

**Modifizierung von Polyethylensubstraten mit  
Aminocellulose und Antikörperimmobilisierung  
für die Entwicklung von immunologischen  
Schnelltests am Beispiel von CRP**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Friedrich Scholz  
geboren am 12. März 1985 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Heinze, Friedrich-Schiller-Universität Jena, IOMC
2. Jun.-Prof. Dr. Felix Schacher, Friedrich-Schiller-Universität Jena, IOMC

Tag der Verteidigung: 05.11.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Allgemeiner Teil</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Antikörper als Erkennungssystem</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Herstellung von Antikörpern .....	4
2.1.2 Antikörper-Antigen-Wechselwirkung .....	5
<b>2.2 Prinzip eines diagnostischen Immunoassays</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Antikörperkonjugate.....	7
2.2.2 4-Parameter-Logistik zur Auswertung von Antigen-Antikörper Bindungskurven.....	8
2.2.3 Immunologische Schnelltest.....	9
<b>2.3 Grundlagen des C-reaktiven Proteins (CRP)</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Nachweismethoden von CRP.....	16
<b>2.4 Oberflächenmodifizierung von Assayträgern</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5 Filmbildende Aminocellulosederivate</b> .....	<b>17</b>
2.5.1 Struktur der Aminocellulosederivate.....	18
2.5.2 Löslichkeitseigenschaften der Aminocellulosederivate .....	18
2.5.3 Filmbildende Eigenschaften der Aminocellulosederivate.....	19
2.5.4 Aminocellulose-modifizierte Oberflächen für die Herstellung von biofunktionalen Materialien.....	20
2.5.5 Aminocellulosen als <i>Self-assembled-Monolayer</i> .....	21
2.5.6 Tritylchloridmethode zur Bestimmung von NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentrationen auf Substraten .....	22
<b>2.6 Immobilisierung von Antikörpern an Oberflächen</b> .....	<b>22</b>
2.6.1 Nicht-kovalente Immobilisierung von Antikörpern .....	23
2.6.2 Kovalente Immobilisierung von Antikörpern .....	27

<b>2.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>32</b>
2.7.1	Synthese ausgewählter Aminocellulosederivate .....	33
2.7.2	Modifizierung von PE-Substraten mit Aminocellulosederivaten .....	33
2.7.3	Ak-Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate .....	34
2.7.4	Entwicklung von POCT für CRP auf Basis der Ak-funktionalisierten PE-Substrate.....	35
2.7.5	Kurzformulierung der Ziele .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Synthese, Struktur und Löslichkeitseigenschaften ausgewählter Aminocellulosederivate .....</b>	<b>37</b>
3.1.1	Löslichkeitseigenschaften der synthetisierten Aminocellulosederivate.....	41
<b>3.2</b>	<b>Aminocellulose-modifizierte Substratmaterialien .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Vorbehandlung der Substrate.....	44
3.2.2	Modifizierung von Substraten mit Aminocellulosederivaten .....	45
3.2.3	NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten Substrate in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit.....	46
3.2.4	NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentration Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter in Abhängigkeit des Aminocellulosederivates .....	47
3.2.5	NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentrationen der modifizierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit der Lagerzeit der Aminocellulosederivate.....	49
3.2.6	AFM-Untersuchungen von Aminocellulose-modifizierten Glimmersubstraten .....	51
<b>3.3</b>	<b>Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE- Substrate .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Benötigte Voraussetzungen für ein reproduzierbare Ak-Immobilisierung .....	54
3.3.2	CRP-Immunoaffinität als Bewertungsparameter der Ak-funktionalisierten PE-Substrate hergestellt gemäß verschiedener Immobilisierungsmethoden .....	56
3.3.3	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die PG-Methode.....	57
3.3.4	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die SAV-Methode .....	57
3.3.5	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch homobifunktionelle Crosslinker .....	58
3.3.6	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die DIA-Methode .....	59
3.3.7	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die EDC-Methode.....	60

3.3.8	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die EDC-Ak-Methode .....	60
3.3.9	Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die ALD-Methode .....	61
3.3.10	Elektrostatisch-getriebene Anti-h CRP 6404 Ak Immobilisierung an carboxylgruppenhaltige Aminocellulose-modifizierte PE-Chips (CAB-Methode) .....	61
3.3.11	Elektrostatisch-getriebene Anti-h CRP 6404 Ak Immobilisierung an sulfonsäuregruppenhaltige Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate (SUF-Methode) .....	63
3.3.12	CRP-Immunoaffinitäten Ak-funktionalisierter PE-Chips hergestellt gemäß der ausgewählten Immobilisierungsmethoden an SAM-ähnliche Aminocellulose-modifizierten PE-Chips .....	65
<b>3.4</b>	<b>Herstellung von CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern für CRP-Assays .....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Ak-Funktionalität als Bewertungsparameter der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter .....	69
3.4.2	Ak-Funktionalitäten der immobilisierten Antikörper .....	70
<b>3.5</b>	<b>Entwicklung eines CRP-ABICAP-Säulenassays auf Basis CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter .....</b>	<b>77</b>
3.5.1	Durchführung des ABICAP-Säulenassays .....	77
3.5.2	Optisches Detektionssystem für ein CRP-ABICAP-Säulenassay mit maximaler optischer Signalstärke .....	78
3.5.3	CRP-Kalibrationskurven der optimierten ABICAP-Systeme .....	80
3.5.4	Langzeitstabilität der CRP-ABICAP-Systeme .....	82
3.5.5	Auswahl eines geeigneten ABICAP-Systems für die POCT-Anwendung zur CRP-Konzentrationsbestimmung .....	85
3.5.6	Validierungen des ASC-ABICAP-Säulenassayssystems .....	86
3.5.7	Bewertung des CRP-ABICAP-Säulenassays .....	86
<b>3.6</b>	<b>Erzeugung CRP-immunoaffiner Oberflächen auf PE-Membranen zur Entwicklung eines LFA für CRP-Konzentrationsbestimmungen .....</b>	<b>88</b>
3.6.1	Herstellung CRP-immunoaffiner Oberflächen auf mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Membranen .....	88
3.6.2	Herstellung der Teststreifen .....	90
3.6.3	Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates .....	90
3.6.4	Durchführung eines lateralen CRP-DipStick-Testes mit verschiedenen Ak-funktionalisierten Teststreifen .....	90
3.6.5	Ergebnisse der lateralen DipStick-Tests mit Teststreifen bestehend aus CRP-immunoaffinen PE-Membranen .....	92
3.6.6	Bewertung der Ergebnisse des CRP-DipStick-Testes der Ak-funktionalisierten PE-Membranen .....	94

<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikalien, Ausgangsmaterialien, Bio- und Detektionsreagenzien, Substrate und verwendete Pufferlösungen.....</b>	<b>96</b>
4.1.1	Chemikalien und Ausgangsmaterialien.....	96
4.1.2	Bio- und Detektionsreagenzien .....	96
4.1.3	Poröse und unporöse Substrate .....	97
4.1.4	Reagenz- und Pufferlösungen.....	98
<b>4.2</b>	<b>Laboreinrichtung .....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Reinstwasseraufbereitung .....	99
4.2.2	Sonstige Geräte und Einrichtungen .....	99
<b>4.3</b>	<b>Messmethoden.....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Nuklearmagnetresonanzspektroskopie .....	99
4.3.2	UV/Vis-Messungen .....	100
<b>4.4</b>	<b>Allgemeine Synthesevorschriften und Analytik synthetisierter Substanzen.....</b>	<b>101</b>
4.4.1	Synthese der 6-Tosylcellulosederivate .....	101
4.4.2	Synthese der Aminocellulosederivate .....	101
4.4.3	Synthese von Proteinkonjugaten.....	102
<b>4.5</b>	<b>Oberflächenmodifizierung von Substraten.....</b>	<b>104</b>
4.5.1	Herstellung der Trennfritten durch adsorptive Immobilisierung von BSA an PE-Mikrofilter .....	104
4.5.2	Substratmodifizierung mittels Aminocellulosederivat .....	104
<b>4.6</b>	<b>Bestimmung der Aminogruppenkonzentration auf mit Aminocellulose modifizierten PE-Substraten (Tritylchloridmethode).....</b>	<b>105</b>
<b>4.7</b>	<b>Methoden zur IgG-Ak-Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate .....</b>	<b>106</b>
4.7.1	Funktionalisierung von Aminocellulose-modifizierten PE-Substraten.....	106
4.7.2	Ak-Immobilisierung an funktionalisierte, Aminocellulose-modifizierte PE-Chips und PE-Mikrofilter .....	108
4.7.3	Funktionalisierung von IgG-Ak-Protein und Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate.....	110
4.7.4	Funktionalisierung von Aminocellulose-modifizierten PE-Membranen und anschließende Ak-Immobilisierung .....	110
4.7.5	Stresstest der gemäß CAB- und SUF-Methode Ak-modifizierten PE-Chips .....	111

<b>4.8</b>	<b>Anwendung immunologischer Grundlagenmethoden .....</b>	<b>111</b>
4.8.1	ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) .....	111
4.8.2	ABICAP-Säulenassay anhand CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter.....	114
4.8.3	CRP-DipStick-Test mit Ak-funktionalisierten PE-Membranen .....	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>XVIII</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>XXV</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XXVI</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XXVII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Wellenlänge
4PL	4-Parameter-Logistik
°C	Grad Celsius
A1	untere Asymptote
A2	obere Asymptote
ABICAP	Antibody immunoassay column for analytical purpose
AFM	Atomic Force Microscopy
Ag	Antigen
AGE	Anhydro-Glucose-Einheit
Ak	Antikörper
Anti-h CRP 6404	monoklonaler CRP spezifischer Antikörper
APTS	3-Aminopropyltriethoxysilane
BSA	Bovine serum albumin
Bzw.	beziehungsweise
CBB	Bicarbonat-Puffer
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CRP	C-reaktives Protein
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr-Kation	4,4'-Dimethoxytritylkation
DP	Degree of Polymerisation (Polymerisationsgrad)
DS	Degree of Substitution (Substitutionsgrad)
EA	Elementaranalyse
EDA	Ethylendiamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

## Abkürzungsverzeichnis

$f_{Ak}$	Ak-Funktionalität
geb.	gebunden
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunoglobulin G
IP	Isoelektrischer Punkt
kDA	Kilodalton
l	Liter
LFA	Lateral-Flow-Assay
LiCl	Lithiumchlorid
LM	Lösungsmittel
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaIO <sub>4</sub>	Natriumperiodat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NWG	Nachweisgrenze
o. g.	oben genannten

OD	optische Dichte (optisches Signal)
p	Steilheit der Kurve
PE	Polyethylen
POC	Point-of-care
POCT	Point-of-care-Test
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphate buffered saline
RIA	Radioimmunoassays
RT	Raumtemperatur
s-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
SAM	Self-assembled-Monolayer
SApolyHRP	Streptavidin-polyHRP40-Konjugat
SEC	Größenausschlusschromatographie
Sulfo-NHS-LC-Diazirin	Sulfosuccinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoate
TAEA	Tris(2-aminoethyl)amin
TBAN	Tetrabutylammoniumnitrat
TEPA	Tetraethylenpentamin
TETA	Triethylentetramin
TMB	Tetramethylbenzidin
TODA	4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin
u. g.	unten genannten
upm	Umdrehungen pro Minute
VK	Variationskoeffizient
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Struktur eines IgG-Antikörpers bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. ....	4
Abbildung 2-2: A) Aufbau eines Sandwich-Assays. B) Das Signal ist direkt proportional zur Analyt-Konzentration [Raem, Rauch 2006]. ....	6
Abbildung 2-3: Sigmoidaler Kurvenverlauf eines Analyt-Bindungsassays ausgewertet mit der 4PL. ....	9
Abbildung 2-4: Typischer Aufbau eines Lateral-Flow-Immunoassays [Wong, Tse 2010]. ....	10
Abbildung 2-5: Formelschema der Oxidation von farblosem TMB mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von HRP zu einem blauen TMB-Radikalion. ....	13
Abbildung 2-6: Pipettierschema eines Durchfluss-Immunoassays (ABICAP-System) mit photometrischer Auswertung via Enzymmarker; 1) Bindung des Analyten auf einem Mikrofilter mit immobilisiertem Fänger-Ak, 2) Bildung eines Sandwichkomplexes mit einem Antikörper-polyHRP-Konjugat, 3) Anfärben des Filters durch Zugabe von präzipitierendem 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB), 4) photo-metrische Auswertung in Transmission (d=5 mm, Lichtdiffusionsprinzip). [Senova GmbH] ....	13
Abbildung 2-7: Graphische Darstellung eines CRP-Moleküls [Shrive et al. 1996]. ....	15
Abbildung 2-8: Allgemeines Formelschema des Aminocellulose Typs mit einem aminhaltigen Substituenten mit einer Spacergruppe (x) an Position C6 und löslichkeitsvermittelnden Gruppen S (Carbanilat, Tosylat, Acetyl, Benzoyl, Methyl) an Position C2/C3 der AGE. In Abhängigkeit der Spacerstruktur (x) sind lassen sich die Aminocellulosen in drei Typen unterscheiden: (x)=Aryl (Typ a), (x)=Alkyl (Typ b) und (x)=Oligoamin (Typ c). ....	18
Abbildung 2-9: Formelschema der Bestimmung von NH <sub>2</sub> -Endgruppen auf Substratoberflächen mittels Tritylchlorid (Tritylchloridmethode). ....	22
Abbildung 2-10 Schematische Darstellung möglicher Orientierungen immobilisierter Antikörper auf einer Oberfläche. Entsprechend ihrer Orientierung ergibt sich ihr Einfluss auf die Funktionalität als a) aktiv, b) teilweise aktiv und c) inaktiv. [Lu et al. 1996]. ....	23
Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der gezielten Antikörperausrichtung durch Einführung von Carboxylgruppen auf der Oberfläche: a) zufällige Orientierung; b) aktive Orientierung [Mouri et al. 2010]. ....	25

Abbildung 2-12: Immobilisierungsschema von Ak-Protein via biologischer Erkennungsstrukturen: a) SAV-Funktionalisierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen b) Biotin-Funktionalisierung von Ak-Protein und c) Ak-Immobilisierung an SAV-funktionalisierten Oberflächen. ....	26
Abbildung 2-13: Immobilisierungsschema von Ak-Protein via biologischer Erkennungsstrukturen: a) Protein G-Funktionalisierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen und b) Ak-Immobilisierung an die Protein G-aktivierte Oberfläche (PG-Methode). ....	27
Abbildung 2-14: Ak-Immobilisierung an NH <sub>2</sub> -funktionalisierte Oberfläche durch homobifunktionelle Crosslinker, a) Kopplungsschema und b) Spacerstrukturen ausgewählter Crosslinker. ....	28
Abbildung 2-15: Ak-Immobilisierungsschema der DIA-Methode und die erhaltene Kopplungsstruktur. ....	29
Abbildung 2-16: Ak-Immobilisierungsschema der EDC-Methode: a) Carboxylierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen, b) Aktivierung der Carboxylgruppen mittels EDC/Sulfo-NHS und c) Ak-Immobilisierung. ....	30
Abbildung 2-17: Ak-Immobilisierungsschema der EDC-Ak-Methode durch Carbonsäureaktivierung der Carboxylgruppen des Ak-Proteins mittels EDC und s-NHS. ....	31
Abbildung 2-18: Ak-Immobilisierungsschema der ALD-Methode durch Glykolspaltung der Kohlenhydratstrukturen des Ak-Proteins unter Erhalt von Aldehydgruppen. ....	32
Abbildung 3-1: Synthesesequenz der im Rahmen der Arbeit synthetisierten Aminocellulosederivate: a) Tosylierung von Cellulose in DMA/LiCl, b) Einführung einer Löslichkeitsvermittelnden Gruppe (S) in Form von einem Phenyl-Carbanilat-Substituenten, c) nukleophile Substitution der Tosylatgruppe durch Di- und Oligoamine mit verschiedenen Spacerstrukturen (X) (EDA=Ethylendiamin, TAEA=2,2,2-Triaminotriethylamin, TEPA=Tetraethylenpentamin, TETA=Triethylentetramin, TODA=4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin). ....	38
Abbildung 3-2: Formelschema der synthetisierten Aminocellulosederivate mit Variation der Löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S) und verschiedenen Spacerstrukturen (x): TAEA=2,2,2-Triaminotriethylamin, EDA=Ethylendiamin, TEPA=Tetraethylenpentamin, TETA=Triethylentetramin, TODA=4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin. ....	39
Abbildung 3-3: Allgemeines Formelschema der Erzeugung von O-Funktionen auf der Oberfläche von PE-Substratmaterialien. ....	45
Abbildung 3-4: AFM-Aufnahmen von Aminocellulose-modifizierten AFM-Glimmerscheiben ausgehend von a) nicht modifiziertem AFM-Glimmer; b) EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6),	

c) EDA-Celluloseosylat (DP~200, <b>1b</b> ), d) TAEA-Celluloseosylat (DP~200, <b>2b</b> ), e) EDA-Celluloseosylat (DP~50, <b>10b</b> ).....	52
Abbildung 3-5: AFM-Bilder von mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, <b>1b</b> ) modifizierten Glimmersubstraten, die mittels EDA-Celluloseosylat-Lösung (DP~200, <b>1b</b> ) nach einer Standzeit der Stammlösung von (1 %w/w) a) 1 Tag, b) 7 Tagen, c) 56 Tagen, d) 120 Tagen hergestellt wurden. ....	53
Abbildung 3-6: AFM-Bilder von mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, <b>6</b> ) modifizierten Glimmersubstraten, die mittels EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, <b>6</b> ) nach einer Standzeit des Feststoffes von a) 1 Tag, b) 56 Tagen, c) 120 Tagen hergestellt wurden. ....	54
Abbildung 3-7: AFM-Aufnahmen a) von unbehandelten PE-Chips und b) von mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, <b>1b</b> ) modifizierten PE-Chips.....	56
Abbildung 3-8: pH-Wert Optimierung des Immobilisierungsansatzes der CAB-Methode durch Bestimmung der gebundenen CRP-Menge der CRP-immunoaffinen PE-Chips bei einer vorgelegten Menge von 10 ng CRP pro PE-Chip im Inkubationsansatz in Abhängigkeit vom pH-Wert des Immobilisierungsansatzes. ....	62
Abbildung 3-9: Einführung von Sulfonsäuregruppen auf Aminocellulose-modifizierten PE-Chips durch Umsetzung der Aminocellulose-modifizierten PE-Chips mit 4,4'-Biphenyldisulfonylchlorid und anschließender Hydrolyse. ....	64
Abbildung 3-10: CRP-Immunoaffinitäten Ak-funktionalisierter PE-Chips hergestellt gemäß verschiedener Immobilisierungsmethoden auf mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, <b>6</b> ) modifizierten PE-Chips. Im Inkubationsansatz wurden 10 ng CRP pro PE-Chip vorgelegt. ....	66
Abbildung 3-11: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der ASC-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b). ....	71
Abbildung 3-12: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der DIA-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b). ....	71
Abbildung 3-13: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der EDC-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b). ....	71

Abbildung 3-14: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der CAB-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b). .....	72
Abbildung 3-15: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der SUF-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b). .....	72
Abbildung 3-16: OD-Werte vs. SA-polyHRP Konzentration der ABICAP-Systeme (ASC-, DIA-, EDC-, CAB und SUF-System) mit einer maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter. ....	79
Abbildung 3-17: OD-Werte vs. Detektionsantikörper Konzentration für die verschiedenen ABICAP-Systeme (ASC-, DIA-, EDC-, CAB und SUF-System) mit einer maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter. ....	80
Abbildung 3-18: Halblogarithmische Darstellungen „OD-Wert vs. CRP-Konzentration ( $C_{CRP}$ ) als CRP-Kalibrationskurven von EDA-Cellulosecarbanilat-basierten CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern nach ausgewählten Ak-Immobilisierungsmethoden a) ASC-Methode, b) DIA-Methode, c) EDC-Methode, d) CAB-Methode und e) SUF-Methode bei einer Ak-Beladung von 2 $\mu$ g Anti-h CRP 6404 Ak/Säulenassay (schwarze Kurve) bzw. einer maximal Beladung des Säulenassays (rote Kurve). ....	81
Abbildung 3-19: Schnittfläche zweier EDA-Cellulosecarbanilat-basierter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter, hergestellt a) gemäß DIA-Methode, 3 $\mu$ g Ak-Proteinmenge/PE-Mikrofilter und b) ASC-Methode, 7,5 $\mu$ g Ak-Proteinmenge/PE-Mikrofilter, nach ABICAP-Säulenassay anhand einer CRP-Konz.: 1 ng/ml und Anwendung des spez. Detektionssystems gemäß Kapitel 3.5.2. ....	82
Abbildung 3-20: Balkendarstellung der Lagerstabilität neuer EDA-Cellulosecarbanilat-basierter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter durch „OD-Wert vs. Lagerzeit (Tage)“ in Abhängigkeit von der Anti-h CRP 6404 Ak-Immobilisierungsmethode. ....	83
Abbildung 3-21: Air Jet Quanti 3000 Dispenser der Firma Biodot zum Auftragen der Ak-Fängerbande [ <a href="http://www.biodot.com">www.biodot.com</a> ]. ....	89
Abbildung 3-22: Schematische Darstellung des lateralen DipStick-Testes zur CRP-Konzentrationsbestimmung: a) Zugabe des Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugates zu einer CRP-Lösung definierter Konzentration, b) Eintauchen der Teststreifen in die Lösung aus CRP und Antikörper-Gold-Konjugat c) Flüssigkeitstransport durch die Membran und Komplexbildung aus CRP und an die Gold konjugierten Anti-h CRP 6405 Antikörper d) Bindung des CRP-Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugat-Komplexes an, auf der Membran immobilisierte, Anti-h CRP 6404 Antikörper. Entstehen einer CRP-konzentrationsabhängigen Signalbande. ....	91

