-0
162. Schütz, A. *Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening. (Diss., Eberhard-Karls-Universität Tübingen).* (2000).
163. Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat, R. G. & Surolia, A. Thermodynamics of monosaccharide binding to Concanavalin A, Pea (*Pisum sativum*) lectin, and Lentil (*Lens culinaris*) lectin. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 7668–7677 (1993).
164. Serra, B., Gamella, M., Reviejo, a J. & Pingarrón, J. M. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 1853–60 (2008).

165. Seu, K. J. *et al.* Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers. *Biophysical Journal* **92**, 2445–50 (2007).
166. Sgarbi, N. *et al.* Self-assembled extracellular matrix protein networks by microcontact printing. *Biomaterials* **25**, 1349–1353 (2004).
167. Shen, Z. *et al.* Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Analytical Chemistry* **79**, 2312–9 (2007).
168. Shin, S. & Roy, C. R. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology* **10**, 1209–20 (2008).
169. Shirtcliffe, N. J., McHale, G., Newton, M. I. & Perry, C. C. Wetting and wetting transitions on copper-based super-hydrophobic surfaces. *Langmuir* **21**, 937–43 (2005).
170. Sjöbring, U., Björck, L. & Kastern, W. Streptococcal Protein G. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 399–405 (1991).
171. Steele, T. W., Moore, C. V & Sangster, N. Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2984–2988 (1990).
172. Stemmler, I. *Miniaturisierte Affinitätsanalytik – Ortsaufgelöste Oberflächen-modifikation, Assays und Detektion. (Diss.; Eberhard-Karls-Universität Tübingen).* (1999).
173. Stull, V. R. Size distribution of bacterial cells. *Journal of Bacteriology* **109**, 1301–3 (1972).
174. Sullivan, T. P. & Huck, W. T. S. Reactions on monolayers: Organic synthesis in two dimensions. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 17–29 (2003).
175. Suzuki, I., Saito, H., Inoue, S., Migita, S. & Takahashi, T. Purification and characterization of two lectins from *Aloe arborescens* Mill. *Journal of Biochemistry* **85**, 163–71 (1979).
176. Ta, A. C., Stout, J. E., Yu, V. L. & Wagener, M. M. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2118–2123 (1995).
177. Tanaka, G., Funabashi, H., Mie, M. & Kobatake, E. Fabrication of an antibody microwell array with self-adhering antibody binding protein. *Analytical Biochemistry* **350**, 298–303 (2006).
178. Tipler, P. A. *Physik.* (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995).
179. Tobin, J. O., Swann, R. A. & Bartlett, C. L. Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: methods and preliminary results. *British Medical Journal* **282**, 515–517 (1981).
180. Torres-Cruz, J. & van der Woude, M. W. Slipped-strand mispairing can function as a phase variation mechanism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6990–6994 (2003).
181. Tripp, C. P. & Hair, M. L. Reaction of methylsilanols with hydrated silica surfaces: The hydrolysis of trichloro-, dichloro-, and monochloromethylsilanes and the effects of curing. *Langmuir* **11**, 149–155 (1995).