*Abbildung 3-23: Musterkarte zur Auswertung der Signalbandenintensität der Teststreifen nach dem lateralen DipStick-Test* ..... 91

*Abbildung 3-24: Teststreifen nach Durchführung des CRP-DipStick-Testes mit verschiedenen CRP-Konzentrationen. Die Antikörperfängerbande auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6) modifizierten PE-Membranen wurde linienförmig mit a) der ASC-Methode, b) der DIA-Methode, c) der EDC-Methode, d) der CAB-Methode und e) der SUF-Methode im Dispersionsverfahren aufgebracht.* ..... 94

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Struktureigenschaften der synthetisierten Aminocellulosederivate. ....	41
Tabelle 3-2: Struktur- und Löslichkeitseigenschaften ausgewählter synthetisierter Aminocellulosederivate ( <b>1b</b> , <b>2b</b> , <b>6</b> und <b>10b</b> ). ....	43
Tabelle 3-3: Ausgewählte Substrate und ihre Größenabmessung, Porosität und Modifizierungsfläche. ....	44
Tabelle 3-4: NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentration, bestimmt mittels Tritylchloridmethode, von unbehandelten, mit O <sub>2</sub> -Plasma vorbehandelten und mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, <b>1b</b> ) modifizierten Polyethylensubstraten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung. ....	47
Tabelle 3-5: NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentrationen Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivat. Die Vorbehandlung erfolgte mit O <sub>2</sub> -Plasma.....	48
Tabelle 3-6: NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentrationen der mit verschiedenen Aminocellulosederivaten modifizierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivat und der Standzeit des Aminocellulosederivates. ....	50
Tabelle 3-7: Vergleich der CRP-Immunoaffinität von Ak-funktionalisierten PE-Chips hergestellt gemäß CAB-Methode und Behandlung der CRP-immunoaffinen PE-Chips mit verschiedenen Reagenzlösungen.....	63
Tabelle 3-8: Vergleich der CRP-Immunoaffinität von Ak-funktionalisierten PE-Chips hergestellt gemäß SUF-Methode und Behandlung der CRP-immunoaffinen PE-Chips mit verschiedenen Reagenzlösungen.....	65
Tabelle 3-9: Ergebnisparameter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter der Probenreihen (a) und (b) ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, <b>6</b> )-modifizierten PE-Mikrofiltern .....	73
Tabelle 3-10: Ergebnisparameter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter gemäß ASC-Methode mit verschiedenen Ak-Beladungen, ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, <b>6</b> )- modifizierten PE-Mikrofiltern.....	75
<i>Tabelle 3-11: Nachweisgrenze der Teststreifen mit den dazugehörigen Signalintensitäten. ....</i>	<i>92</i>
Tabelle 4-1: Bio- und Detektionsreagenzien und Bezugsquellen.....	97
Tabelle 4-2: Angewendete Substrate.....	97

Tabelle 4-3: Lösungen und Puffer zur Oberflächenmodifizierung und Immobilisierung von Biomolekülen.....	98
Tabelle 4-4: 6-Tosylcellulosederivate für die Synthese der Aminocellulosederivate. ....	101
Tabelle 4-5: Homobifunktionelle Reagenzien und Funktionalisierungsbedingungen. ....	107
Tabelle 4-6: Inkubationsbedingungen der Immobilisierungsmethoden.....	109

# 1 Einleitung

Der Begriff *Point-of-Care-Testing* (POCT) bezeichnet medizinische diagnostische Analyseverfahren, welche direkt vor Ort am Patienten durchgeführt werden können. Ein Transport der zu analysierenden Proben vom Patienten in zentrale Labore ist daher nicht notwendig. Sie werden als patientennahe Diagnostik oder wegen der kurzen Analysezeiten auch als Schnelltests bezeichnet. Alle POCT zeichnen sich durch eine einfache Handhabbarkeit und kurze Analysezeiten aus. Typische Einsatzbereiche für POCT sind Schwangerschaftsanalysen, die Bestimmung des Blutzuckerspiegels oder die Kontrolle der Blutgerinnung in Form des INR-Wertes und können vom Patienten selber durchgeführt werden. Andere POCT dienen zum Nachweis von Schadkeimen, Krankheitsindikatoren oder Verunreinigungen.

Durch die kurzen Analysezeiten und einfache Handhabung gewinnen POCT immer mehr an Bedeutung. In der Notfallmedizin können auf Basis der Messergebnisse, z.B. bei der Bestimmung eines Herzinfarktes, schnelle Entscheidungen getroffen werden. Bei der Darmkrebsvorsorge werden POCT eingesetzt, um Tumore früher zu entdecken [Duffy et al. 2011]. Auch in der Kriminalistik kann die patientennahe Diagnostik zur Feststellung von Drogenmissbrauch eingesetzt werden.

Den beschriebenen Vorteilen der POCT gegenüber Standard-Laboruntersuchungen stehen häufig eine methodisch bedingte geringere Sensitivität und Spezifität gegenüber. Dies schränkt die Entwicklung von POCT für Analyten im sensitiven Bereich stark ein.

Die Funktionsweisen der POCT sind sehr verschieden. Ein häufig auftretendes Prinzip basiert auf biologischen Erkennungssystemen in Form von Nukleinsäuren, Rezeptoren, Antikörpern, Enzymen und ganzen Zellen, die gezielt gesuchte Analyten in der zu untersuchenden Probe aufspüren können. Dabei werden durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip zwischen dem Analyten und dem Rezeptorelement selektive und sensitive Analysen möglich, wobei in einem zweiten Schritt eine Visualisierung oder die Umwandlung der Rezeptor-Analyt-Wechselwirkung in ein messbares Signal erfolgt.

An die biologische Komponente eines POCT als Erkennungssystem werden besondere Anforderungen gestellt. Sie muss einen Analyten definitiv und ohne unspezifische

Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen einer Probenlösung detektieren können. Außerdem muss die biologische Komponente auch über längere Zeiträume in dem POCT System stabil sein, damit der POCT bei einer notwendigen Lagerung seine Funktion nicht verliert. POCT mit biologischen Komponenten wie Antikörper als Erkennungssystem werden als immunologische Schnelltests bezeichnet, welche auf den Prinzipien der Immunoassays beruhen und die häufigste Form der POCT-Systeme darstellen. Dabei werden die Antikörper zu meist durch adsorptive Wechselwirkungen in den POCT-Systemen fixiert. Dadurch können die Antikörper aber wieder von der Oberfläche gelöst werden, was Probleme bei der Lagerstabilität und bei der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse verursacht.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Antikörper als Erkennungssystem

Antikörper (Ak) sind Glykoproteine, welche von den Immunsystemen der Wirbeltiere zur spezifischen Abwehr gegen Krankheitserreger in den B-Lymphozyten gebildet werden. Sie gehören zur Familie der Immunglobuline und sind aus zwei identischen schweren (H) und zwei identischen leichten (L) Polypeptidketten aufgebaut. Die Ketten lassen sich jeweils in eine konstante Region und eine variable Region unterscheiden. Die vier Ketten bilden zusammen die typische Y-förmige Struktur eines Antikörpers, wobei die Ketten untereinander durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Am aminoterminalen Ende (N-Terminus) der leichten und schweren Polypeptidketten befinden sich die variablen Enden. Ein variables Ende einer leichten und einer schweren Kette bilden zusammen ein Paratop des Antikörpers. Das Paratop ist der Strukturbereich des Antikörpers, welcher sich spezifisch an einen definierten Strukturbereich eines Antigens (Epitop) binden kann. Das carboxylterminale Ende der Aminosäureketten wird als C-Terminus bezeichnet.

Die beiden leichten Ketten und die oberen Teile der beiden schweren Ketten bilden zusammen das  $F_{ab}$ -Fragment (Fragment antigen binding), welche enzymatisch mit Hilfe von Papain von dem darunter liegenden  $F_c$ -Fragment (crystallisable fragment) abgespalten werden kann. Die Gelenkregion, welche sich durch die Verknüpfungspunkte der schweren Ketten auszeichnet, ist beweglich und ermöglicht eine flexible Anpassung an die Antigenposition. Diese Region wird auch als Hinge-Region bezeichnet. Die Hinge-Region ist außerdem eine Spaltungsstelle der Immunglobulin G (IgG)-Antikörper [Janeway, Travers 1995] und wird umgeben von der Kohlenhydratgruppe, welche kovalent mit dem Proteinanteil verknüpft ist.

Hinsichtlich der Größe, Struktur und ihrer Funktion lassen sich die Antikörper in verschiedene Klassen einteilen. Bekannt sind die Immunglobuline A (IgA), M (IgM), G (IgG), D (IgD) und E (IgE) [Christopoulos, Diamandis 1996].

Die Abbildung 2-1 zeigt die schematische Darstellung eines IgG-Moleküls, welches mit 75 % den Hauptteil der vorkommenden Antikörper ausmacht und für eine längere nachhaltige

Immunantwort verantwortlich ist. IgA und IgM bilden die erste Immunantwort gegen bakterielle und virale Infektionen. IgM fungiert außerdem als Signalgeber für das Komplementsystem der Immunantwort. IgE dient als Abwehr gegen parasitäre Infektionen wie beispielsweise Würmer oder Plasmodien. Die Funktion des IgD ist noch nicht vollkommen aufgeklärt.

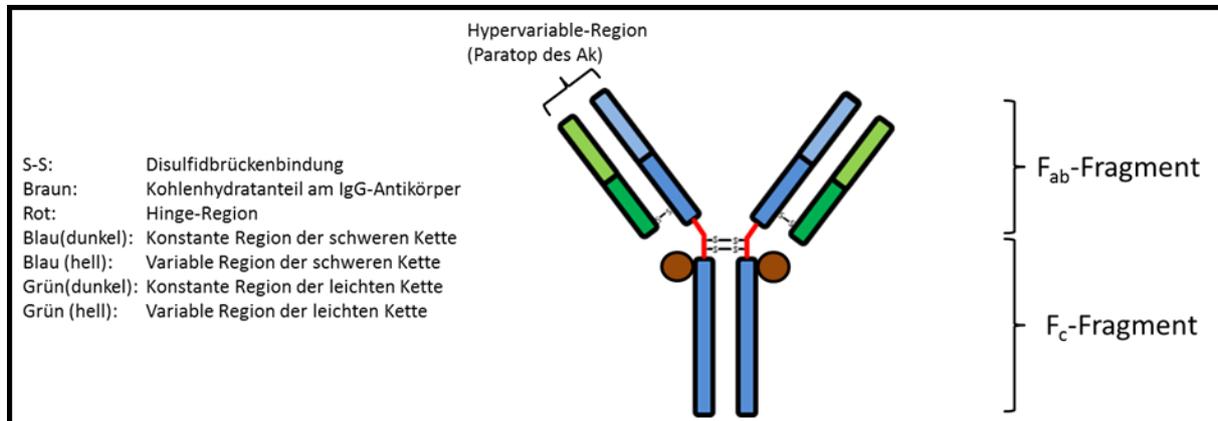


Abbildung 2-1: Struktur eines IgG-Antikörpers bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten.

Von Bedeutung für diagnostische Anwendungen sind die Antikörper vor allem wegen ihrer Antigen-Spezifität und Affinität, weshalb sie nicht nur zur Therapie sondern auch als Werkzeug in der Analytik (Diagnostik) eingesetzt werden.

### 2.1.1 Herstellung von Antikörpern

Antikörper können aus dem Blut immunisierter Tiere gewonnen werden, wobei man stets ein Gemisch verschiedener Antikörpermoleküle erhält. Die IgG-Antikörper können über eine Protein A-Säule abgetrennt und aufgereinigt werden. Jedoch sind die gewonnenen IgG-Antikörper gegen verschiedene Epitope gerichtet (Polyklonale Antikörper) [Glick, Pasternak 1995].

Antikörper die nur gegen ein spezifisches Epitop gerichtet sind (monoklonale Antikörper) erhält man mit Hilfe der Hybridoma-Technik [Kohler, Milstein 1975]. Dabei wird ein Labortier mit einem gewünschten Antigen (Ag) immunisiert. Die B-Lymphozyten aus der Milz des immunisierten Tieres werden mit Tumorzellen fusioniert. Tumorzellen sind unbegrenzt teilbar und dadurch unsterblich, wodurch stabile B-Lymphozyten-Hybridomas gewonnen werden. Diese Zellen produzieren spezifische Antikörper, wobei ein geeigneter aus den verschiedenen B-Lymphozyten-Hybridomas selektiert wird. Durch Zellkultur der selektierten Zellen kann der gewünschte Antikörper aus dem Zellkulturmedium gewonnen werden. Es

werden durch Selektion verschiedener B-Lymphozyten-Hybridomas mehrere verschiedene Klone der Antikörper gewonnen, welche gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind. Durch diese Technik können die monoklonalen Antikörper reproduzierbar mit exakt derselben Spezifität hergestellt werden.

### **2.1.2 Antikörper-Antigen-Wechselwirkung**

Es können Antikörper, die selektiv gegen die verschiedenste Substanzen – wie Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und andere Stoffe – gerichtet sind, gewonnen werden. Das Antigen gilt als Substanz, gegen die eine Immunantwort des Wirts hervorgerufen wird und dadurch Antikörper gebildet werden. Die Fähigkeit zur Immunantwort durch ein Antigen wird als Immunogenität bezeichnet. Kleinere Moleküle besitzen oft keine Immunogenität, können aber durch Kopplung an ein größeres Molekül zu Antigenen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die gewonnenen Antikörper gegen ein Epitop des kleineren Moleküls gerichtet sind und nicht gegen das große Trägermolekül. Da ein Epitop nur eine sehr kleine Region des Antigens umfasst, kann es vorkommen, dass ein anderes Antigen ein gleiches Epitop besitzt. Sind mehrere gleiche Epitope auf einem Antigen vorhanden, kann es mit den Antikörpern zu Kreuzreaktionen kommen. Ein Antigen kann aber gleichzeitig auch mehrere Epitope besitzen wodurch die unterschiedliche Spezifität verschiedener Antikörperklone bedingt wird. [Raem, Rauch 2006]

Die Bindung eines Antigens an einen Antikörper führt zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes und geschieht über die Ausbildung von verschiedenen nicht-kovalenten Bindungen. Konkret bestehen die Wechselwirkungen aus van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen. Die Kräfte können nur bei einer räumlichen Annäherung der interagierenden Gruppen wirksam werden. Die Summe der einzelnen Wechselwirkungen ergibt dabei eine hohe Bindungsenergie. Typische Bindungskonstanten liegen bei Antigen-Antikörper-Komplexen bei  $10^7$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1}$ . [Raem, Rauch 2006]

## **2.2 Prinzip eines diagnostischen Immunoassays**

Als Immunoassay bezeichnet man im Allgemeinen die Erkennung und damit den Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung an eine Erkennungsstruktur, z.B.

einen Antikörper. Anstelle eines Antikörpers können auch Aptamere, Rezeptoren oder andere spezifische Erkennungsstrukturen eingesetzt werden. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Analyt sein [Raem, Rauch 2006].

Es gibt verschiedene Prinzipien bei der Durchführung von Immunoassays. Die wichtigsten Prinzipien lassen sich in kompetitiv (direkt und indirekt) und nicht-kompetitive Assayformate einteilen [Bergmeyer et al. 1974]. Dabei ist zur Entwicklung eines Immunoassays grundsätzlich immer mindestens ein Antikörper zur Bindung des Analyten notwendig. Sind mehrere Antikörper für den Analyten vorhanden, können so genannte Sandwichassays (nicht-kompetitives Assayformat) zum Nachweis durchgeführt werden, welche sich durch eine höhere Spezifität gegenüber kompetitiven oder direkten Immunoassays auszeichnen.

Bei einem Sandwichassay wird ein Antikörper auf einer festen Phase immobilisiert, welcher als Fängerantikörper bezeichnet wird. Nachdem die mit dem Fängerantikörper beschichtete Oberfläche mit dem Analyten inkubiert wurde, kann in einem weiteren Schritt ein Detektionsantikörper, welcher an einem anderen Epitop des Antigens bindet und mit einer Markierung versehen ist, an die Oberfläche binden. Durch die Markierung des Detektionsantikörpers kann ein von der Analytkonzentration abhängiges Signal erhalten werden (Abbildung 2-2). [Raem, Rauch 2006]

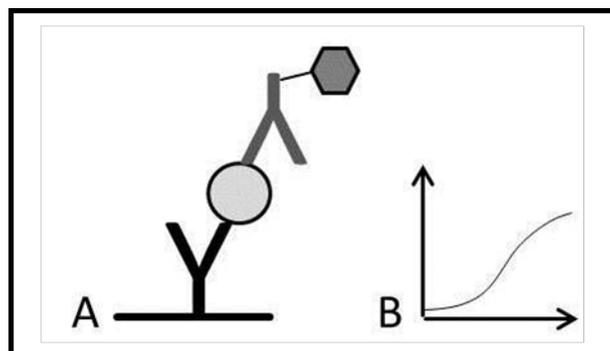


Abbildung 2-2: A) Aufbau eines Sandwich-Assays. B) Das Signal ist direkt proportional zur Analyt-Konzentration [Raem, Rauch 2006].

Die hohe Spezifität und Affinität der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung haben Immunoassays zu einer weitverbreiteten Diagnostik-Methode gemacht. Sie werden seit über 40 Jahren unter anderem in der medizinischen Diagnostik, zur Detektion von Verunreinigungen im Wasser oder zur Detektion von spezifischen Molekülen in biologischen Prozessen eingesetzt. [Raem, Rauch 2006]

Zu den bekanntesten Immunoassays gehört der ELISA (enzym-linked-immunosorbent-assay) [Engvall, Perlmann 1971]. Dabei werden Antikörper an eine Mikrotiterplatte (feste Phase) immobilisiert, wodurch der Analyt aus einer flüssigen Phase separiert werden kann. Durch einen Detektionsantikörper, welcher mit einem Enzym markiert ist, kann in weiteren Schritten durch eine enzymatische Reaktion der Analyt indirekt nachgewiesen werden.

### **2.2.1 Antikörperkonjugate**

Es sind eine Menge Markierungen für den Detektionsantikörper bekannt. Diese werden in der Regel kovalent mit dem Antikörper verknüpft und bilden damit Antikörperkonjugate. Die ersten Markierungen waren radioaktive Markierungen für sogenannte RIA (Radioimmunoassays) [Van Weeman, Schuurs 1971; Stimson, Sinclair 1974]. Weitere Möglichkeiten zur Markierung des Detektionsantikörpers sind Enzyme, Fluoreszenz-, Chemo- und Biolumineszenzmoleküle oder auch Farb- oder magnetische Stoffe in Partikelform. Die Bestimmung des Immunoassaysignals erfolgt je nach gewünschter Markierung des Antikörpers beispielsweise durch Ermittlung der Fluoreszenzintensität, des Farbsignals oder der magnetischen Feldstärke.

Die Markierungen und Messsysteme verschiedener Immunoassays haben dabei unterschiedliche Anforderungen an die Probenvorbereitung, den Messaufwand und die Sensitivität.

#### **2.2.1.1 Antikörper-Gold-Konjugate**

Antikörper-Gold-Konjugate gewinnt man durch Konjugation von Antikörpern an kolloidales Gold. Das kolloidale Gold wird meistens aus Tetrachlorgoldsäure und einem Reduktionsmittel wie Natriumcitrat oder Natriumborhydrid gewonnen. Die erhaltenen Goldnanopartikel sind zwischen 10-80 nm groß und intensiv rot gefärbt. Wegen der intensiven Farbe sowie der Möglichkeit relativ einfach Antikörper an die Goldkolloide zu konjugieren, sind Antikörper-Gold-Konjugate beliebte Detektionsmarkierungen der Antikörper.

Bei der Konjugation von Antikörpern an die Goldkolloide werden die Goldkolloide vorgelegt und die Antikörperlösung dazu getropft. Da die Affinität von Antikörpern zur Goldoberfläche sehr groß ist, binden die Antikörper an die Goldkolloid unter der Ausbildung von Antikörper-Gold-Konjugaten. Die Kenntnisse über den Bindungsmechanismus sind dabei für die Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten von gleichbleibender guter Qualität wichtig.