182. Tsutomu, S., Seong, H. G., Kobatake, E. & Aizawa, M. Genetically synthesized antibody-binding protein self-assembled on hydrophobic matrix. *Bioconjugate Chemistry* **11**, 789–794 (2000).
183. Tünnemann, R. *et al.* Optical biosensors. Monitoring studies of glycopeptide antibiotic fermentation using white light interference. *Analytical Chemistry* **73**, 4313–4318 (2001).
184. Turková, J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **722**, 11–31 (1999).
185. United States Environmental Protection Agency-Office of Science and Technology (Office of Water). *Legionella: Drinking water health advisory*. (2001).
186. Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* **48**, 11084–96 (2009).
187. Van Der Voort, P. & Vansant, E. F. Silylation of the silica surface a review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **19**, 2723–2752 (1996).
188. van Dongen, W. D. & Heck, A. J. R. Binding of selected carbohydrates to apo-Concanavalin A studied by electrospray ionization mass spectrometry. *The Analyst* **125**, 583–589 (2000).
189. Venkataraman, C., Haack, B. J., Bondada, S. & Kwaik, Y. A. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' Disease bacterium. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 537–547 (1997).
190. Verstraete, M., Vermynen, J. & Collen, D. Intravascular coagulation in liver disease. *Annual Review of Medicine* **25**, 447–55 (1974).
191. Vickers, R. M., Stout, J. E., Tompkins, L. S., Troup, N. J. & Yu, V. L. Cefamandole-susceptible strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1: implications for diagnosis and utility as an epidemiological marker. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 537–539 (1992).
192. Vigne-Maeder, F. & Sautet, P. Theoretical study of hydroxylated and dehydroxylated surfaces of a cristobalite model of silica. *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 8197–8203 (1997).
193. Visca, P. *et al.* Multiple Types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2189–2196 (1999).
194. Vogel, J. P. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**, 873–876 (1998).
195. Wadowsky, R. M. & Yee, R. B. Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 768–772 (1981).
196. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews* **108**, 814–825 (2008).

## 7 | LITERATURVERZEICHNIS

197. Wang, Z. & Jin, G. Feasibility of Protein A for the oriented immobilization of immunoglobulin on silicon surface for a biosensor with imaging ellipsometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **57**, 203–211 (2003).
198. White, L. & Tripp, C. Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **232**, 400–407 (2000).
199. Wilcheck, M. & Bayer, E. A. Introduction to Avidin-Biotin technology. *Methods in Enzymology* **184**, 5–13 (1990).
200. Wilkinson, H. W. & Brake, B. J. Formalin-killed versus heat-killed *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in the indirect immunofluorescence assay for legionellosis. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 979–981 (1982).
201. Wilkinson, H. W., Cruce, D. D. & Broome, C. V. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *Journal of Clinical Microbiology* **13**, 139–146 (1981).
202. Wilkinson, H. W., Farshy, C. E., Fikes, B. J., Cruce, D. D. & Yealy, L. P. Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. *Journal of Clinical Microbiology* **10**, 685–689 (1979).
203. Wilkinson, H. W., Fikes, B. J. & Cruce, D. D. Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **9**, 379–383 (1979).
204. Williams, K. P. *et al.* Phylogeny of Gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology* **192**, 2305–2314 (2010).
205. Wolny, P. M., Spatz, J. P. & Richter, R. P. On the adsorption behavior of biotin-binding proteins on gold and silica. *Langmuir* **26**, 1029–34 (2010).
206. Wong, A. K. Y. & Krull, U. J. Surface characterization of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane films on silicon-based substrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**, 187–200 (2005).
207. Xu, C., Moore, C. H., Fountain, D. W. & Yu, P.-L. Purification and characterization of a new lectin from tamarillo fruit (*Cynhomandra betacea*). *Plant Science* **81**, 183–189 (1992).
208. Xu, M. & Katz, A. in *Light Scattering Reviews 3* (Kokhanovsky, A. A.) 27–67 (Springer Verlag GmbH, 2008). doi:10.1007/978-3-540-48546-9
209. Yakovleva, J., Davidsson, R., Bengtsson, M., Laurell, T. & Emnéus, J. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 21–34 (2003).
210. Yamashita, K., Ohkura, T., Umetsu, K. & Suzuki, T. Purification and characterization of a Fuc $\alpha$ 1->Gal $\beta$ 1-> and GalNAc $\beta$ 1->-specific lectin in root tubers of *Trichosanthes japonica*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 25414–25422 (1992).