Allgemein wird angenommen, dass die Reste der Aminosäuren Lysin, Tryptophan und Cystein einen großen Einfluss auf den Bindungsmechanismus haben. Das positiv geladene Lysin wird von den negativ geladenen Goldpartikeln angezogen wodurch sie die Antikörper und das Goldpartikel annähern. Das Tryptophan wird über die Ausbildung von hydrophoben an das Goldkolloid gebunden und das Cystein bildet mit dem Goldpartikel Disulfidbrückenbindungen aus [Raem, Rauch 2006]. Je nach Größe der Goldpartikel werden dabei zwischen 10-30 Antikörpermoleküle pro Goldnanopartikel gebunden. Die optimale Größe der Goldkolloide für die Herstellung von Gold-Antikörper-Konjugaten beträgt ca. 40 nm [Robinson-Dunn 2002].

### 2.2.2 4-Parameter-Logistik zur Auswertung von Antigen-Antikörper Bindungskurven

Kalibrationskurven für Analyt-Bindungsassays in Abhängigkeit von der Analytkonzentration werden generell nach einem nicht-linearen Zusammenhang charakterisiert. Typischerweise zeigen die erhaltenen Signalintensitäten der Bindungsassays einen sigmoidalen Kurvenverlauf gegenüber den logarithmisch aufgetragenen Analytkonzentrationen.

Das aktuell akzeptierte Modell zur Auswertung dieser sigmoidalen Bindungskurven ist das 4-Parameter-Logistik (4PL) Modell, welches Exaktheit und Präzision für den auswertbaren Konzentrationsbereich, gegenüber einer linearen Auswertung, optimiert [Findlay, Dillard 2007]. Formel 2-1 beschreibt das 4PL Modell.

Formel 2-1:

$$F(x) = \frac{A2 + (A1 - A2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

*A2=obere Asymptote, A1=untere Asymptote, x<sub>0</sub>=Wendepunkt der Kurve, p=Anstieg der Kurve*

Die untere Asymptote (A1) stellt das Signal ohne Analyten dar. Der Wendepunkt von einem konkaven zu einem konvexen Kurvenverlauf wird von x<sub>0</sub> beschrieben. Der Konzentrationsbereich bei der eine Änderung der Analytkonzentration eine signifikante Änderung des Signals hervorruft, wird als dynamischer Bereich bezeichnet. Der Anstieg der Kurve (p) ist mitbestimmend für den dynamischen Bereich des Analyt-Bindungsassays. Die obere Asymptote (A2) stellt den Bereich dar, bei der theoretisch alle Antigenbindungsstellen der vorhandenen Antikörper belegt sind. Die Signalintensität ist an diesem Punkt am höchsten.

In Abbildung 2-3 ist eine typisch 4PL Auswertung für eine sigmoidalen Signal-Konzentrationszusammenhang abgebildet.

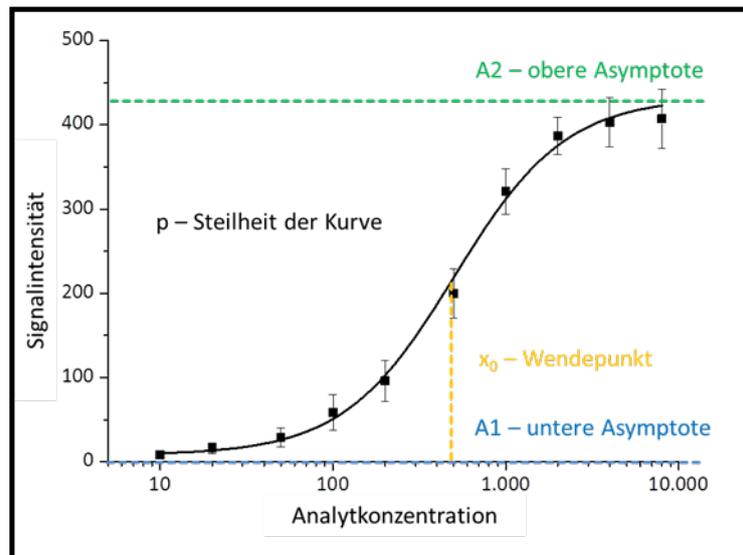


Abbildung 2-3: Sigmoidaler Kurvenverlauf eines Analyt-Bindungsassays ausgewertet mit der 4PL.

### 2.2.3 Immunologische Schnelltest

Immunologische Schnelltest sind Bindungsassays und basieren auf dem gleichen Prinzip wie Immunoassays. Zusätzlich zeichnen sie sich durch eine einfache Handhabung und kurze Analysezeiten aus und benötigen in der Regel kein teures Equipment zur Durchführung, weshalb sie zu den POCT zugeordnet werden.

Immunologische Schnelltests laufen prinzipiell in zwei sequenziellen Schritten ab. Die Analyt-Erkennung durch Bindung über eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung und die anschließende Signalerzeugung durch einen markierten Detektionsantikörper, der das Analyt-Konzentrationsignal durch eine konzentrationsabhängige Markerfunktion in ein messbares Signal umwandelt.

Immunologische Schnelltest werden im klinischen Bereich, aber auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik zum Nachweis von Krankheitsindikatoren, Verunreinigungen und Schadkeimen, eingesetzt.

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Schnelltestformen, wobei überwiegend heterogene Assayformate eingesetzt werden. Die häufigste Assayträgerform ist die Membran, daneben gibt es Assayformate auf Basis von Partikeln, Formkörpern, Chips oder Platten.

An Assayträger für immunologische Schnelltests werden besondere Herausforderungen gestellt. Neben den biokompatiblen Eigenschaften müssen die Antikörper fest auf der Oberfläche fixiert werden können. Hinzu müssen die Reagenzien des Assays reproduzierbar durch die Assayträger transportiert werden. Schlussendlich muss es möglich sein, ein Signal auf dem Assayträger auszulesen.

### 2.2.3.1 Schnelltest im Lateralfluss-Assayformat (Lateral-Flow-Assays, LFA)

Die wichtigsten Immunologischen Schnelltests sind sogenannte Streifenassays im Lateralfluss-Assayformat bei denen eine poröse Membran den Assayträger darstellt. Ein entwickelter LFA führt in nur einem Arbeitsschritt, der Probenaufgabe, zu einem Testresultat. Weltweit werden derzeit jährlich mehrere hundert Millionen *Lateral-Flow-Assays* zur medizinischen Diagnostik verkauft.

Die *Lateral-Flow-Assays* (LFA) basieren auf dem gleichen Prinzip wie andere immunologische Assays und nutzen den Effekt der Antikörper-Antigen-Reaktion aus. Die Probe wird dabei auf ein, an der Oberseite einer Trägermembran aufgebrachtes, *Sample-Pad* aufgetragen und reagiert während der Wanderung durch das *Konjugate-Release-Pad* mit dem dort eingebrachten Antikörperkonjugat. In der Regel werden dabei Antikörperkonjugate aus Gold- oder Latex-Nanopartikeln eingesetzt. Diese gebildeten Komplexe wandern weiter durch die Trägermembran und werden auf der Trägermembran an immobilisierten Fängerantikörpern festgehalten (Bindungsstellen). Dadurch entsteht eine Analytkonzentrationsabhängige gefärbte Bande auf der Trägermembran. Die überschüssige Flüssigkeit mit dem an den Bindungsstellen nicht gebundenen Konjugat strömt weiter durch das Membransystem bis sie von einem Filterpapier, dem *Absorbent-Pad*, aufgesaugt wird und somit ein Rückfluss verhindert wird (Abbildung 2-4). [Wong, Tse 2010]

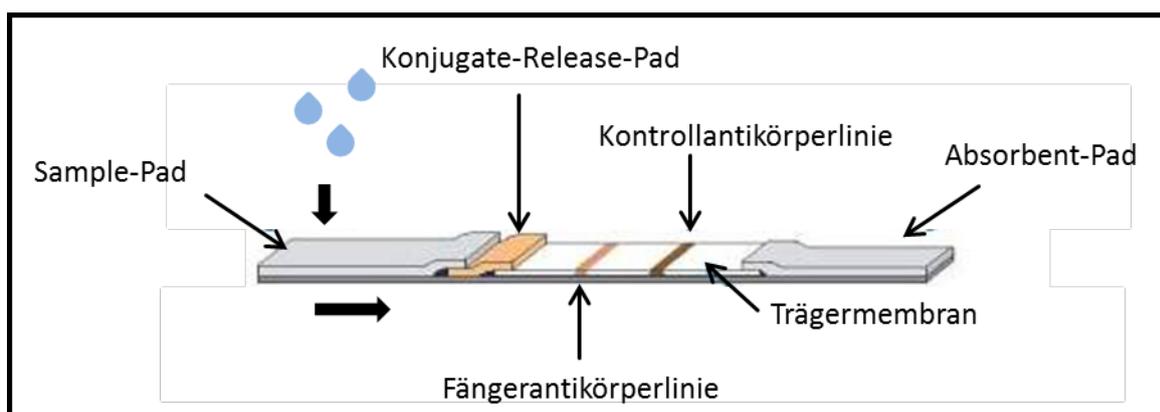


Abbildung 2-4: Typischer Aufbau eines Lateral-Flow-Immunoassays [Wong, Tse 2010].

Die Trägermembranen werden heute aufgrund der kostengünstigen Herstellung, der hohen Bindungskapazität sowie der einfachen Immobilisierung der Antikörper an die Membranen fast ausschließlich auf der Basis von Nitrocellulose hergestellt. Neben der einfachen Herstellungstechnologie für die Trägermembran ist die einfache Handhabung der LFA einer der Hauptgründe für die hohe Marktdurchdringung. [Posthuma-Trumpie, Aart van Amerongen 2009].

Die Bindung der Fängerantikörper an die Nitrocellulosemembran erfolgt durch Physisorption an die Nitrocellulose. Dadurch, dass bei der Physisorption keine langen Reaktionszeiten nötig sind, können auf die Nitrocellulosemembranen definierte Fängerantikörperlinien erzeugt werden. Diese werden durch Auftragen von Antikörperlösungen auf die Membranen mit Hilfe von feinen Sprühdüsen erzeugt. Jedoch können die aufgetragenen Antikörper lateral migrieren und damit unscharfe Linien erzeugen. Des Weiteren sind bei den Nitrocellulosemembranen, wegen der durch Physisorption fixierten Fängerantikörper, Matrixeffekte ein weiteres häufig auftretendes Problem. Matrixeffekte sind die Summe der Störeffekte aller Komponenten, die in einer Probe vorkommen und die Messung des Zielanalyten beeinflussen [Wood 1991]. Durch die schnelle Bindungskinetik der Physisorption können beispielsweise Bestandteile von Realproben unspezifisch an die Membran binden und damit falsche positive Ergebnisse erzeugen, wodurch aufwändige Blockierungsschritte auf der Membran notwendig sind. Außerdem kann auch die Bindung der Fängerantikörper auf der Nitrocellulosemembran beeinflusst werden, sodass diese teilweise desorbieren (ausbluten), was zu Sensitivitätsverlusten der Streifentests und damit auch zu großen Variationskoeffizienten beim Auslesen der Streifentests führt. [Posthuma-Trumpie, Aart van Amerongen 2009]

Außerdem ist die Porosität und damit die Fließgeschwindigkeit (lateraler Sogeffekt) von Nitrocellulosemembranen herstellungsbedingt Schwankungen unterworfen. Dies führt zu schwankenden Flussraten, die über die Bindungskinetik das Testergebnis wesentlich beeinflussen und Ungenauigkeiten erzeugen.

Die resultierenden Hauptnachteile der Streifentests auf Nitrocellulosebasis sind relativ hohe Nachweisgrenzen, schlechte Präzision und ein eingeschränkter dynamischer Bereich. Tests nach dem Lateralfuss-Prinzip werden daher überwiegend für semiquantitative Analysen eingesetzt. Es hat in der Vergangenheit vielfältige Versuche gegeben, diese Teststreifen quantitativ, entweder reflektometrisch, fluorimetrisch oder magnetometrisch auszulesen.

Dies ist bisher nur eingeschränkt gelungen. Versuche mit alternativen Membranen (Nylon, Polyethylen, Polyamid) haben in der Breite bisher nicht zur Beseitigung der geschilderten Probleme geführt. [Posthuma-Trumpie, Aart van Amerongen 2009]

Trotz der geschilderten Probleme sind Lateralfluss-Tests, wie eingangs bereits dargestellt, wegen der relativ einfachen Herstellung und Handhabung weit verbreitet. Der Einsatzschwerpunkt liegt bisher wegen der geschilderten Probleme jedoch nur im Bereich der qualitativen und semiquantitativen Analysen.

### **2.2.3.2 Schnelltests im Durchfluss-Assayformat**

Immunologische Schnelltests im Durchfluss-Assayformat basieren auf dem gleichen biochemischen Funktionsprinzip wie das Lateral-Assayformat. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die Zugabe der Probe-, Konjugat- und zusätzlichen Waschlösungen sequentiell auf einen dreidimensionalen porösen Formkörper, an welchen Fängerantikörper immobilisiert sind, erfolgt. Die Lösungen fließen dabei nicht lateral sondern im Durchfluss durch den porösen Formkörper. Alle Lösungen und deren Bestandteile, wie Analyten und Detektionsreagenzien, fließen dabei in die Tiefe des Filters. Dadurch können zum einen aus größeren Probenvolumina Analyten auf der Oberfläche des porösen Formkörpers angereichert werden. Andererseits sind dadurch große Mengen zu immobilisierender Fängerantikörper nötig, da auf der gesamten Oberfläche des porösen Formkörpers Antikörper immobilisiert werden. Aufgrund der kostenintensiveren Herstellung (benötigte Antikörpermengen) sowie des höheren manuellen Aufwands und der längeren Analysezeiten (10-30 Minuten) sind Durchfluss-Assays weniger verbreitet als Streifentests.

Auftretende Probleme der Durchfluss-Assays sind prinzipiell mit denen von Streifentests vergleichbar, wobei mit Durchfluss-Assays aber deutlich bessere Präzessionen erreichbar sind.

Eine sehr sensitive Detektionstechnik für Durchfluss-Assays basiert auf einer enzymatischen Reaktion. Dabei werden Meerrettichperoxidase-markierte Sekundärantikörper zur Detektion eingesetzt. In Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) und Wasserstoffperoxid wird ein farbloses Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), zu einem blaugefärbten TMB-Radikalkation oxidiert (Abbildung 2-5). In gebrauchsfertigen Substratlösungen, speziell für den Einsatz für Durchfluss-Assays, sind neben dem Substrat und dem Wasserstoffperoxid anionische Dextransulfate enthalten. Dadurch präzipitiert das gebildete blaugefärbte TMB-

Radikalkation in den Poren der porösen Formkörper und verursacht damit eine von der HRP-Menge abhängige Färbung der porösen Formkörper.

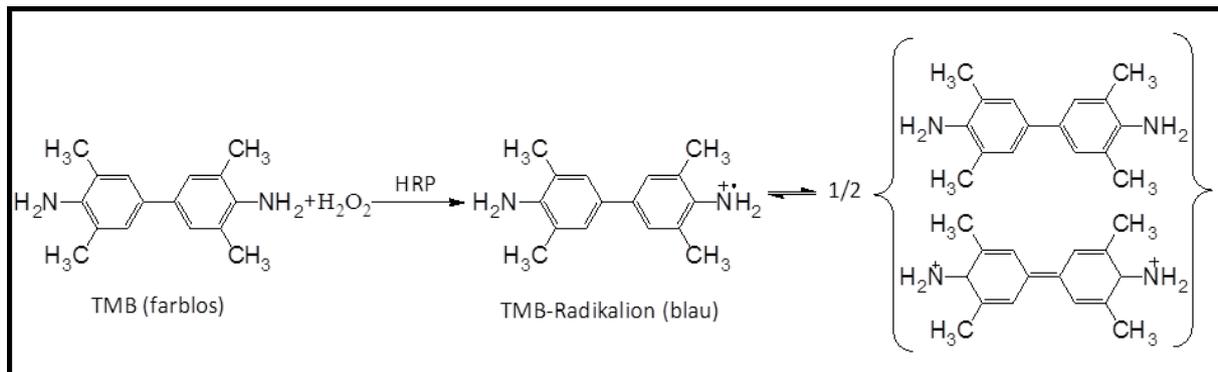


Abbildung 2-5: Formelschema der Oxidation von farblosem TMB mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von HRP zu einem blauen TMB-Radikalion.

### ABICAP-System, ein Durchfluss-Assay Format

Eine besonders günstige Bauform eines Durchfluss-Assayformates, die auf porösem Polyethylen (PE)-Formkörpern in einer Mikrosäule basiert, ist in Abbildung 2-6 illustriert. Diese Mikrosäulenmethode, auch ABICAP-System (Antibody Immuno Column for Analytical Purpose) genannt, wurde von Hartmann et al. [1993] zum Nachweis von Anaphylaxtoxin C3a und C5a entwickelt. Üblicherweise werden die Antikörper dabei über die adsorptive Bindung an PE-Formkörper gebunden, was zu ähnlichen Problemen wie bei den LFA auf Nitrocellulosebasis führt [Gessler et al. 2005, Tomaso et al. 2007, Lucht et al. 2007].

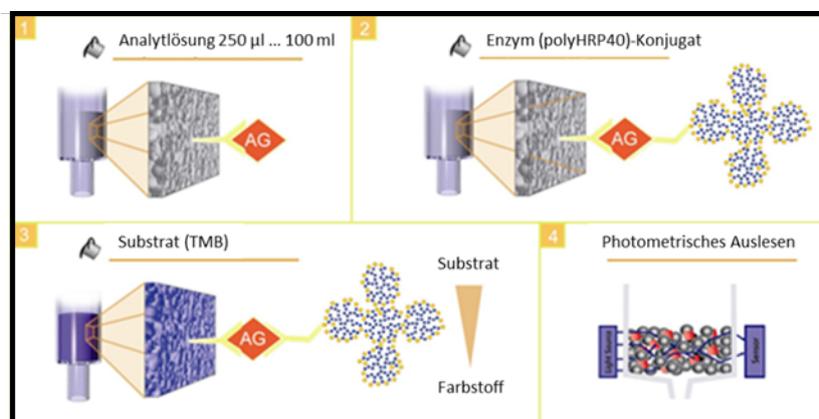


Abbildung 2-6: Pipettierschema eines Durchfluss-Immunoassays (ABICAP-System) mit photometrischer Auswertung via Enzymmarker; 1) Bindung des Analyten auf einem Mikrofilter mit immobilisiertem Fänger-Ak, 2) Bildung eines Sandwichkomplexes mit einem Antikörper-polyHRP-Konjugat, 3) Anfärben des Filters durch Zugabe von präzipitierendem 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB), 4) photo-metrische Auswertung in Transmission ( $d=5$  mm, Lichtdiffusionsprinzip). [Senova GmbH]

Meyer et al. [2007b] gelang es, Antikörper kovalent auf den PE-Formkörpern für das ABICAP-System zu immobilisieren. Dazu wurde die PE-Oberfläche nach Ozonaktivierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTS) modifiziert, wodurch Aminogruppen zur anschließenden kovalenten Immobilisierung von Antikörpern zur Verfügung standen (vgl. Kapitel 2.6.2). Jedoch konnten dadurch die Probleme der zuvor verwendeten adsorptiven Bindung – wie das Ausbluten der Antikörper - nicht behoben werden. Durch Hydrolyse der Aminopropyltrialkoxysilane bei der Silanisierungsreaktion kommt es zur Selbstkondensation und damit zu Crosslinking, wodurch sich topografische Verwerfungen ausbilden. Außerdem desorbieren einmal immobilisierte Antikörper durch die Hydrolyse der Silanolbindung während und nach der Ak-Immobilisierung [Crampton et al. 2005, Dekeyser et al. 2008]. Dieses teilweise Desorbieren der Antikörper führt zu den gleichen Problemen wie das Desorbieren der durch Physisorption gebundenen Antikörper.

Durch den Vorteil, dass sich poröse PE-Formkörper für Durchfluss-Assays in Laborversuchen einfacher modifizieren (Batch-Verfahren) lassen und zum Auslesen gegenüber Lateral-Flow-Membranen eigens dafür vorgesehene Auslesegeräte (ABICAP-Reader) vorhanden sind, sollen im Rahmen der Arbeit die geplanten kovalenten Ak-Immobilisierungsansätze auf den porösen 3D-PE-Formkörpern (PE-Mikrofiltern) erfolgen.

### **2.3 Grundlagen des C-reaktiven Proteins (CRP)**

Das C-reaktive Protein wurde erstmals 1930 an der Rockefeller University (USA) von Tillett und Francis beschrieben [Tillett, Francis 1930]. Hierbei wurde die Präzipitation dieses Blutserumproteins mit Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) bzw. ihrem C-Faktor (ein zellwandgebundenes Polysaccharid) beobachtet. Dies führte zur Namensgebung des C-reaktiven Proteins.

CRP gehört zu der phylogenetisch alten und hoch konservierten Gruppe der Pentraxine und ist aus fünf gleichen, jeweils ~23 kDa großen Untereinheiten aufgebaut (Abbildung 2-7). [Shrive et al. 1996]

Es wird in der Leber synthetisiert und gehört zu den Akutphaseproteinen der menschlichen Immunantwort. CRP bindet an Phosphocholin, welches sich an der Oberfläche von toten oder absterbenden Zellen (und einigen Arten von Bakterien) findet. Das gebundene CRP

aktiviert das Komplementsystem, bindet an Fresszellen und setzt so humorale und zelluläre Effektormechanismen des unspezifischen Immunsystems in Gang. Dieser unspezifische Abwehrmechanismus ist erheblich schneller als die Reaktion des spezifischen Immunsystems. [Du Clos 2000]

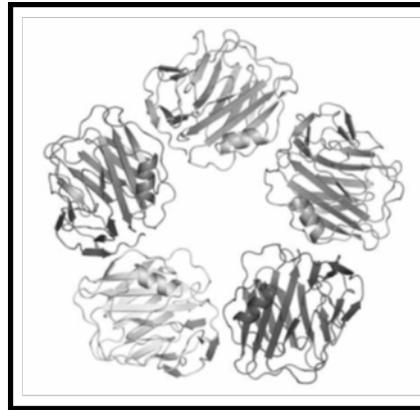


Abbildung 2-7: Graphische Darstellung eines CRP-Moleküls [Shrive et al. 1996].

Durch die Bildung von CRP als eine Reaktion auf eine Infektion ist es als unspezifischer Entzündungsparameter geeignet. Anhand des Anstiegs der CRP-Serumkonzentration kann zwischen einer viralen oder bakteriellen Infektion unterschieden werden. Ausgehend von einem Normalwert, der kleiner 5 mg/l Blut ist, steigt bei einer viralen Infektion die Konzentration auf maximal 10 mg/l Blut. Bei einer bakteriellen Infektion ist ein Ansteigen um ein 100- bis 1000-faches zu beobachten. Als typische bakterielle Infektion ist die Blutvergiftung, bakterielle Hirnhaut- und Lungenentzündung sowie die Harnwegs- bzw. Blasenentzündung zu nennen. [Leung et al. 2008]

Neben der Differenzierung zwischen bakterieller und viraler Infektion wird der CRP-Parameter auch zur Prognose nach einem Herzinfarkt [Thompson et al. 1999] herangezogen. Des Weiteren wird die CRP-Diagnostik auch zur Verlaufskontrolle einer antibiotischen oder antiinflammatorischen Therapie verwendet. Außerdem konnte eine Erhöhung der CRP-Konzentration im Blut auch in Verbindung mit einer rheumatischen Entzündung wie der Arteriosklerose gebracht werden [Mazer, Rabbani 2004]. Genauso fanden sich erhöhte CRP-Werte bei Morbus-Crohn-Patienten [Vermeire et al. 2004] und in Verbindung mit Darmkrebs [Erlinger 2004].

### 2.3.1 Nachweismethoden von CRP

CRP kann bei allen oben genannten Fällen zur frühen Diagnostik als Indikator verwendet werden. In der Praxis werden etablierte ELISAs zum Nachweis von CRP im Blut verwendet. Es gibt kommerziell verfügbare Systeme mit Sensitivitäten bis zu 0,2 mg/l [Dominici et al. 2004, Clarke et al. 2005].

*Point-of-Care-Tests* für CRP, welche sich durch schnelle Analysezeiten (2-5 min) und geringe Probenvolumina auszeichnen und zur medizinischen Diagnostik eingesetzt werden sind ebenfalls auf dem Markt erhältlich [Marcus et al. 2008].

Es sind viele weitere verschiedenste Technologien und Detektionstechniken zur Detektion von CRP wie beispielsweise Immunoturbidimetry [Peltola et al. 1984; Keevil et al. 1998], magnetischer Permeabilität [Kriz et al. 2005] oder Fluoreszenz-Detektion [Koskinen et al. 2004] in der Literatur beschrieben. Sehr sensitive CRP-Konzentrationsbestimmungen werden mit Fluoresceindiacetat-Detektionskonjugaten erhalten [Sin et al. 2006]. Außerdem ist die Arbeit von Meyer et al. [2007] zu erwähnen, bei der die CRP-Konzentration mit Hilfe magnetischer Detektion bestimmt wurde. Das System zeichnete sich durch geringe Nachweisgrenzen (NWG) von 25 ng/ml und einen breiten dynamischen Bereich von zwei log-Stufen aus.

## 2.4 Oberflächenmodifizierung von Assayträgern

Oberflächenmodifizierungen von Assayträgeroberflächen stehen für eine Reihe von Bioanwendungen wie beispielsweise der Entwicklung von Immunosensoren im Fokus der Wissenschaft. An die Oberflächen von Assayträgern werden große Anforderungen gestellt. Sie müssen kompatibel mit den biologischen Komponenten (Antikörpern) sein und dürfen deren Funktionalität nicht beeinflussen. Außerdem muss es möglich sein, die Biomoleküle fest auf die Oberfläche zu fixieren. In diesem Zusammenhang werden große Erwartungen an die Oberflächenmodifizierung durch *Self-assembled-Monolayer* (SAM) oder definierte *Self-assembled-Multilayer*-Schichten gestellt [Göpel et al. 1995; Duke, Plummer 2002; Senaratne et al. 2005]. Diese bieten zum einem die Möglichkeit, die Kompatibilität gegenüber den Biokomponenten zu gewährleisten und zum anderen gezielte Funktionalisierungen für die Proteinimmobilisierung auf der Oberfläche einzuführen. Beispielsweise können Glas-, Silica-,

Metall- oder Metalloxid-Oberflächen durch Silanisierung modifiziert werden [Ulman 1990, Pirrung 2002, Niwa et al. 2004]. Für Goldoberflächen werden funktionalisierte Thiolreagenzien zur Modifizierung eingesetzt [Rickert et al. 1996, Niemeyer 2001]. Weit verbreitet zur Modifizierung verschiedenster Oberflächen mit verschiedensten funktionellen Gruppen sind funktionalisierte Polymere wie Polyethylenglycol, Dextrane, Polyethylenimin oder Dendrimere [Piehler et al. 1996, Metzger et al. 1999, Sorribas et al. 2002, Yakoleva et al. 2003, Palkovits et al. 2003, Fischer, Vögtle 1999, Boubbou, Ghaddar 2005].

Praktische und vielversprechende Prozeduren zur Erzeugung biokompatibler Oberflächenstrukturen durch SAM wurden mit Hilfe von neuartigen Aminocellulosederivaten beschrieben. Mit den Aminocellulosederivaten konnten dabei verschiedene Materialoberflächen wie Glas, Silicon, Gold, Polymere oder Implantat-Materialien (Polymetacrylat, Polydimethylsiloxan) modifiziert werden [Jung et al. 2007]. Die erhaltenen nanostrukturierten Oberflächen bewiesen sich als geeignete biokompatible Oberflächen zur Immobilisierung von Enzymen unter Erhalt der maximalen Enzymfunktionalität und stehen im Fokus der Arbeit.

### 2.5 Filmbildende Aminocellulosederivate

Das erste aminogruppenhaltige Cellulosederivat, welches in dieser Arbeit als Aminocellulosederivat bezeichnet wird, wurde von Berlin et al. [1997] beschrieben. Dabei handelte es sich um 6-deoxy-6-(4-aminophenyl)amino-2(3)-O-tosylcellulose (PDA-Cellulose) mit einem *p*-Phenylendiamin-Rest an Position C6 der Anhydro-Glucose-Einheit (AGE).

Neben dem *p*-Phenylendiamin-Rest an C6 der AGE gelang es Tiller et al. [2000] Carbanilat-, Tosylat-, Acetyl-, Benzoyl- und Methylsubstituenten an den Positionen C2 und C3 der AGE einzuführen.

Die Synthese der Aminocellulosederivate erfolgt durch Lösen von Cellulose in DMA/Lithiumchlorid und Umsetzung der Cellulose mit *p*-Toluensulfonsäurechlorid. Dadurch wurden Tosylatgruppen selektiv an Position C6 der AGE eingeführt. In folgenden Reaktionsschritten konnten löslichkeitsvermittelnde Gruppen (S) wie Carbanilat, Tosylat, Acetyl, Benzoyl oder Methyl-Substituenten an Position C2/C3 der Tosylcellulose eingeführt werden [Berlin et al. 2003]. Durch nucleophile Substitution der Tosylatgruppen der



Dimethylacetamid (DMA), N,N-Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich und werden als Aminocellulosecarbanilate bezeichnet.

Bei Lagerung der Aminocellulosederivate als Feststoff verlieren diese in Abhängigkeit der Substituenten an Position C6 und C2/C3 der AGE ihre Löslichkeit in den entsprechenden Lösungsmitteln (LM). So sind die wasserlöslichen Aminocellulosederivate mit Alkyldiamin-Substituenten an Position C6 schon nach wenigen Tagen nicht mehr in Wasser löslich [Tiller et al. 2001], weshalb sich eine Lagerung der Aminocellulose im entsprechenden Lösungsmittel empfiehlt. Bereits von Tiller et al. [2001] wurde der Verlust der Löslichkeit durch die Lagerung als Feststoff des PDA-Cellulosederivates diskutiert. Man ging davon aus, dass sich zwischen den Aminogruppen und freien Hydroxylgruppen der AGE Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Außerdem kommt es durch Reaktion der freien Aminogruppen mit restlichen Tosylatgruppen an der AGE zu einem langsamen Crosslinking zwischen Aminocelluloseketten. Durch das Vernetzen der Aminocelluloseketten verlieren die Aminocellulosederivate ihre Löslichkeit bei der Lagerung als Feststoff [Tiller et al. 1999, Tiller et al. 2000]. Diese Theorie belegt auch die verschiedenen Löslichkeitseigenschaften durch Variation der Substituenten an Position C2/C3 der AGE. Durch Einführung von Carbanilat-Substituenten wird der Anteil der Wasserstoffbrückenbindung geringer, wodurch die Aminocellulosederivate in Abhängigkeit vom Carbanilat-Substitutionsgrad länger in den entsprechenden Lösungsmitteln löslich sind. So war das PDA-Cellulosecarbanilat mit einem  $DS_{\text{Carbanilat}} > 0,8$  auch nach 24 Wochen noch in DMSO und DMA löslich [Tiller et al. 2000].

Für das PDA-Celluloseosylat wurde außerdem beschrieben, dass es sogenannte supramolekulare Architekturen in Lösung bildet, welche in Form von gelartigen Aggregaten in Lösung nach einer Woche Lagerung sichtbar werden. Die Bildung dieser Aggregate beruht ebenfalls auf den beschriebenen Wechselwirkungen [Tiller et al. 2000].

### **2.5.3 Filmbildende Eigenschaften der Aminocellulosederivate**

Die Lösungen der Aminocellulosederivate bilden auf Substratoberflächen wie Glas, Gold oder Polymeren transparente Filme aus. Die Oberflächen der Substrate müssen für die Ausbildung der Aminocellulosefilme gewisse Oberflächeneigenschaften aufweisen. So sind Elektronendonoren und -akzeptor Eigenschaften erforderlich, welche bei Polymeren durch Oxidation (Aktivierung) mit Ozon oder Sauerstoffplasma auf die Oberfläche eingeführt

werden können. Auf Oberflächen von Substraten wie Glas, Gold oder SiO<sub>2</sub> bilden die Aminocelluloselösungen auch ohne Aktivierung Filme aus.

Aminocelluloselösungen, welche frisch nach der Synthese zur Ausbildung von transparenten Filmen eingesetzt wurden, weisen dabei Topographien mit einer Rauigkeit von rund 5 nm auf. Die Ausbildung von transparenten Filmen auf glatten Oberflächen mit gelagerten PDA-Celluloseosylat-Lösungen zeigte eine wachsende Topographie der ausgebildeten Filme mit zunehmender Lagerzeit der PDA-Celluloseosylat-Lösung, welche auf die Bildung der gelartigen Aggregate in Lösung zurückgeführt wird. [Tiller et al. 2000]. Die Bildung von *Self-Assembled*-Aminocellulosekompositen in Lösung in Form der Mikrogele führt zur Anlagerung von Aminocellulose-Aggregaten auf der Oberfläche, welche zu einer Modifizierung der Oberfläche uneinheitlicher Filmdicken führt.

Die Lösung der gelagerten Aminocellulosederivate wird genutzt, um Aminocellulosefilme mit einer mit erhöhter Rauigkeit von rund 100 nm auf Glasoberflächen auszubilden. Diese konnten mit Hilfe von AFM-Aufnahmen nachgewiesen werden [Berlin et al. 2000, Berlin et al. 2003].

### **2.5.4 Aminocellulose-modifizierte Oberflächen für die Herstellung von biofunktionalen Materialien**

Wie aus bereits publizierten Arbeiten hervorgeht, erweist sich der beschriebene Aminocellulose-Typ durch die strukturbildende Polymerkette mit der stabilen Aminbindung an C6 und durch vielfältige strukturelle Modifizierungsmöglichkeiten von (X) und (S) als aussichtsreiche Trägermatrix-Leitstruktur. Die Ausbildung von Aminocellulosefilmen bzw. die Modifizierung von Materialien wie Glas, Gold oder Polymeren mit dem Aminocellulose-Typ ermöglichte die Bildung von biologisch adaptierbaren Trägerstrukturen, welche für eine kovalente Immobilisierung von Biomolekülen wie beispielsweise Oxidoreduktasen genutzt werden können [Berlin et al. 2000; Tiller et al. 2001; Tiller et al. 2002].

Durch Variation der Spacerstruktur (X) und der Löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S), entstanden Aminocellulosen als Leitstruktur-Derivate mit breitgefächerten Strukturmerkmalen. Solche Merkmale sind beispielsweise abgestufte Abstände der NH<sub>2</sub>-Endgruppen an der Aminocellulosekette (Spacereffekt) sowie unterschiedliche Milieu-Eigenschaften, z.B. unterschiedliche pH-Eigenschaften, Ladungsverteilungen und Hydrophilie/Hydrophobie-Balancen [Berlin et al. 2000, Berlin et al. 2003]. Diese

Strukturmerkmale haben einen determinierenden Einfluss auf die Stabilität der Kopplungsstruktur zwischen Biomolekül und Trägermatrixstruktur.

Neben den Strukturmerkmalen der Aminocellulosen wurde auch der Einfluss der Kopplungsstrukturen auf die Biomolekülfunktionalität zwischen Biomolekülen, z. B. Oxidoreduktasen, und Trägermatrix, nachgewiesen. Die Variation der Kopplungsstrukturen zwischen Biomolekül und Trägermatrix erfolgte durch Verwendung verschiedener Kopplungsreagenzien wie L-Ascorbinsäure, Glutardialdehyd, Benzochinon, u.a. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Kopplungsgeometrie einen Einfluss auf die Biomolekülfunktionalität ausübt [Tiller et al. 2002].

### **2.5.5 Aminocellulosen als *Self-assembled-Monolayer***

Als *Self-Assembled-Monolayer* (SAMs) wurde der Aminocellulose Typ erstmals von Jung et al. [2007] beschrieben. Durch Kontakt des Aminocellulose Typs mit Substratoberflächen – wie Glas, Gold oder Polymere bilden sich durch spontane Adhäsion Aminocellulose-SAM-Komposite auf der Substratoberfläche aus. Die SAM-Schichten wurden auf Materialien unterschiedlicher Natur - wie Gold, Metalloxiden, Glas, Silizium/SiO<sub>2</sub>, Polymeren u. a. Glas, - durch AFM- und Ellipsometrie Messungen nachgewiesen. Durch die Ausbildung von Aminocellulose-SAM mit unterschiedlichen Strukturen des Aminocellulosederivates können unterschiedliche Nanostrukturen, welche biokompatible Eigenschaften aufweisen, auf den Substratoberflächen erzeugt werden. Die Topographie der nanostrukturierten Oberflächen zeichnen sich durch Rauigkeiten von rund 1 nm aus [Berlin et al. 2005; Jung et al. 2007]. Außerdem gelang es, die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration von mit Aminocellulose modifizierten Oberflächen zu bestimmen. Dazu wurden die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentrationen, bestimmt durch die so genannten Tritychloridmethode (Kapitel 2.5.6), mit einer sogenannten Pikrinsäuremethode verglichen [Jung et al. 2007].

Die Möglichkeit, biokompatible Oberflächen durch Ausbildung von Aminocellulose-SAM-Kompositen zu gewinnen, wurde zur Oberflächenmodifizierung von einem Sensor-Chip in einem mikrofluiden System eingesetzt. Dabei wurde ein Thrombonin-sensitiver Sensor-Chip durch kovalente Immobilisierung von RNA-anti-thrombin-Aptamer auf den mit Aminocellulose modifizierten Sensor-Chip hergestellt. Diese Sensor-Chips zeichneten sich durch eine proteinresistente Oberfläche aus, welche spezifisch und sehr sensitiv Thrombonin bindet [Jung et al. 2007b].

### 2.5.6 Tritylchloridmethode zur Bestimmung von $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen auf Substraten

Als Maßzahl für die Modifizierung von Substraten mit Aminocellulose kann die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration, bezogen auf die Substratoberfläche, mit der Tritylchloridmethode bestimmt werden. Bei der Tritylchloridmethode wird 4,4'-Dimethoxytritylchlorid an die primären Aminogruppen auf der Substratoberfläche gebunden. Nach Entfernen des Reagenzüberschusses wird das an die Aminogruppen gebundene Reagenz durch Behandlung des Substrates mit Perchlorsäure wieder abgespalten und die Konzentration des abgespaltenen 4,4'-Dimethoxytritylkation (DMTr-Kation) in der Waschlösung spektrophotometrisch gemäß Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt (Abbildung 2-9) [Gaur et al. 1989]. Über die Konzentration des abgespaltenen Farbstoffes kann die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration auf den Substratoberflächen berechnet werden.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass durch das sterisch anspruchsvolle Tritylchlorid nicht alle Aminogruppen erfasst werden, wodurch nicht die tatsächliche  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der Substratoberflächen ermittelt wird. Zur Kontrolle der Oberflächen mit Aminocellulose und zum Vergleich der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration von mit Aminocellulose modifizierten Substraten ist die Tritylchloridmethode jedoch gut geeignet.

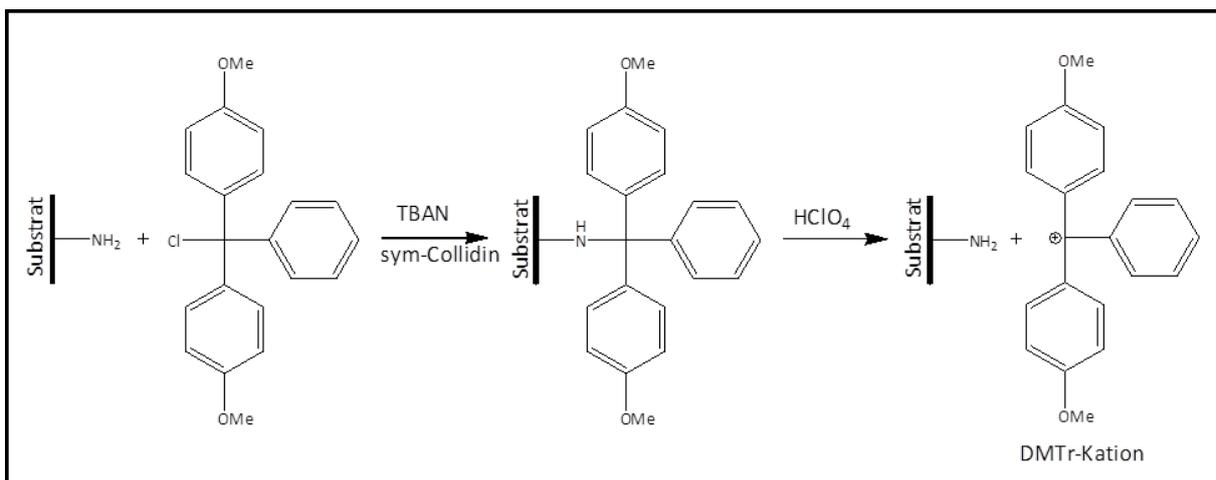


Abbildung 2-9: Formelschema der Bestimmung von  $\text{NH}_2$ -Endgruppen auf Substratoberflächen mittels Tritylchlorid (Tritylchloridmethode).