211. Yan, H. M., Kraus, G. & Gauglitz, G. Detection of mixtures of organic pollutants in water by polymer film receptors in fibre-optical sensors based on reflectometric interference spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **312**, 1–8 (1995).
212. Yan, Q., Zhu, L., Kumar, N., Jiang, Z. & Huang, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. *Food Chemistry* **122**, 589–595 (2010).
213. Yzerman, E. P. F. *et al.* Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' Disease in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3232–3236 (2002).
214. Zhang, M., Desai, T. & Ferrari, M. Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials* **19**, 953–60 (1998).
215. Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K. & Elings, V. B. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science* **290**, L688–L692 (1993).
216. Zubkov, E. *Aufbau einer Vierspitzen-Rastertunnelmikroskop/ Rasterelektronenmikroskop-Kombination und Leitfähigkeitsmessungen an Silizid Nanodrähten (Diss., RWTH Aachen University, 2013)*. 34 (Forschungszentrum Jülich GmbH, 2013).

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
AK	Antikörper
AML	<i>Astragalus membranaceus</i> -Lectin
aMP	Methyl- $\alpha$ -D Mannopyranosid
AP	Alkalische Phosphatase
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
bAK	biotinylierter Antikörper
BIA	Biomolecular Interaction Analysis
BSA	Bovines Serumalbumin
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract (gepufferter Holzkohle-Hefeextrakt)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP	Cyan-fluorescent Protein
ConA	Concanavalin A
ConA-SAv	ConcanavalinA-Streptavidin-Fusionsprotein
DAF	Direct-Assay-Format
dAK	Detektionsantikörper
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes H <sub>2</sub> O
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
dIFA	direkter Immunfluoreszenz-Assay
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (IUPAC: 3-(Ethyliminomethylidenamino)N,N-dimethyl-propan-1-amin)
EIA	Enzym-Immunoassay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
fAK	Fängerantikörper
FK	Flusskanal
FP	ConcanavalinA-Streptavidin-Fusionsprotein
FzmB	Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, GmbH
GC	Gaschromatographie
GOPTS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
GUA	Guanidinhydrochlorid
hd	Hitze-deaktiviert

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horse raddish peroxidase
iIFA	indirekter Immunfluoreszenz-Assay
IAP	Poly[(1-methylvinylisocyanat)-alt-maleinsäureanhydrid]
KBE	Koloniebildende Einheiten
KW	Kontaktwinkel
Leg	<i>Legionella pneumophila</i> -Zellen
Leg1G	<i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1, Stamm unbekannt, Wildtyp-Isolat Gießen; bezogen vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Universitätsklinikums Gießen Marburg (UKGM).
Leg1P	<i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1, Stamm Philadelphia; bezogen vom Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie.
LCV	<i>L. pneumophila</i> -containing-vacuole
<i>mip</i>	macrophage infectivity potentiator-Gen
MIPC	Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid
MS	Messspot
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nwfChips	nwf=nicht wasserfrei. Chipfunktionalisierung in nicht trockenem Toluol
OF	Oberfläche
OSD	optische Schichtdicke
OSD <sub>MW</sub>	Mittelwert der optischen Schichtdicke
OTS	Octadecyltrimethoxysilan
p.a.	per analysis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
proConA	Pro-Concanavalin A
QCM	Quarz Cristal Microbalance
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RlFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RT	Raumtemperatur
SAF	Sandwich-Assay-Format
Sav	Streptavidin
SDF	Sessile Drop Fitting bzw. Young-Laplace-Fitting

## 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Serogruppe
SPI	Spektralphaseninterferenz
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
SPW	Spannweite (Max-Min)
StDef	Standardabweichung
T2	Tangent-2 Verfahren zur Ermittlung von Kontaktwinkeln
TBS	The Blocking Solution
TIR	total immersion reactor
UAW	untere Atemwege
UKGW	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
wfChips	wf=wasserfrei; Chipfunktionalisierung in wasserfreiem/trockenen Toluol
WGA	Wheat Germ Agglutinin
YFP	Yellow-fluorescent Protein