## 2.6 Immobilisierung von Antikörpern an Oberflächen

Bei der Fixierung von Antikörpern auf eine Oberfläche spricht man von Immobilisierung. Entscheidend bei der Immobilisierung ist, dass der Antikörper seine natürliche Konformation

beibehält und dass die Antigenbindungsstellen nicht zur Oberfläche orientiert sind, damit diese zur Anbindung des Antigens zugänglich sind. Unter der Funktionalität eines Antikörpers versteht man die Eigenschaft ein Antigen an sich zu binden. Ob ein Antikörper, welcher auf einer Oberfläche fixiert wird, seine Funktionalität behält, hängt unter anderem stark von der Art der Fixierung ab. Die Gründe für den Verlust der Antikörperfunktionalität durch die Immobilisierung dafür liegen in der räumlichen Orientierung der Antikörper auf der Oberfläche (vgl. Abbildung 2-10), sterischen Hinderungen durch benachbarte Antikörper, chemische Modifizierung der Antigenbindungsstellen sowie Konformationsänderungen durch Oberflächeneffekte während der Immobilisierung.

In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Oberfläche können bei der Immobilisierung von Antikörpern verschiedene Grundprinzipien angewandt werden. So wird unterschieden in kovalente und nicht-kovalente Immobilisierung. Außerdem kann zusätzlich in gerichtete und ungerichtete Immobilisierungen unterschieden werden. Immobilisierungsmethoden, die die Orientierung der Antikörper kontrollieren, wurden mehrfach beschrieben [Di et al. 2006, Fowler et al. 2007, Lee et al. 2007, Patrie, Mrksich 2007, Jung et al 2007c].

Die Menge immobilisierter Antikörper pro Quadratzentimeter Oberfläche wird durch die Grundfläche des Antikörpers bestimmt. Dabei variiert die Grundfläche des Antikörpers je nach Orientierung des Antikörpers relativ zur Oberfläche. Geht man von einer statistischen Verteilung aller möglichen Orientierungen aus, können durchschnittlich 300 ng IgG-Antikörper pro Quadratzentimeter Oberfläche immobilisiert werden [Raem, Rauch 2006].

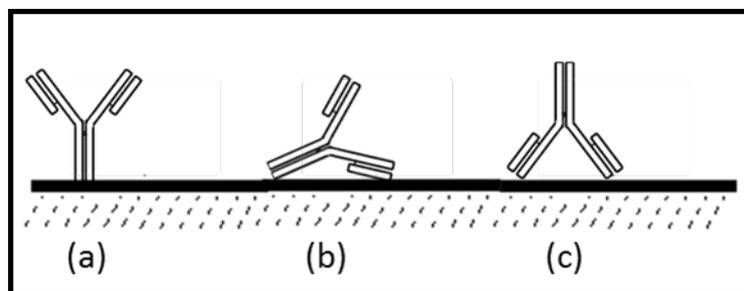


Abbildung 2-10 Schematische Darstellung möglicher Orientierungen immobilisierter Antikörper auf einer Oberfläche. Entsprechend ihrer Orientierung ergibt sich ihr Einfluss auf die Funktionalität als a) aktiv, b) teilweise aktiv und c) inaktiv. [Lu et al. 1996].

### 2.6.1 Nicht-kovalente Immobilisierung von Antikörpern

Zu den nicht-kovalenten Immobilisierungen gehört unter anderem die unspezifische Adsorption, die gerichtete elektrostatische Immobilisierung von Antikörpern an den  $F_c$ -Teil

an elektrostatisch positive Träger oder die Nutzung von natürlichen hoch affinen Wechselwirkung wie der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung und die Bindung von Antikörpern an Protein A oder Protein G.

### **2.6.1.1 Adsorptive Immobilisierung von Antikörpern**

Die Vorteile der adsorptiven Bindung liegen in ihrer einfachen Durchführbarkeit. Außerdem ist eine Vielzahl von Oberflächen ohne weitere Modifizierung für eine adsorptive Beschichtung zugänglich. Die Adhäsionskräfte beruhen auf verschiedenen Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Oberfläche in Abhängigkeit des Antikörpers und der Oberfläche. Häufige Wechselwirkungen dabei sind Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte, ionische Wechselwirkung oder hydrophobe Wechselwirkungen. Die vorhandenen Wechselwirkungen besitzen jedoch schwache Bindungskräfte, wodurch die gebundenen Moleküle auch wieder leicht von der Oberfläche desorbiert werden können [Williams, Blanch 1994]. Die Desorption der Antikörper von der Oberfläche wird auch als Ausbluten bezeichnet. Das Ausbluten hat zur Folge, dass die Immunoassays, welche über adsorptiv immobilisierte Antikörper verfügen an Sensitivität mit zunehmender Lagerdauer verlieren. Nachteilig wirkt sich bei der adsorptiven Immobilisierung außerdem die ungerichtete Bindung der Antikörper an die Oberfläche aus. Hierdurch können Antikörper in ihrer Funktionalität eingeschränkt werden. Beispielweise sind nach der adsorptiven Immobilisierung von Antikörpern an Polystyroloberflächen nur rund 10 Prozent der immobilisierten Antikörper noch funktional [Butler et al. 1992].

Spezifisch modifizierte Oberflächen, welche elektrostatisch geladen sind, erlauben eine Steuerung der Orientierung von immobilisierten Antikörpern. Chen et al. [2003] zeigte, dass eine Einführung elektrostatisch positiver Gruppen einen positiven Effekt auf die Ausrichtung der Antikörper auf der Oberfläche ausübte.

Mouri et al. [2010] gelang es durch Einführung von Carboxylgruppen auf der Oberfläche, IgG-Antikörper gezielt auszurichten, so dass dadurch die Ak-Funktionalität gesteigert werden konnte. Durch unterschiedliche isoelektrische Punkte (IP) des  $F_c$ - und des  $F_{ab}$ -Teils der Antikörper, sind diese am IP des Antikörperproteins unterschiedlich geladen. So sind am IP des Antikörperproteins am  $F_{ab}$ -Teil hauptsächlich negative Ladungen und am  $F_c$ -Teil sowohl negative wie auch positive Ladungen lokalisiert. Dadurch kommt es zu elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen  $F_{ab}$ -Teil des Ak und der negativ geladenen Oberfläche, wodurch

der  $F_{ab}$ -Teil und damit die Antigenbindungsstellen von der Oberfläche weg orientiert sind (Abbildung 2-11).

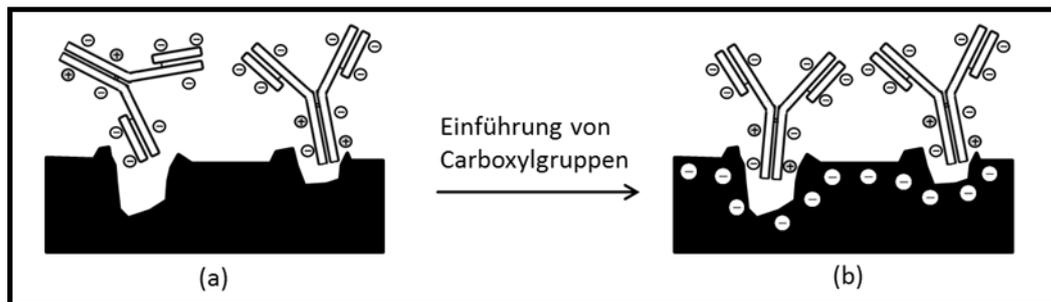


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der gezielten Antikörperausrichtung durch Einführung von Carboxylgruppen auf der Oberfläche: a) zufällige Orientierung; b) aktive Orientierung [Mouri et al. 2010].

Allerdings sind diese elektrostatisch getriebenen Immobilisierungen sehr anfällig für Änderungen des pH und der Ionenstärke, wodurch die Immobilisierung wieder gelöst werden kann.

#### 2.6.1.2 Ak-Immobilisierung an Streptavidin (SAV) funktionalisierte Oberflächen (SAV-Methode)

Eine weitere Möglichkeit zur nicht-kovalenten Immobilisierung stellt die Nutzung der hoch affinen Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin dar. Das Protein Streptavidin bildet mit Biotin einen sehr starken Komplex aus ( $K \sim 10^{15}$ ) [Green 1990]. Immobilisiertes Streptavidin kann somit als Anker für einen Biotin-modifizierten Antikörper dienen (Abbildung 2-12). Allerdings ist eine Immobilisierung von Streptavidin notwendig, welche ebenfalls durch verschiedene Immobilisierungsmethoden erfolgen kann.

Aktivierte Biotinylierungsreagenzien sind kommerziell verfügbar, genauso wie eine Vielzahl bereits biotinylierter Antikörper. Dadurch ist es sehr einfach möglich, das Verfahren an andere Antikörper anzupassen. Durch die starke Komplexbildungskonstante können die über den Streptavidin-Biotin-Komplex immobilisierten Antikörper, als irreversibel gebunden betrachtet werden [Hermanson 2008].

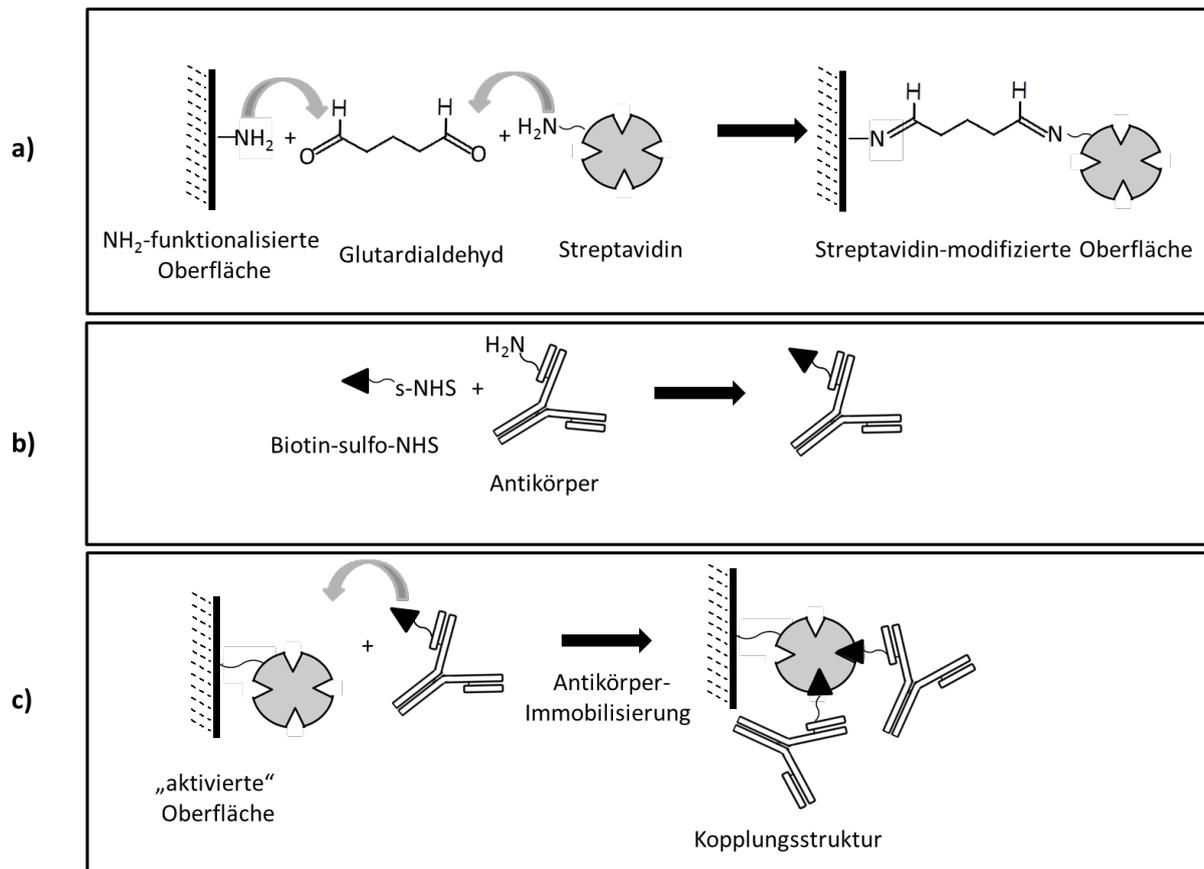


Abbildung 2-12: Immobilisierungsschema von Ak-Protein via biologischer Erkennungsstrukturen: a) SAV-Funktionalisierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen b) Biotin-Funktionalisierung von Ak-Protein und c) Ak-Immobilisierung an SAV-funktionalisierten Oberflächen.

### 2.6.1.3 Ak-Immobilisierung an Protein G-funktionalisierte Oberflächen (PG-Methode)

Ein anderes natürliches System, welches zur gerichteten Immobilisierung von Antikörpern genutzt wird, ist die Fixierung über Protein A oder Protein G (Abbildung 2-13). Protein A und Protein G sind Proteine, die eine starke Affinität zur  $F_C$ -Region eines Immunglobulins ausbilden. Protein G, welches aus Streptokokken isoliert wird, bildet mit Immunglobulinen verschiedener Spezies Komplexe mit einer größeren Bindungskonstante als das Protein A. So wurden für humane Immunglobuline Bindungskonstanten von  $3,3\text{-}5,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  ermittelt [Turkova 1999]. Ein Vorteil der Ak-Immobilisierung mit Protein A oder G ist, dass die Antigenbindungsregionen ( $F_{ab}$ ) nicht beeinflusst werden. Wie bei der SAV-Methode muss aber das Protein G in einem separaten Schritt vorerst auf der Oberfläche immobilisiert werden.

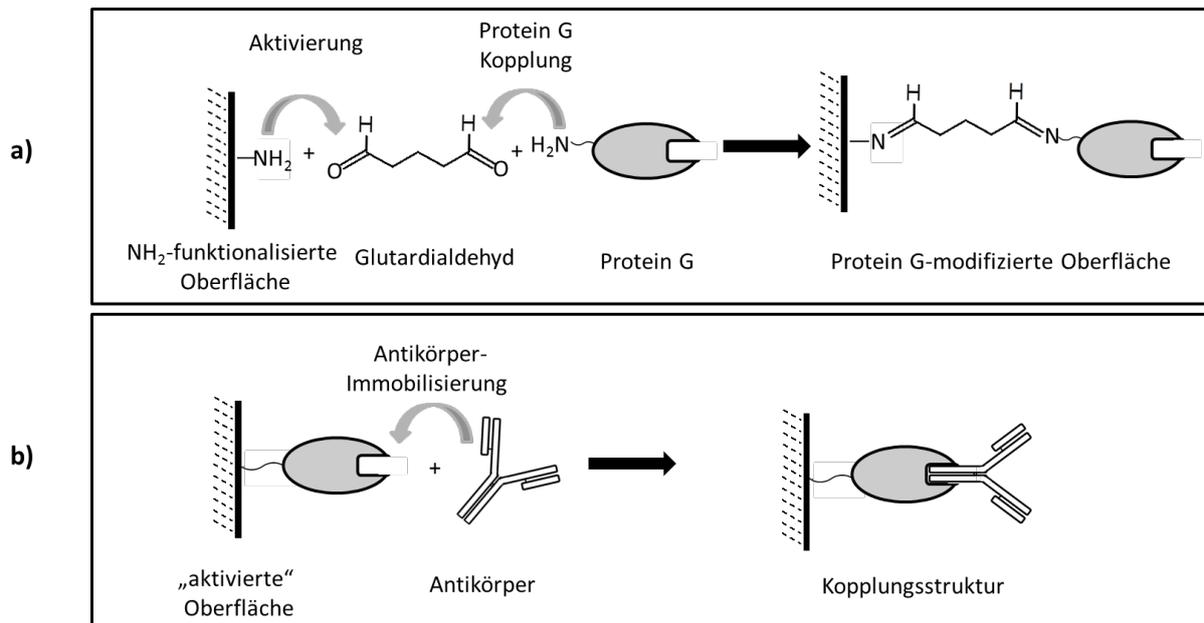


Abbildung 2-13: Immobilisierungsschema von Ak-Protein via biologischer Erkennungsstrukturen: a) Protein G-Funktionalisierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen und b) Ak-Immobilisierung an die Protein G-aktivierte Oberfläche (PG-Methode).

### 2.6.2 Kovalente Immobilisierung von Antikörpern

Antikörper können über reaktive Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Aldehyd-, Sulfhydrylgruppen), kovalent an aktivierte Oberflächen eines Assayträgers gekoppelt werden. Die resultierende Bindung ist sehr stark, eine Desorption ist praktisch unmöglich. Durch Auswahl der Aktivierung der Oberfläche besteht die Möglichkeit der gerichteten Orientierung der Antikörper auf der Oberfläche. Nachteilig sind neben der oft komplexen Bindungschemie auch Konformationsänderungen der Antikörper bei Knüpfung kovalenter Bindungen und den in diesem Zusammenhang häufig zu beobachtenden Funktionalitätsverluste der immobilisierten Antikörper gegenüber nativen Antikörperkonformationen [Wang 2005].

Für die Aktivierung des Trägermaterials sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben worden [Hermanson 2008]. Dabei richtet sich die Wahl des Aktivierungsreagenzes nach der Art des Trägers und der darauf vorhandenen funktionellen Gruppen, sowie nach der gewünschten Anknüpfung am Antikörper.

Die kovalente Ak-Kopplung an NH<sub>2</sub>-funktionalisierten Oberflächen kann in zwei Teilprozesse unterteilt werden: die Aktivierung und die anschließende Immobilisierung. Dabei kann entweder die NH<sub>2</sub>-funktionalisierte Oberfläche oder auch der Antikörper aktiviert und im zweiten Schritt der Antikörper auf die Oberfläche immobilisiert werden. Dabei beeinflussen

verschiedene Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, Reaktionszeit (in einem definierten pH-Bereich) und die Kopplungsgeometrie die Aktivität der immobilisierten Antikörper.

### 2.6.2.1 Ak-Immobilisierung an aminogruppenhaltige Oberflächen durch homobifunktionelle Crosslinker (GDA-, CHI-, ASC-; BDE-Methode)

NH<sub>2</sub>-reaktive homobifunktionelle Crosslinker fixieren den Antikörper über den N-Terminus auf der aminogruppenhaltigen Oberfläche. Dies kann sich nachteilig auf die Funktionalität des Antikörpers auswirken, da der Antikörper mit dem Paratop zur Oberfläche hin orientiert wird. Eine Möglichkeit die Beweglichkeit und die Zugänglichkeit für das Antigen zu erhöhen, ist die Wahl des Abstandshalters (Spacers) des bifunktionellen Reagenzes. In Abbildung 2-14 ist das allgemeine Prinzip der Immobilisierung von Antikörpern an aminogruppenhaltige Oberflächen mit NH<sub>2</sub>-reaktive homobifunktionellen Reagenzien sowie unterschiedliche Kopplungsstrukturen verschiedener NH<sub>2</sub>-reaktiver homobifunktioneller Reagenzien dargestellt. Auf mit Aminocellulose modifizierten Oberflächen wurden bereits eine Vielzahl von homobifunktionellen Crosslinkern zur Immobilisierung von Biomolekülen eingesetzt [Berlin et al. 2000; Tiller et al. 2001; Tiller et al. 2002].

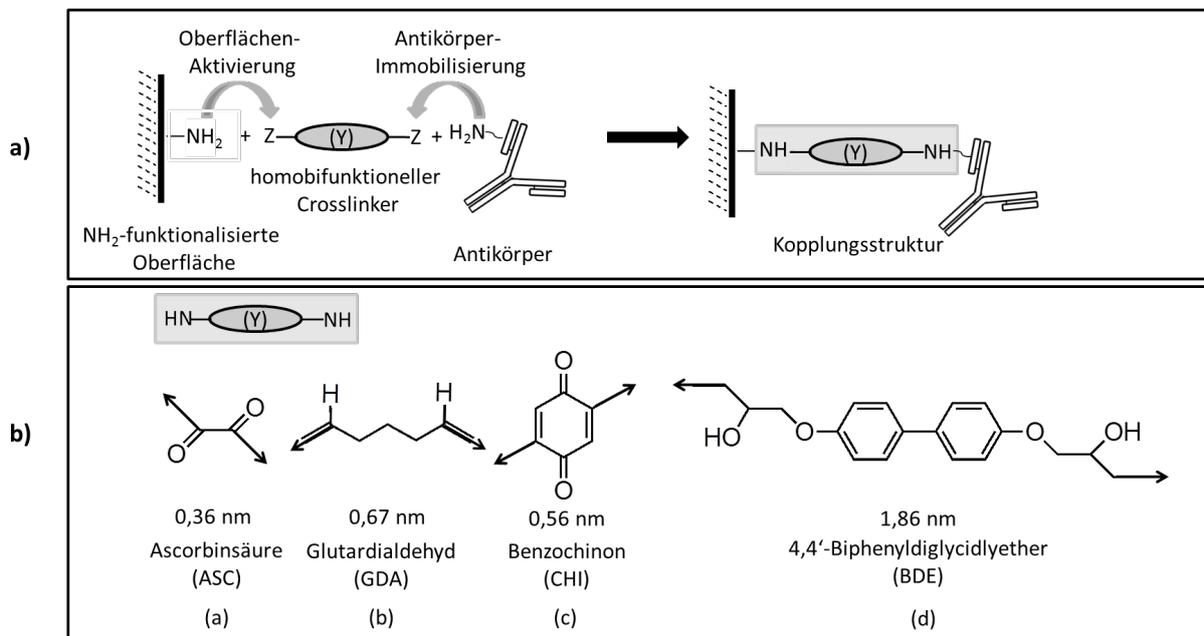


Abbildung 2-14: Ak-Immobilisierung an NH<sub>2</sub>-funktionalisierte Oberfläche durch homobifunktionelle Crosslinker, a) Kopplungsschema und b) Spacerstrukturen ausgewählter Crosslinker.