## 9. Anhang

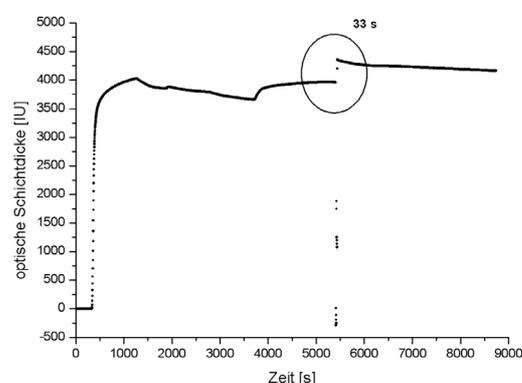
In einigen Experimenten kam es zu Artefakten aufgrund von z.B. Luft im System. Das ließ sich nicht immer vermeiden. In solchen Fällen kommt es zu einem starken Signalabfall oder Anstieg oder zu einem mehrmaligen Wechsel zwischen Abfall und Anstieg. Normalerweise stabilisierte sich das Signal wieder sobald die Luftblasen den Bereich des Messspots wieder verlassen hatten. Jedoch setzte sich die Signalentwicklung häufig auf einem höheren bzw. niedrigeren Signalniveau fort. Die Sensorgramme wurden dann in einigen Fällen „repariert“. Das geschah nur, wenn:

1. zwischen dem letzten Zeitpunkt des normalen Signalverlaufs vor dem entsprechenden Ereignis und der erneuten Stabilisierung des Signalverlaufs nach dem Ereignis wenig Zeit verging und
2. der Signalverlauf nach der Stabilisierung abgesehen von der Höhe einen erwarteten bzw. plausiblen Verlauf zeigte.

Wenn nur wenig Zeit vergeht zwischen dem Zeitpunkt vor dem Artefakt und der Stabilisierung, kann angenommen werden, dass in dieser Zeit keine besonderen Signalveränderungen stattfinden, die durch eine rechnerische Anpassung der Bindungskurven, verloren gehen. Die Bindungskurven in denen eine rechnerische Anpassung nach Artefakten vorgenommen wurde, sind im folgenden angegeben. Luftblasen-Artefakte können am Auftauchen von Luftblasen im durchsichtigen Schlauch, der aus dem System in den Abfallbehälter führt, erkannt werden.

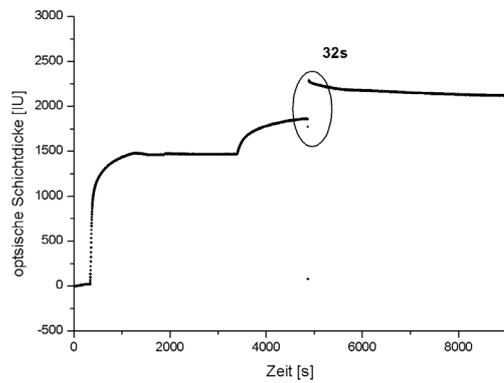
### Zu 4.1.1.4 Experimente mit Fängerantikörper AK237744

→ Artefakt in Bindungskurve bzgl. 100 µg/ml in Abb. 4.14. Dauer: 33 s.