### 2.6.2.2 Kovalente Ak-Immobilisierung an aminogruppenhaltige Oberflächen durch heterobifunktionelle Crosslinker (DIA-Methode)

Heterobifunktionelle Crosslinker zeichnen sich durch zwei unterschiedliche reaktive Gruppen innerhalb des Moleküls aus. Beispielsweise bindet das Reagenz Sulfo-succinimidyl 6-(4,4'-

azipentanamido)hexanoate (Sulfo-NHS-LC-Diazirin) als heterobifunktionaler Crosslinker durch eine s-NHS (Sulfo-N-Hydroxysuccinimid)-Gruppe an die NH<sub>2</sub>-funktionalisierte Oberfläche. Die Diazirinegruppe steht anschließend zur Antikörperkopplung zur Verfügung. Im Gegensatz zu den homobifunktionalen Crosslinkern werden die Antikörper hierbei nicht zwingend am N-Terminus auf die Oberfläche fixiert. Unter Einstrahlung von Licht ( $\lambda=350\text{ nm}$ ) wird Stickstoff aus der Diazirinegruppe abgespalten und ein Radikal entsteht, welches den Antikörper bindet (Abbildung 2-15) [Gomes, Gozzo 2010].

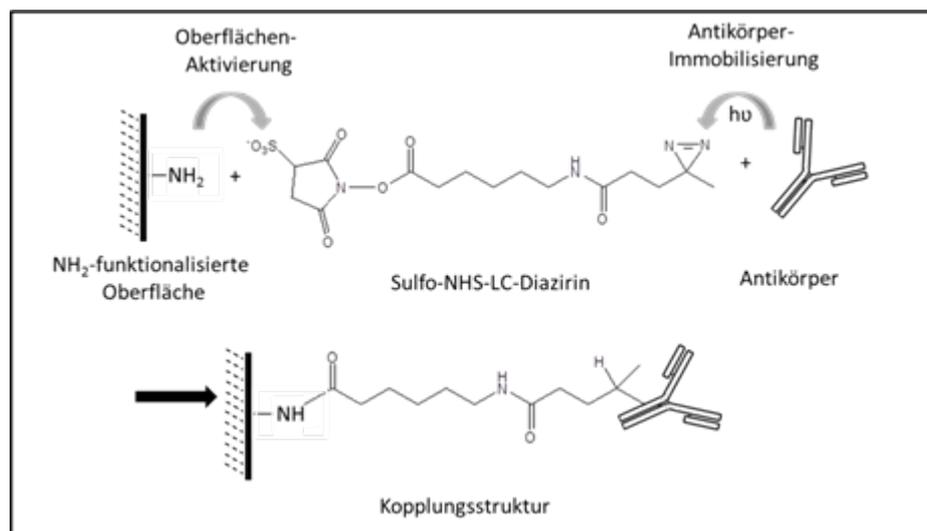


Abbildung 2-15: Ak-Immobilisierungsschema der DIA-Methode und die erhaltene Kopplungsstruktur.

### 2.6.2.3 Ak-Immobilisierung durch Carboxylierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen und Aktivierung der Carboxylgruppen mittels EDC/Sulfo-NHS (EDC-Methode)

Eine weitere Möglichkeit, die Antikörper am N-Terminus der Antikörper zu koppeln, ist die Reaktion von aktivierten Carboxylgruppen mit den Aminogruppen des Antikörpers. Dazu wird die aminogruppenhaltige Oberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid und Pyridin als Base carboxyliert (Abbildung 2-16). Mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (s-NHS) werden die Carboxylgruppen aktiviert und reagieren selektiv mit Aminogruppen der Antikörper. Die aktivierten NHS-Ester sind dabei gegenüber Basen sehr instabil (Halbwertszeit von zehn Minuten bei pH 8,6, [Lomant, Fairbanks 1976]). Aus diesem Grund sollte die Immobilisierung optimal im neutralen pH-Bereich durchgeführt werden. Anders als bei den homobifunktionalen Crosslinkern sind auf der Oberfläche negative Ladungen durch die eingeführten Carboxylgruppen vorhanden. Diese zusätzlichen Ladungsträger beeinflussen die Orientierung bzw. Ausrichtung der Antikörper auf der Oberfläche. Außerdem müssen bei der Ak-Immobilisierung Carboxylgruppen der Oberfläche durch einen zusätzlichen Reaktionsschritt aktiviert werden. [Hermanson 2008, S. 598]

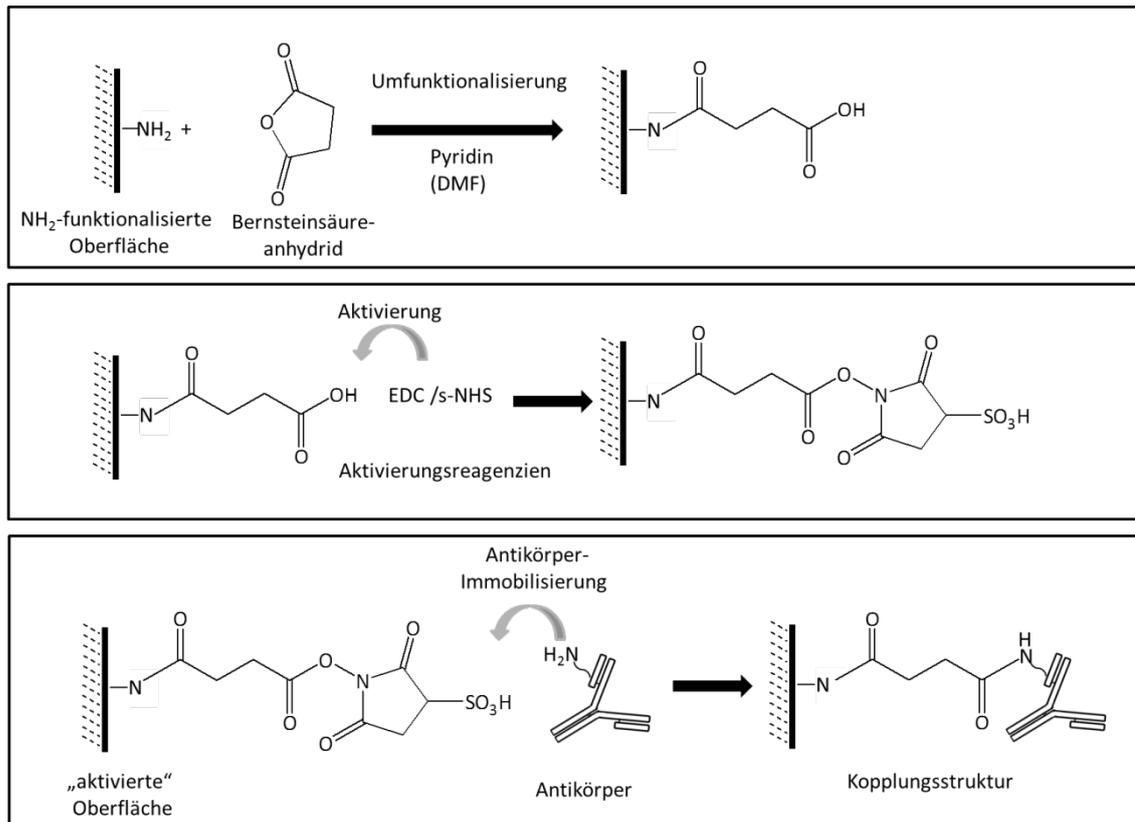


Abbildung 2-16: Ak-Immobilisierungsschema der EDC-Methode: a) Carboxylierung von aminogruppenhaltigen Oberflächen, b) Aktivierung der Carboxylgruppen mittels EDC/Sulfo-NHS und c) Ak-Immobilisierung.

#### 2.6.2.4 Ak-Immobilisierung an aminogruppenhaltige Oberflächen durch EDC/Sulfo-NHS aktivierte Carboxylgruppen des Ak-Proteins (EDC-Ak-Methode)

IgG Ak-Proteine verfügen über Carboxylgruppen, welche sich am C-Terminus befinden [Huber 1980]. Die Carboxylgruppen werden nach bekannter EDC-Methode aktiviert. Durch die Zugabe von s-NHS bildet sich ein im wässrigen Milieu stabiler NHS-Ester, welcher reaktiv gegenüber den  $\text{NH}_2$ -Gruppen einer Oberfläche ist. Die Immobilisierung über den C-Terminus ermöglicht, dass die Antigenbindungsstellen frei in den Raum orientiert sind. Allerdings kann es nach der Aktivierung der Carboxylgruppe zur Quervernetzung der Antikörper untereinander kommen (Abbildung 2-17). [Hermanson 2008, S. 216]

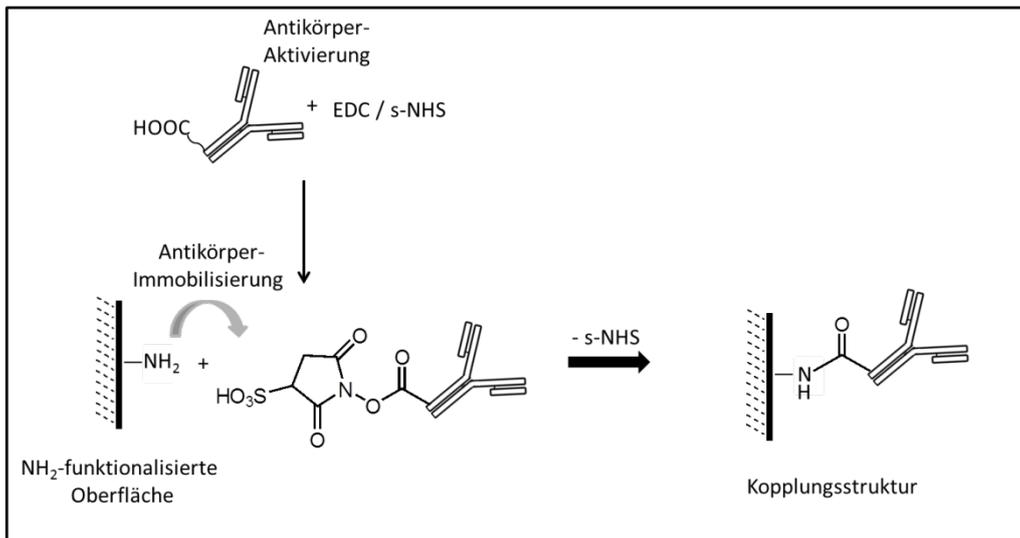


Abbildung 2-17: Ak-Immobilisierungsschema der EDC-Ak-Methode durch Carbonsäureaktivierung der Carboxylgruppen des Ak-Proteins mittels EDC und s-NHS.

### 2.6.2.5 Ak-Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Mikrofilter durch partielle Glykolspaltung der Kohlenhydratstruktur des Ak-Proteins (ALD-Methode)

IgG-Ak-Proteine sind Glycoproteine und verfügen damit über kovalent an das Protein gebundene Kohlenhydratgruppenstrukturen. Diese werden genutzt, um durch partielle Glykolspaltung mittels Natriumperodat Aldehydgruppen zu erzeugen (Ak-Aktivierung) [Lu et al. 1996].

Die Aldehydgruppen reagieren mit  $\text{NH}_2$ -Endgruppen von aminogruppenhaltigen Oberflächen unter Ausbildung von Iminbindungen, die instabil sind und anschließend mittels Natriumcyanoborhydrid in stabilere Aminbindungen mit Natriumcyanoborhydrid reduziert werden (Abbildung 2-18). Hierbei kann allerdings die Quervernetzung der Antikörper untereinander ebenfalls zu Funktionalitätsverlust der Antikörper führen und eine Einführung von Spacern durch zusätzliche Schritte ist sehr aufwändig [Lu et al 1996].

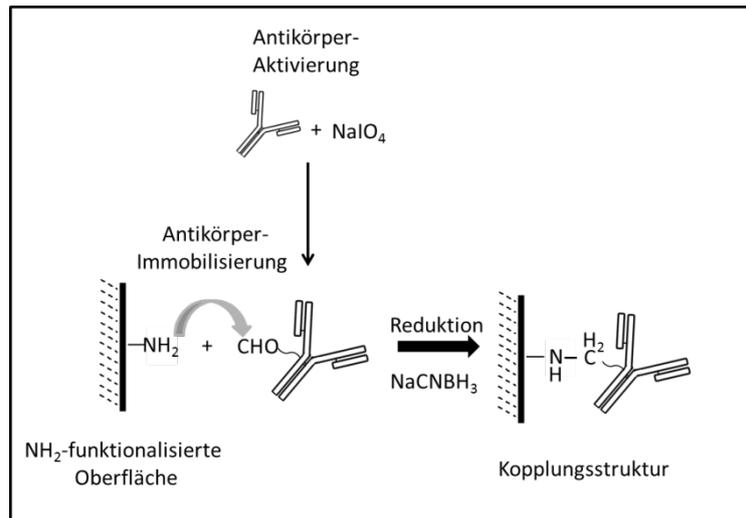


Abbildung 2-18: Ak-Immobilisierungsschema der ALD-Methode durch Glykolspaltung der Kohlenhydratstrukturen des Ak-Proteins unter Erhalt von Aldehydgruppen.

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Es soll ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, Assayträger auf Polyethylenbasis für Durchfluss-Assays - in Form poröser PE-Mikrofilter- und für LFA-Anwendungen – in Form von porösen PE-Membranen – für eine kovalente Ak-Immobilisierung zugänglich zu machen. Die kovalente Ak-Immobilisierung soll durch eine biokompatible Aminogruppenfunktionalisierung der PE-Substrate durch den beschriebenen Aminocellulose-Typ ermöglicht werden.

Die PE-Substrate, welche im Rahmen der Arbeit als Assayträger fungieren sollen, haben neben der mechanischen Stabilität den Vorteil, dass durch gesteuerte Sinterprozesse reproduzierbare Porengrößen von Sinterformkörpern erhalten werden können. Dadurch ist es beispielsweise möglich, die Flussrate bei LFA-Anwendungen zu kontrollieren [Fernández-Sánchez et al. 2005].

Durch das neuartige Verfahren soll eine alternative Immobilisierungstechnik für immunologische Schnelltest geschaffen werden. Dabei können die beschriebenen Limitationen verursacht durch die adsorptive Ak-Immobilisierung der immunologischen Schnelltests auf Polyethylen- oder Nitrocellulosebasis - wie schlechte Präzision, niedrige Sensitivitäten sowie fehlende Lagerstabilität – vermindert werden. Das Verfahren soll durch eine Konzentrationsbestimmung von CRP demonstriert werden.

### 2.7.1 Synthese ausgewählter Aminocellulosederivate

Als Grundlage der Arbeit dient der beschriebene Aminocelluloseotyp, der Aminocellulosekomposite auf unterschiedlichen Substratmaterialien ausbildet. Im Rahmen der Arbeit werden verschiedene Diamin- und Oligoaminsubstituenten an C6 der AGE eingeführt. Dadurch kann die Spacerstruktur (X) der Aminocellulosen gesteuert werden, welche Einfluss auf die pH-Eigenschaften, Ladungsverteilungen und Hydrophilie/Hydrophobie-Balancen auf die Aminocellulosekomposite ausübt. Die NH<sub>2</sub>-Gruppen sind außerdem für die spontanen adhäsiven Eigenschaften der Aminocellulosen verantwortlich. Außerdem erlauben die NH<sub>2</sub>-Gruppen durch NH<sub>2</sub>-reaktive Kopplungsreaktionen kovalente Ak-Immobilisierungen an den mit Aminocellulose modifizierten Substraten. Neben der Variation der Spacerstruktur (X) der Aminocellulosen sollen Tosylat- und Carbanilat-Substituenten an Position C2/C3 der AGE eingeführt werden. Dadurch lässt sich die Löslichkeit und möglicherweise auch die spontanen adhäsiven Filmbildungseigenschaften der Aminocellulosederivate variieren. Außerdem wird ein neuartiges Aminocellulosederivat - in Form eines kleineren Polymerisationsgrads - synthetisiert und zur Filmbildung verwendet. Dabei soll untersucht werden, ob der Polymerisationsgrad des Aminocellulosederivates einen Einfluss auf den Ordnungsgrad bzw. die Packungsdichte des ausgebildeten Aminocellulosefilms sowie auf die NH<sub>2</sub>-Endgruppenkonzentration der modifizierten Substratoberfläche ausübt.

### 2.7.2 Modifizierung von PE-Substraten mit Aminocellulosederivaten

Ziel der Ausbildung von Aminocellulosefilmen auf Substratoberflächen ist es, Assayträger mit einer funktionellen Aminogruppendichte und verschiedenen Spacergeometrien an Position C6 der AGE herzustellen. Außerdem wird die Hydrophobie/Hydrophilie-Balance der Substratoberfläche durch verschiedene Aminocellulosederivate in Form der Variation der löslichkeitsvermittelnden Substituenten (S) an Position C2/C3 der AGE beeinflusst.

Zur Kontrolle der Filmbildung auf den PE-Substraten wird die NH<sub>2</sub>-Endgruppenkonzentration bestimmt und durch AFM-Aufnahmen auf Glimmerscheiben die Qualität der Aminocellulosefilme untersucht. Zur Herstellung und zum Nachweis von qualitativ hochwertigen Aminocellulosederivat-SAM-Kompositen auf Substraten ist ein hoher experimenteller und messtechnischer Aufwand nötig. Die Aufgabe der Arbeit ist es jedoch, ein einfaches Verfahren mittels möglichst einfacher Techniken zur reproduzierbaren

Herstellung von Aminocellulosefilmen auf PE-Substraten für die Herstellung von Ak-funktionalisierten PE-Substraten zu entwickeln.

### **2.7.3 Ak-Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate**

Zahlreiche Hinweise aus der biofunktionalen Materialforschung machen deutlich, dass der Erhalt nativer Biofunktionen, Biokompatibilität bzw. proteinresistenter Eigenschaften auf der Nanostrukturebene zu finden ist [Prime et al. 1991, Prime et al. 1993, Harris 1992]. Außerdem sind Synergieeffekte der nanostrukturierten Oberfläche, der Struktur des Kopplungsreagenzes und des zu immobilisierenden Proteins auf den Erhalt der Funktionalität der Proteine zu erwarten, die die einzelnen Komponenten nicht haben [Willner et al. 2004, Jung, Berlin 2005]. Das Konzept der Arbeit sieht darum vor, den Modell-IgG-Antikörper Anti-h CRP 6404 durch Variation der Immobilisierungsprozeduren und der Kopplungsstrukturen auf die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate zu immobilisieren. Dabei kann sich die Arbeit auf die Ergebnisse und Kenntnisse über die Immobilisierung von Oxidoreduktasen, unter Variation verschiedener Kopplungsreagenzien, auf Aminocellulosefilme stützen [Berlin et al. 2003; Jung et al. 2004, Jung, Berlin 2005]. Darüber hinaus werden weitere Immobilisierungsmethoden einbezogen.

Das Verfahren wird anhand von planaren PE-Chips ausgearbeitet. Dadurch werden mögliche undefinierte Poreneinflüsse, wie Ablagerungen von *Self-Assembled*-Aminocellulosekompositen oder nicht modifizierter Areale in den Poren poröser PE-Substrate ausgeschlossen. Für die Entwicklung des Verfahrens wird der Modell-IgG Antikörper Anti-h CRP 6404 verwendet. Zur Beurteilung der Immobilisierungsprozeduren der Ak-funktionalisierten PE-Chips wird die CRP-Immunoaffinität der PE-Chips ermittelt.

Anschließend werden geeignete Immobilisierungsverfahren auf die porösen PE-Mikrofilter, welche in ABICAP-Assays zum Einsatz kommen, übertragen. Die PE-Mikrofilter sind mit definierten Gebrauchswerteigenschaften wie Größe, Porengrößen und innerer Oberfläche käuflich erwerbbar (Typ 180, 5x2,5 mm, Porex). Die Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter werden hinsichtlich der Ak-Funktionalität und der Menge immobilisierter Antikörper bewertet.

### **2.7.4 Entwicklung von POCT für CRP auf Basis der Ak-funktionalisierten PE-Substrate**

Mit Hilfe der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter soll ein ABICAP-System für den Nachweis von CRP entwickelt und die Leistungsdaten des ABICAP-Systems ermittelt werden. Dadurch kann das Verfahren hinsichtlich der Eignung als nanotechnologische Plattform zur Entwicklung von Assayträgern auf Polyethylenbasis im Vergleich zu Leistungsdaten anderer CRP-Konzentrationsbestimmungsmethoden bewertet werden.

Nach der Entwicklung des Verfahrens für PE-Mikrofilter werden die Ergebnisse für die Modifizierung mit Aminocellulose und Antikörperimmobilisierung auf die PE-Membran für die LFA-Anwendung übertragen. Dabei sind die Immobilisierungsmöglichkeiten durch das linienförmige Auftragen der Fängerantikörper eingeschränkt, weshalb geeignete Immobilisierungsmethoden selektiert werden müssen.

### **2.7.5 Kurzformulierung der Ziele**

- a) Die Synthese verschiedener, bereits beschriebener Aminocellulosederivate hinsichtlich der Variation der Spacerstruktur (X) und der Löslichkeitsvermittelnden Gruppe (S). Zusätzlich soll ein neuartiges Aminocellulosederivat mit einem kleineren Polymerisationsgrad von rund 50 synthetisiert werden.
- b) Die synthetisierten Aminocellulosederivate sollen zur Modifizierung von PE-Substraten eingesetzt werden. Dabei soll die Qualität der Nanostruktur der modifizierten PE-Substrate in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivate durch Bestimmung der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration und durch AFM-Aufnahmen beurteilt werden.
- c) Anti-h CRP 6404 Antikörper sollen durch verschiedene Immobilisierungsprozeduren auf die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate immobilisiert werden. Anschließend werden geeignete Verfahren zur Herstellung CRP-immunoaffiner PE-Chips selektiert.
- d) Die selektierten Immobilisierungsmethoden sollen für die Herstellung von CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern angewendet werden.
- e) Basierend auf den neuartigen CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern soll ein ABICAP-Assay für CRP entwickelt und die Leistungsdaten (Nachweisgrenze,

Variationskoeffizienten) des Assays bestimmt werden, um das nanotechnologische Verfahren bewerten zu können.

- f) Das Verfahren zur Herstellung CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter soll zur Erzeugung von einer Trägermembran für eine LFA-Anwendung auf der Basis von Polyethylen übertragen werden. Dazu werden geeignete Immobilisierungsverfahren für das linienförmige Auftragen der Fängerantikörper erarbeitet.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Synthese, Struktur und Löslichkeitseigenschaften ausgewählter Aminocellulosederivate

Die Auswahl der synthetisierten Aminocellulosederivate erfolgte nach den Zielsetzungen der Arbeit. Es sollten die Spacerstruktur (X), die Löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S) und der Polymerisationsgrad (DP) der Aminocellulosederivate variiert werden. Als aminhaltige Substituenten wurden mit Ethylendiamin (EDA) und 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (TODA) zwei Diamine sowie mit 2,2,2-Triaminotriethylamin (TAEA), Tetraethylenpentamin (TEPA) und Triethylentetramin (TETA) verschiedene Oligoamine zur Einführung unterschiedlicher Spacerstrukturen (X) eingesetzt. Als Löslichkeitsvermittelnde Gruppen wurden neben den Tosylatgruppen an Position C2/C3 der AGE zusätzlich Carbanilat-Substituenten eingeführt. Der Polymerisationsgrad wurde durch Einsatz verschiedener Ausgangscellulosen unterschiedlicher Polymerisationsgrade ( $DP \sim 50$  und  $200$ ) variiert. Die Synthese der maßgeschneiderten Aminocellulosederivate erfolgte entsprechend der Prozedurbeschreibungen von Jung, Berlin [2005] und Jung et al. [2007] (Abbildung 3-1).

In einem ersten Syntheseschritt wurde mikrokristalline Cellulose (Avicel) mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 200 in DMA/Lithiumchlorid (LiCl) gelöst und mit *p*-Toluensulfonsäurechlorid in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt. Die Tosylatgruppen wurden dabei selektiv an Position C6 der AGE eingeführt. Der Substitutionsgrad der Tosylatgruppen konnte durch das eingesetzte Molverhältnis von *p*-Toluensulfonsäurechlorid zu AGE eingestellt werden [Rahn et al. 1996]. Auf diesem Weg wurde eine 6-Tosylcellulose mit einem  $DS_{\text{Tosylat}}$ -Wert von 1,0 erhalten. In einem zweiten Reaktionsschritt konnten eine Löslichkeitsvermittelnde Gruppe (S) in die 6-Tosylcellulose eingeführt werden. Durch Umsetzen der 6-Tosylcellulose mit Phenylisocyanat in Pyridin wurden Phenyl-Carbanilat-Substituenten an Position C2/C3 der AGE eingeführt und somit ein Tosylcellulosecarbanilat mit einem  $DS_{\text{Carbanilat}}$ -Werte von 1,4 erhalten.

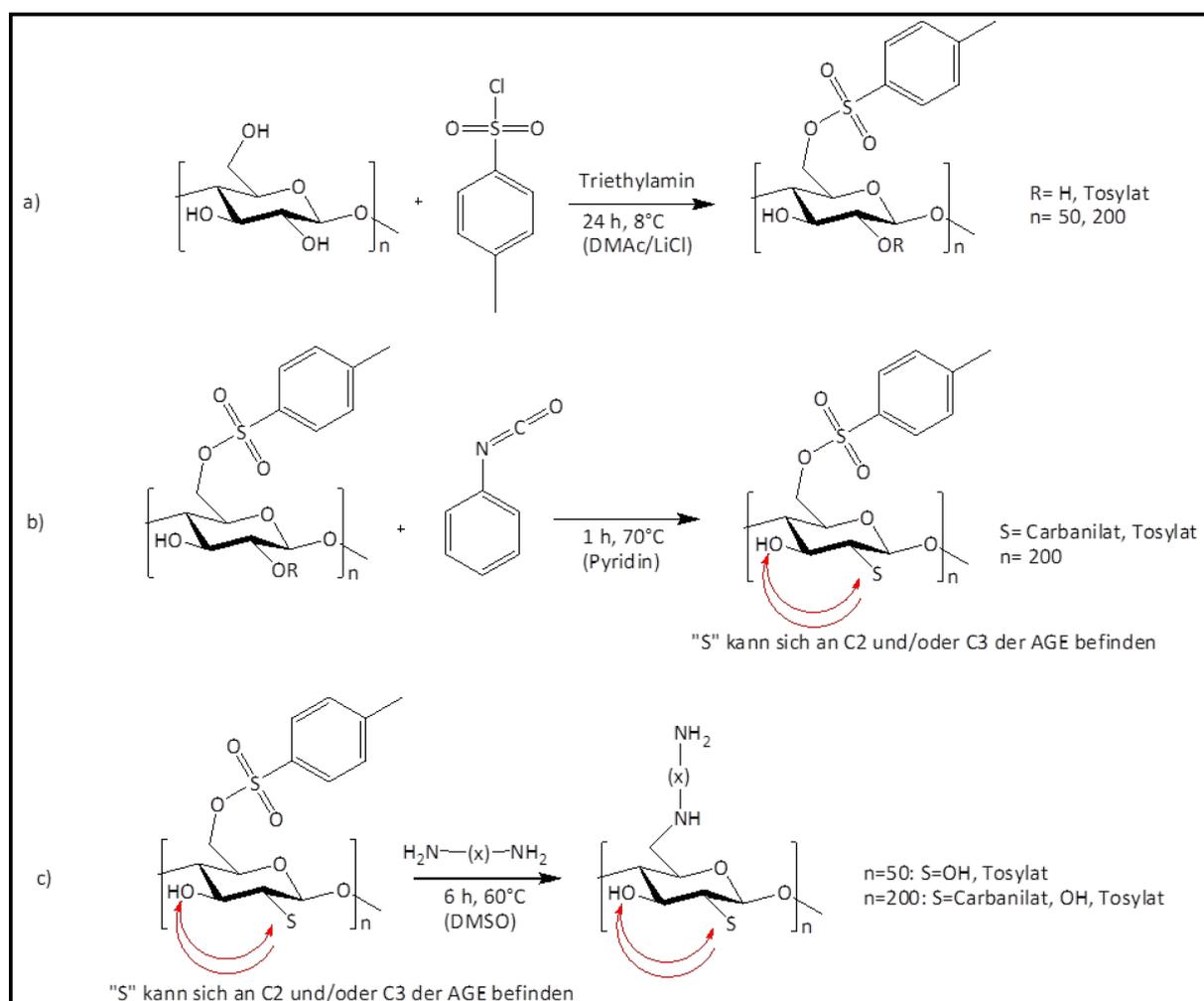


Abbildung 3-1: Synthesesequenz der im Rahmen der Arbeit synthetisierten Aminocellulosederivate: a) Tosylierung von Cellulose in DMA/LiCl, b) Einführung einer löslichkeitsvermittelnden Gruppe (S) in Form von einem Phenyl-Carbanilat-Substituenten, c) nukleophile Substitution der Tosylatgruppe durch Di- und Oligoamine mit verschiedenen Spacerstrukturen (X) (EDA=Ethylendiamin, TAEA=2,2,2-Triaminotriethylamin, TEPA=Tetraethylenpentamin, TETA=Triethylentetramin, TODA=4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin).

Durch nukleophile Substitution der Tosylatgruppen der Tosylcellulosen bzw. der Tosylcellulosecarbanilate durch Di- oder Oligoamine in DMSO wurden in einem folgenden Reaktionsschritt Aminocellulosederivate erhalten. Als aminhaltige Substituenten wurden Ethylendiamin (EDA), 2,2,2-Triaminotriethylamin (TAEA), Tetraethylenpentamin (TEPA), Triethylentetramin (TETA) und 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (TODA) eingesetzt. Die erhaltenen Strukturen der Aminocellulosederivate sind in Abbildung 3-2 illustriert.

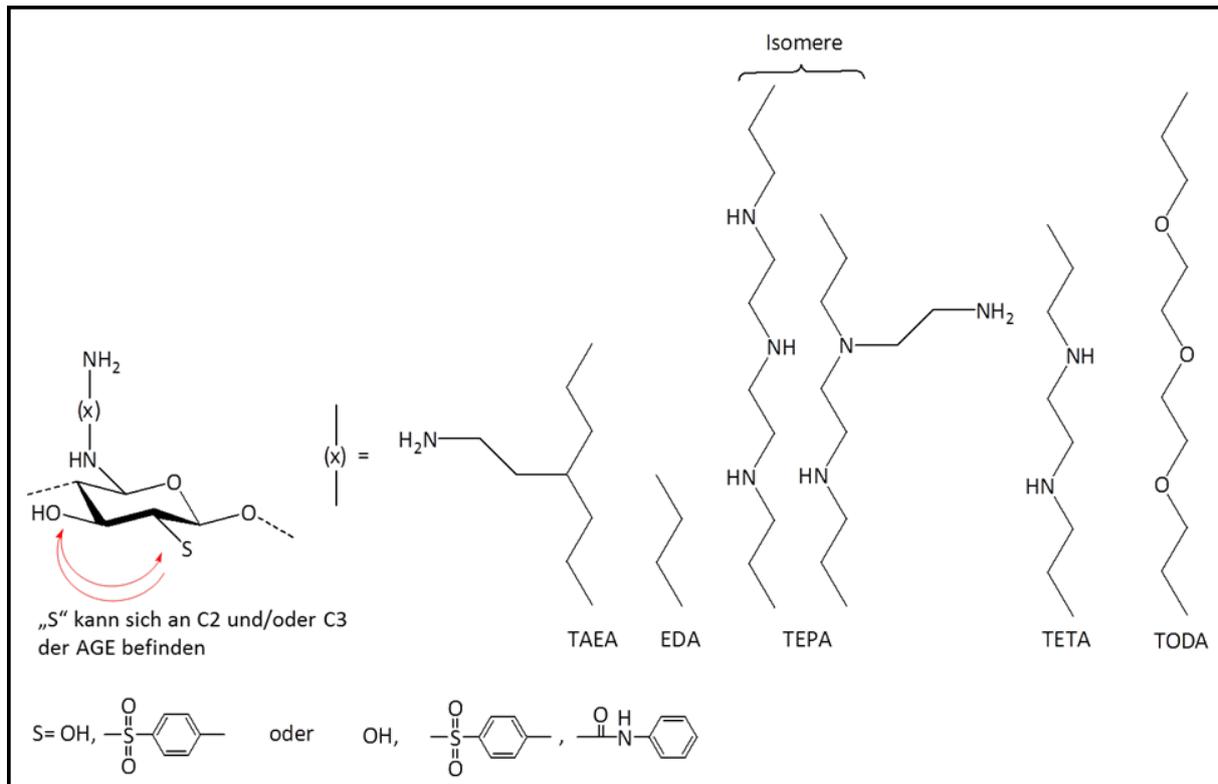


Abbildung 3-2: Formelschema der synthetisierten Aminocellulosederivate mit Variation der löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S) und verschiedenen Spacerstrukturen (x): TAEA=2,2,2-Triaminotriethylamin, EDA=Ethyldiamin, TEPA=Tetraethylenpentamin, TETA=Triethylentetramin, TODA=4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin.

Die DS-Werte der Di- und Oligoamin-Substituenten ( $\text{DS}_{\text{Di-, Oligoamin}}$ ) lagen zwischen 0,35 und 0,88. Die  $\text{DS}_{\text{Di-, Oligoamin}}$ -Werte waren dabei kleiner als die des ursprünglichen  $\text{DS}_{\text{Tosylat}}$ -Wertes (1,0). Ein Teil der Tosylatgruppen an Position C6 wurde unter den Reaktionsbedingungen der nukleophilen Substitution unter Erhalt von Hydroxylgruppen hydrolysiert. Die Tosylatgruppen, welche bei der Tosylierung an Position C2 eingeführt wurden, verblieben während der nukleophilen Substitution [Berlin et al. 2000], so dass die erhaltenen Aminocellulosederivate noch einen  $\text{DS}_{\text{Tosylat}}$  (0,05-0,39) an Position C2 besaßen (vgl.  $\text{DS}_{\text{Tosylat}}$  in Tabelle 3-1). Die synthetisierten Aminocellulosederivate ohne zusätzlich eingeführte löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S) werden daher als Aminocelluloseosylate bezeichnet. Die erhaltenen Aminocellulosederivate, an welche noch Carbanilat-Substituenten an Position C2/C3 der AGE eingeführt wurden, werden als Aminocellulosecarbanilate bezeichnet.

Die im Rahmen der Arbeit synthetisierten Aminocellulosederivate bezüglich der Variation der Spacerstruktur (X) sind im Folgenden aufgeführt:

- 6-Deoxy-6-Ethylendiamin-Cellulose (EDA-Cellulose)
- 6-Deoxy-6-(Tris(2-aminoethyl)amin)-Cellulose, (TAEA-Cellulose)
- 6-Deoxy-6-(Tetraethylenpentamin)-Cellulose (TEPA-Cellulose)
- 6-Deoxy-6-(Triethylentetramin)-Cellulose (TETA-Cellulose)
- 6-Deoxy-6-(4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin)-Cellulose (TODA-Cellulose)

Bis auf die TODA-Cellulose wurden die aufgezählten Aminocellulosederivate sowohl als Aminocelluloseosylate als auch Aminocellulosecarbanilate synthetisiert (vgl. Tabelle 3-1).

Die Strukturaufklärung der beschriebenen Aminocellulosederivate wurde bereits von Tiller et al. [1999], Berlin et al. [2000] sowie Jung und Berlin [2005] beschrieben. Dabei konnte durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Aufnahmen und IR-Spektroskopie die beschriebene Struktur der Aminocellulosederivate nachgewiesen werden. Die Substitutionsgrade der aminhaltigen Substituenten der im Rahmen der Arbeit synthetisierten Aminocellulosederivate wurden durch Elementaranalyse (EA) bestimmt.

Die Synthese neuartiger Aminocellulosederivate mit einem kleineren Polymerisationsgrad von rund 50 erfolgte ausgehend von Cellulose (Avicel). Durch Kochen der Cellulose mit 2,5 M Salzsäure für 15 Minuten (saure Hydrolyse) wurden die amorphen Bereiche der Cellulose zu Oligosaccharid- und Glucose-Einheiten gespalten, wohingegen die kristallinen Bereiche erhalten blieben [Meiland et al. 2011]. Nach Filtrieren und Waschen konnte eine mikrokristalline Cellulose mit einem  $\text{DP}\sim 50$  – bestimmt durch GPC in DMA/LiCl - erhalten werden. Die Polymerisationsgrade (DP) der Aminocellulosederivate konnten nicht bestimmt werden, weshalb die Unterscheidung der Aminocellulosen hinsichtlich des DP-Wertes nur über den jeweiligen DP der Ausgangscellulose ( $\text{DP}\sim 200$  oder 50) möglich war. Ausgehend von der niedermolekularen Cellulose ( $\text{DP}\sim 50$ ) konnten Aminocelluloseosylate nach den beschriebenen Synthesesequenzen mit kleineren Polymerisationsgraden synthetisiert werden (Tabelle 3-1). Die  $\text{DS}_{\text{Di-Oligoamin}}$ -Werte der Aminocelluloseosylate mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50 AGE lagen zwischen 0,64 und 0,88. Sie unterschieden sich damit nicht signifikant von den  $\text{DS}_{\text{Amin}}$ -Werten der Aminocellulosen mit einem  $\text{DP}\sim 200$ .

Tabelle 3-1: Struktureigenschaften der synthetisierten Aminocellulosederivate.

Nr. <sup>a</sup>	Di-, Oligoamin an C6 <sup>b</sup>	Gruppen an C2/C3	DP <sup>c</sup>	DS <sub>Di-, Oligoamin</sub>	DS <sub>Tosylat</sub>	DS <sub>Carbanilat</sub>
<b>1a</b>	EDA	OH, Tosylat	200	0,80	0,13	-
<b>1b</b>	EDA	OH, Tosylat	200	0,75	0,05	-
<b>2a</b>	TAEA	OH, Tosylat	200	0,80	0,13	-
<b>2b</b>	TAEA	OH, Tosylat	200	0,71	0,06	-
<b>3</b>	TEPA	OH, Tosylat	200	0,73	0,14	-
<b>4</b>	TETA	OH, Tosylat	200	0,83	0,14	-
<b>5</b>	TODA	OH, Tosylat	200	0,70	0,06	-
<b>6</b>	EDA	OH, Tosylat, Carbanilat	200	0,63	0,08	0,91
<b>7</b>	TAEA	OH, Tosylat, Carbanilat	200	0,36	0,10	1,08
<b>8</b>	TEPA	OH, Tosylat, Carbanilat	200	0,48	0,17	1,36
<b>9</b>	TETA	OH, Tosylat, Carbanilat	200	0,50	0,16	1,33
<b>10a</b>	EDA	OH, Tosylat	50	0,88	0,39	-
<b>10b</b>	EDA	OH, Tosylat	50	0,82	0,07	-
<b>11</b>	TAEA	OH, Tosylat	50	0,67	0,10	-
<b>12</b>	TEPA	OH, Tosylat	50	0,64	0,11	-
<b>13</b>	TODA	OH, Tosylat	50	0,83	0,14	-

<sup>a</sup>Die mit **a** und **b** gekennzeichneten Derivate wurden in unterschiedlichen Ansätzen synthetisiert.

<sup>b</sup>EDA=Ethylendiamin, TAEA=2,2,2-Triaminotriethylamin, TEPA=Tetraethylenpentamin, TETA=Triethylentetramin und TODA=4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin

<sup>c</sup>Polymerisationsgrad der Ausgangscellulose.

### 3.1.1 Löslichkeitseigenschaften der synthetisierten Aminocellulosederivate

Das Löslichkeitsverhalten der synthetisierten Aminocellulosederivate wurde maßgeblich durch die Substituenten an Position C2/C3 der Aminocellulosederivate beeinflusst [Tiller et al. 2000]. So waren die synthetisierten Aminocellulosesosylate, an denen an Position C2/C3

nur Tosylatgruppen oder Hydroxylgruppen saßen (**1-5**, **10-13**) in Wasser löslich, Aminocellulosederivate mit Carbanilat-Substituenten an Position C2/C3 der AGE (**6-9**) waren in organischen Lösungsmitteln wie DMSO, DMF und DMA löslich.

Das Löslichkeitsverhalten war neben der Struktur der Aminocellulosederivate auch von der Lagerdauer abhängig. Die Aminocelluloseosylate waren nach wenigen Tagen Standzeit nicht mehr in Wasser löslich. So war das EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) nach 20 Tagen Standzeit nicht mehr in Wasser löslich. Das TAEA-Celluloseosylat (DP~200, **2b**) konnte schon nach 14 Tagen nicht mehr in Wasser gelöst werden. Dies zeigte, dass die Löslichkeitseigenschaften bzw. die Änderung dieser nach einer definierten Standzeit abhängig von der Spacerstruktur (X) des Aminocellulosederivates war. Diese Tatsache bestätigt den in der Literatur beschriebenen Befund, dass durch Crosslinking der einzelnen Aminocelluloseketten – verursacht durch Wasserstoffbrückenbindungen und Reaktion der Aminogruppen mit Tosylatgruppen – die Aminocelluloseosylate ihre Löslichkeit mit zunehmender Lagerdauer verlieren. Dabei spielen wahrscheinlich die Basizität sowie die Anzahl der Aminogruppen eine wichtige Rolle, da diese verantwortlich für die von Tiller et al. beschriebene Selbstaggregation der Aminocelluloseketten sind [Tiller et al. 1999]. Das TAEA-Celluloseosylat (DP~200, **2b**) mit einer größeren Anzahl Aminogruppen im Vergleich zum EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) war daher nach kürzerer Standzeit schon nicht mehr in Wasser löslich.