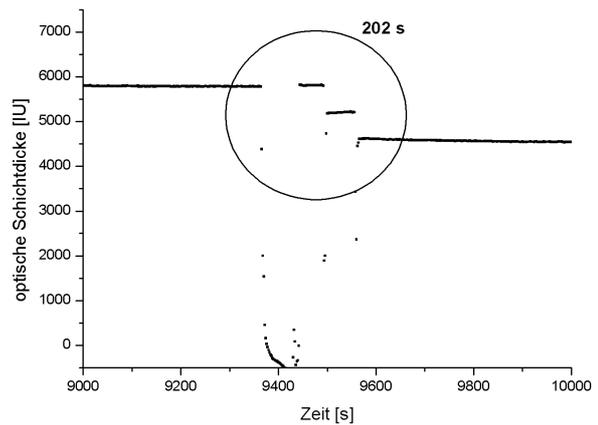
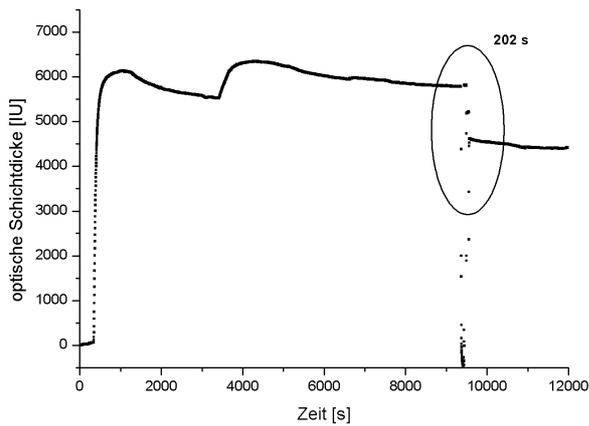
### Zu 4.1.1.5 Experimente im Sandwich-Assay-Format mit vorhergehender BSA-Applikation

→ Artefakt in Bindungskurve bzgl. 1 µg/ml in Abb. 4.16 A von. Dauer: 32 s.



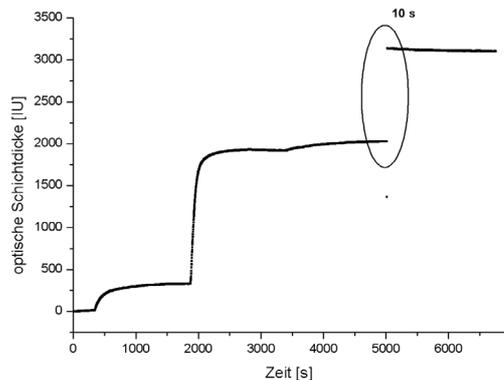
**Zu 4.1.5.4.2 Verwendung von Leg1E6 als fAK und dAK)**

→ Artefakt in Bindungskurve von E. coli in Abb. 4.38. Dauer: 202 s. In Detail-Abbildung (rechts) erkennt man, dass in der Zeit von 202 s mehrmals eine vorübergehende Stabilisierung stattgefunden hat, in der keine relevanten Signaländerungen vorgekommen sind.



**Zu 4.1.7.1.2 Persea-Lektin als Fänger von Leg1P(1)**

→ Artefakt in Bindungskurve in Abb. 4.54. Dauer: 10 s.



# ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) zur Detektion ganzer *Legionella pneumophila*-Zellen und Entwicklung regenerierbarer funktionaler Oberflächen für Anwendungen in der Biosensorik“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....  
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

# Lebenslauf

- 02/2010-02/2015 **Dissertation** am Institut für pharmazeutische Chemie, Fachbereich Pharmazie, Philipps-Universität Marburg. Titel: „Neue funktionale Oberflächen für biomolekulare Interaktionsanalysen“.  
Betreuer: Prof. Dr. Keusgen
- 04/2006-06/2009 **Diplom Biologie** (Note 1,1) an der Philipps-Universität Marburg. Prüfungsfächer: Spezielle Botanik und Mykologie, Pflanzenphysiologie, Zellbiologie. Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Phylogenese und Phylogeographie der Sektion *Calodontes*“ am Institut für spezielle Botanik und Mykologie.  
Betreuer: Prof. Dr. Kost
- 09/2003-04/2006 **Vordiplom der Biologie** an der Ruhr-Universität Bochum (Note:1,7): Prüfungen in Zoologie und Zellbiologie, Botanik und Biodiversität, Strukturbiologie, Genetik und Physiologie, Chemie, Physik.
- 06/1996 **Abitur** Franz-Stock-Gymnasium, Arnsberg
- 29.05.1976 Geboren in Frankfurt am Main; Staatsangehörigkeit: deutsch.