Das Aminocellulosederivat EDA-Celluloseosylat (DP~50, **10b**) mit einem DP~50 war ebenfalls nach 20 Tagen nicht mehr in Wasser löslich. Dabei zeigte sich kein Unterschied zu dem EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) mit dem DP~200. Der Polymerisationsgrad hat schlussfolgernd von dieser Tatsache keinen Einfluss auf die Ausbildung der Aminocellulose-Aggregate. Wegen des Löslichkeitsverlust der Aminocelluloseosylate wurden die Aminocelluloseosylate (**1-5**, **10-13**) als 1 %ige Lösungen gelagert.

Bei der Lagerung in Lösung konnte eine Zunahme von sogenannten Mikrogelen in der Lösung der Aminocelluloseosylate (**1-5**, **10-13**) beobachtet werden, welche sich nicht mehr durch Behandlung mit Ultraschall lösen ließen. Die Ursachen der Mikrogelbildung in Lösung sind die gleichen wie die der Aggregation der Polymerketten als Feststoff [Berlin et al. 2000].

Die Aminocellulosecarbanilate (**6-9**) waren nicht in Wasser, dafür aber in organischen Lösungsmitteln wie DMSO, DMF und DMA löslich. Dabei verloren die

Aminocellulosecarbanilate auch nach mehreren Wochen Standzeit nicht ihre Löslichkeit in den organischen Lösungsmitteln. Allerdings wurde bei dem EDA-Cellulosecarbanilat (**6**) mit zunehmender Standzeit und anschließender Lösungsmittelzugabe eine Zunahme ungelöster EDA-Cellulosecarbanilat-Partikel in der DMA-Lösung des Derivates beobachtet. Dies lässt ebenfalls auf die Bildung der beschriebenen Mikrogele schließen. Allerdings sind die Crosslinking-Reaktionen, welche die Ausbildung der Mikrogele verursachen, bei den Aminocellulosecarbanilaten weit weniger ausgeprägt, da weniger freie Hydroxylgruppen für Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminogruppen und Hydroxylgruppen zur Verfügung stehen. Dieser Befund wird beispielsweise für das PDA-Cellulosecarbanilat in der Literatur beschrieben [Berlin et al 2000]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Aminocellulosecarbanilate als Feststoffe gelagert und vor dem Einsatz zur Oberflächenmodifizierung frisch in DMF gelöst.

Tabelle 3-2: Struktur- und Löslichkeitseigenschaften ausgewählter synthetisierter Aminocellulosederivate (**1b**, **2b**, **6** und **10b**).

Nr.	Di-, Oligoamin an C6 <sup>a</sup>	Gruppen an C2/C3	DP <sup>b</sup>	DS <sub>Di-, Oligoamin</sub>	DS <sub>Tosylat</sub>	DS <sub>Carbanilat</sub>	Unlöslich nach Lagerzeit (LM) <sup>c</sup>
<b>1b</b>	EDA	OH, Tosylat	200	0,75	0,05	-	20 Tage (H <sub>2</sub> O)
<b>2b</b>	TAEA	OH, Tosylat	200	0,71	0,06	-	14 Tage (H <sub>2</sub> O)
<b>6</b>	EDA	OH, Tosylat, Carbanilat	200	0,63	0,08	0,91	>3 Jahre (DMF)
<b>10b</b>	EDA	OH, Tosylat	50	0,82	0,07	-	20 Tage (H <sub>2</sub> O)

<sup>a</sup>Ethylendiamin (EDA), Tris-(aminoethyl)amin (TAEA),

<sup>b</sup>Polymerisationsgrad der Ausgangscellulose.

<sup>c</sup>Maximale Lagerzeit als Feststoff bis die Aminocellulose in dem angegebenen Lösungsmittel (LM) nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte.

### 3.2 Aminocellulose-modifizierte Substratmaterialien

Für die Modifizierung von Substraten aus Polyethylen (PE) mit dem Aminocellulose Typ war eine Vorbehandlung zur Erzeugung von Elektronendonator-Eigenschaften und –akzeptor-Eigenschaften erforderlich. Als Polyethylensubstrate wurden planaren PE-Chips (ChipShop), PE-Mikrofilter (für ABICAP Anwendungen, Porex) sowie PE-Membranen (für LFA Anwendungen, Porex) mit Aminocellulose modifiziert. Neben den verschiedenen

Polyethylensubstraten wurden AFM-Glimmerscheiben mit Aminocellulosederivaten modifiziert. Für den Glimmer war keine Vorbehandlung zur Ausbildung der Aminocellulosefilme notwendig. Die Eigenschaften der ausgewählten Substrate, welche mit Aminocellulose modifiziert wurden, sind in Tabelle 3-3 zusammengestellt.

Tabelle 3-3: Ausgewählte Substrate und ihre Größenabmessung, Porosität und Modifizierungsfläche.

Substrate	Abmessung [mm] <sup>a</sup>	Porosität [ $\mu\text{m}$ ] <sup>b</sup>	Gesamte (innere) Substrat-Oberfläche
(a) PE-Mikrofilter	$\phi=5$ mm, h=2,5 mm	20-40	20 cm <sup>2</sup>
(b) PE-Membran	l= 10 cm; b=2,5 cm, h=0,25 mm	7-12	N/A
(c) PE-Chip	l=b=13 mm	Planar	N/A
(d) AFM-Glimmer	$\phi= 10$ mm	Planar	N/A

<sup>a</sup>  $\phi$ =Durchmesser einer runden Grundfläche, h=Höhe; l=Länge, b=Breite

<sup>b</sup>Durchschnittliche Porengrößen

### 3.2.1 Vorbehandlung der Substrate

Spontane adhäsive Eigenschaften für die Bildung von Aminocellulosekompositen gehen z. B. von nativen Oxidschichten oder von elektronischen komplementären Materialien wie Gold und Silber aus. Bei Polymeren wie Polyethylen, die nicht von vornherein zur Kompositbildung geeignet sind, werden Adhäsionseigenschaften durch die Einführung von O-Funktionen auf der Oberfläche mittels geeigneter Methoden erzeugt. Das gelang bei den in Tabelle 3-3 verwendeten Substraten im Plasmagenerator durch O<sub>2</sub>-Plasma-Behandlung oder durch Ozonbehandlung. Bei beiden Methoden wurden die Substrate durch aktive Sauerstoffspezies von Verunreinigungen befreit. Außerdem wurden zusätzlich O-Funktionen, wie z. B. Hydroxyl-, Aldehyd- und Epoxy-Gruppen, auf den Substraten mit hoher Dichte eingeführt (Abbildung 3-3). Diese O-Funktionen haben Elektronendonator-Eigenschaften und -akzeptor-Eigenschaften, welche für die Adhäsionseigenschaften verantwortlich waren. Die einbezogenen Methoden der Vorbehandlung zur Erzeugung von O-Funktionen wurden hinsichtlich ihrer Effektivität zur Erzeugung von O-Funktionen auf den Substraten getestet. Dazu wurden die vorbehandelten Substrate mit Aminocellulosederivat modifiziert und als Maßzahl die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration pro Quadratzentimeter auf der Substratfläche bestimmt (Kapitel 3.2.3). Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass je mehr

O-Funktionen erzeugt werden, desto einheitlicher die Modifizierung der Oberfläche mit Aminocellulose stattfand. Dabei zeigte sich, dass beide Methoden geeignet waren um die Substrat-Oberflächen ausreichend mit O-Funktionen zu „aktivieren“, und so anschließend  $\text{NH}_2$ -Endgruppen durch Modifizierung mit Aminocellulose auf die Oberfläche einzuführen. Nach der Behandlung der Substratmaterialien im  $\text{O}_2$ -Niederdruck-Plasmagenerator und der anschließenden Modifizierung mittels Aminocellulosederivat wurden die höchsten Werte der Aminogruppen-Konzentration ( $\text{nmol NH}_2/\text{PE-Substrat}$ ) erhalten (Tabelle 3-4). Die Anzahl der Aminogruppen spiegelt die Flächenbedeckung der Oberfläche mit Aminocellulose wider. Dabei bewährte sich eine beidseitige Behandlung der Substrate bei einer Verweildauer von je fünf Minuten im  $\text{O}_2$ -Niederdruck-Plasmagenerator. Diese Vorbehandlung der Substrate diente in der vorliegenden Arbeit als Standardmethode.

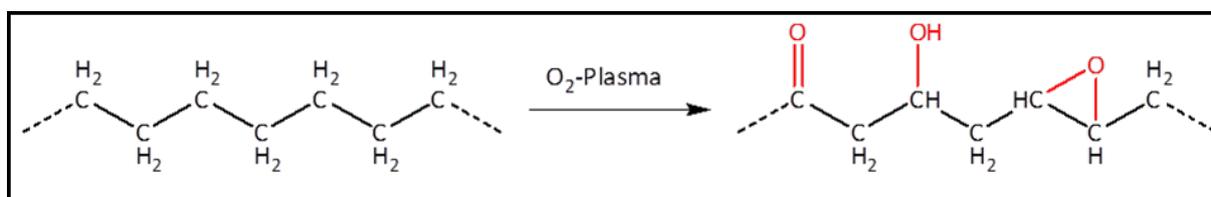


Abbildung 3-3: Allgemeines Formelschema der Erzeugung von O-Funktionen auf der Oberfläche von PE-Substratmaterialien.

### 3.2.2 Modifizierung von Substraten mit Aminocellulosederivaten

Die Modifizierung der vorbehandelten Substratmaterialien erfolgte durch Behandlung mit einer 0,05 %igen Lösung eines Aminocellulosederivates als Modifizierungslösung. Die Bereitung der Modifizierungslösungen erfolgte aus der gelagerten 1 %igen Stammlösung der Aminocelluloseosylate oder durch Lösen der als Feststoff gelagerten Aminocellulosecarbanilate in DMF. Die bei der Lagerung der Aminocellulosederivate sich bildenden Mikrogele wurden vor der Behandlung der Substrate durch Filtration mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße  $5\ \mu\text{m}$ , Sartorius) abgetrennt. Zusätzlich wurden die Aminocellulosederivat-Lösungen vor der Behandlung der Substrate noch für zehn Minuten mit Ultraschall behandelt, um kleinere Aggregate der Aminocellulosen wieder zu vereinzeln.

Die porösen Substrate (Polyethylenmikrofilter, Polyethylenmembran) wurden unter Vakuumbedingungen für 15 Minuten mit Modifizierungslösung behandelt, um eine Benetzung in den Poren sicherzustellen. Die planaren Substrate (Polyethylenchip, AFM-Glimmer) wurden mit Hilfe eines Spincoaters modifiziert. Dazu wurden zweimal  $10\ \mu\text{l}$  der 0,05 %igen Aminocellulosederivat-Lösungen auf die rotierenden Substrate aufgebracht.

Alle mit Aminocellulosederivaten modifizierten Substrate wurden nach der Modifizierung mehrmals mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Wasser, DMF) gewaschen und anschließend getrocknet.

### **3.2.3 NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten Substrate in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit**

Die verschiedenen Substrate aus Tabelle 3-3 wurden mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) nach dem beschriebenen Vorgehen modifiziert und anschließend die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der Substratoberflächen mit der Tritylchloridmethode bestimmt. Auf den unbehandelten Substraten konnte keine NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration gefunden werden. Nach der Vorbehandlung mit O<sub>2</sub>-Plasma wurde eine geringe NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration bestimmt. Die Ursache dafür sind Anlagerungen des Tritylkations an OH-Gruppen, allerdings mit bedeutend geringerer Affinität als an NH<sub>2</sub>-Funktionen. Das erklärt, dass nach der Vorbehandlung mit O<sub>2</sub>-Plasma eine NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration mit der Tritylchloridmethode auf den Substraten gefunden wurde (vgl. Tabelle 3-5).

Die mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten Substrate wiesen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung unterschiedliche NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentrationen auf. Die unterschiedlichen NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentrationen der mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten Polyethylensubstrate in Abhängigkeit von der Vorbehandlung wurde in Kapitel 3.2.1 diskutiert.

Durch die Bestimmung der NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration konnte bewiesen werden, dass die ausgewählten PE Substrate mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifiziert werden konnten. Unterschiedliche Anzahlen an NH<sub>2</sub>-Gruppen pro Substrat wurden aufgrund unterschiedlicher großer Oberflächen der Substrate erhalten.

Auf dem AFM-Glimmer wurde keine Bestimmung der NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration durchgeführt, jedoch wurden diese für Aufnahmen mit *Atomic Force Microscopy* (AFM) zur Beurteilung der Aminocellulose-modifizierten Oberfläche verwendet (Kapitel 3.2.6).

Die PE-Mikrofilter wurden, wegen der einfachen Handhabbarkeit und der vom Hersteller (Porex) garantierten Reproduzierbarkeit sowie der definierten inneren Oberfläche für die weiteren Untersuchungen der mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate verwendet.

Tabelle 3-4:  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration, bestimmt mittels Tritylchloridmethode, von unbehandelten, mit  $\text{O}_2$ -Plasma vorbehandelten und mit EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , **1b**) modifizierten Polyethylensubstraten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.

Substrate	NH <sub>2</sub> -Endgruppen-Konzentration [nmol /Substrat] der unbehandelte und mit EDA-Celluloseosylat modifizierten Substrate in Abhängigkeit von der Vorbehandlung			
	Nicht modifiziert		Mit EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , <b>1b</b> ) modifiziert	
	Keine Vorbehandlung	$\text{O}_2$ -Plasma	$\text{O}_2$ -Plasma	Ozon
(a) PE-Mikrofilter	-	0,2	2,0	1,6
(b) PE-Membran	-	1,1	16,2	N/A
(c) PE-Chip	-	0,04	0,34	0,30

### 3.2.4 NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter in Abhängigkeit des Aminocellulosederivates

Wie beschrieben gelang die Modifizierung der ausgewählten Substrate mittels EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , **1b**), wie die Werte der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten Substrate in Tabelle 3-4 zeigen. Die Oberflächeneigenschaften – wie  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration oder die Höhe der Aminocellulosefilme - der modifizierten Substrate sind abhängig von der Spacerstruktur (X), der Löslichkeitsvermittelnden Gruppe (S) und des Polymerisationsgrades der Aminocellulosederivate [Jung et al. 2007]. Um den Einfluss der Derivatstruktur auf den Grad der Modifizierung bzw. den Wert der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration pro Quadratzentimeter innere Oberfläche zu untersuchen, wurden PE-Mikrofilter mit einer Reihe von Aminocellulosederivaten modifiziert. Hinsichtlich der Variation der Derivatstrukturen wurden das EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , **1b**), das TAEA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , **2b**), das EDA-Cellulosecarbanilat ( $\text{DP}\sim 200$ , **6**) und das EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 50$ , **10b**) zur Modifizierung der PE-Mikrofilter ausgewählt. Dabei zeigten die modifizierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivat unterschiedliche  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen, wie die Werte der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration in Tabelle 3-5 zeigen.

Beispielsweise war die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der mit TAEA-Celluloseosylat ( $\text{DP}\sim 200$ , **2b**) modifizierten PE-Mikrofiltern ( $0,18 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ) fast doppelt so hoch im

Vergleich zu den mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten PE-Mikrofiltern ( $0,10 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ). Die Ursache ist in der Spacerstruktur (X) der Aminocellulosederivate zu finden. Das TAEA-Celluloseosylat (DP~200, **2b**) besitzt bei gleichem  $DS_{\text{Di-, Oligoamin}}$  pro AGE die doppelte Menge primärer  $\text{NH}_2$ -Endgruppen, was sich auf die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der modifizierten Substrate niederschlägt.

Tabelle 3-5:  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivat. Die Vorbehandlung erfolgte mit  $\text{O}_2$ -Plasma.

Aminocellulosederivat	Länge des $\text{NH}_2$ - Endgruppen-Spacers [nm] <sup>a</sup>		$\text{NH}_2$ -Endgruppen- Konzentration [nmol/cm <sup>2</sup> ]
EDA-Celluloseosylat ( <b>1b</b> , DP~200)	0,38		$0,10 \pm 0,01$
TAEA-Celluloseosylat ( <b>2b</b> , DP~200) <sup>b</sup>	0,59	0,71	$0,18 \pm 0,02$
EDA-Cellulosecarbanilat ( <b>6</b> , DP~200)	0,38		$0,58 \pm 0,06$
EDA-Celluloseosylat ( <b>10b</b> , DP~50)	0,38		$0,16 \pm 0,02$

<sup>a</sup>Kalkulation der N...N Spacer der Di-, oder Oligoaminstruktur mittels Chem3D nach MM2 Energieminimierung.

<sup>b</sup>Der TAEA-Rest besitzt zwei  $\text{NH}_2$ -Endgruppen mit unterschiedlichen Spacerlängen.

Bei gleichbleibender Spacerstruktur (X) und unterschiedlichem DP der Aminocellulosederivate waren ebenfalls Unterschiede in der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter zu erkennen. So war die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der mit EDA-Celluloseosylat (DP~50, **10b**) modifizierten PE-Mikrofilter ( $0,16 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ) höher als die der mit der EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten PE-Mikrofilter ( $0,10 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ). Möglicherweise waren die Aminocellulosefilme des EDA-Celluloseosylat (DP~50, **10b**) dichter gepackt als die mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten PE-Mikrofilter.

Die mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierten PE-Mikrofilter wiesen eine deutlich höhere  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration ( $0,56 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ) auf als die mit EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**) modifizierten PE-Mikrofilter ( $0,10 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ).

Das belegt, dass die  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration Aminocellulose-modifizierter PE-Mikrofilter auch von den löslichkeitsvermittelnden Gruppen (S) der Aminocellulosederivat-Struktur abhängt.

Die wichtigste Erkenntnis für die Entwicklung von POCT auf PE-Basis ist, dass mit allen verwendeten Aminocellulosederivaten eine Aminofunktionalisierung der PE-Mikrofilter möglich ist.

### 3.2.5 NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentrationen der modifizierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit der Lagerzeit der Aminocellulosederivate

Die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten PE-Mikrofilter hing neben der Struktur des Aminocellulosederivates auch von der Standzeit der Aminocellulosederivate ab. Mit zunehmender Standzeit ausgewählter 1%iger Aminocellulosestammlösungen und erneuter Modifizierung der PE-Mikrofilter mit den gelagerten Stammlösungen, stieg die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten PE-Mikrofilter (vgl. Tabelle 3-6).

So war bei PE-Mikrofiltern, welche in unregelmäßigen Zeitabständen (1, 7, 56, 120 und 300 Tage) mit denselben Aminocellulosestammlösungen – wie EDA-Cellulosestammlösung (DP~200, **1b**), TAEA-Cellulosestammlösung (DP~200, **2b**) und EDA-Cellulosestammlösung (DP~50, **10b**) modifiziert wurden, ein Anstieg bis zum Tag 56, der NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der modifizierten PE-Mikrofilter zu beobachten. Nach 56 Tagen Standzeit der Aminocellulosestammlösungen und erneuter Modifizierung der PE-Mikrofilter stieg die NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration nicht signifikant weiter an sondern blieb konstant.

Der Anstieg der NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration von mit Aminocellulosestammlösung modifizierten PE-Mikrofiltern in Abhängigkeit von der Standzeit der Aminocellulosestammlösungen kann durch die Bildung von *Self-Assembled*-Aminocellulosekompositen (Mikrogele) der Aminocellulose-Polymerketten in Lösung erklärt werden. Die dadurch gebildeten supramolekularen Komposite waren nach einer fortgeschrittenen Lagerzeit so stabil, dass sie sich durch Ultraschall-Behandlung nicht mehr in die ursprünglichen Polymerketten vereinzeln ließen. Durch die gebildeten Aminocellulosekomposite in Lösung bildeten sich während der Modifizierung der Substrate Areale mit Multilayer-Schichten von Aminocellulose, wohingegen bei kurzer Standzeit keine bzw. kleinere Aminocellulose-Assoziate in Lösung vorlagen und auf den modifizierten Substraten Monolayer-ähnliche Filme auf der Oberfläche ausgebildet wurden. Durch die Areale auf der Oberfläche, welche mit *Self-Assembled*-Aminocellulosekompositen modifiziert waren, lagerten sich mehr Aminocellulose-Polymerketten als bei einer Aminocellulose-Monolage auf der Oberfläche ab. Der Anstieg

der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration der PE-Mikrofilter in Abhängigkeit von der Standzeit der Aminocelluloseosylate kann daher mit der Bildung von Aminocellulosekompositen in Lösung begründet werden.

Tabelle 3-6:  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen der mit verschiedenen Aminocellulosederivaten modifizierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit vom Aminocellulosederivat und der Standzeit des Aminocellulosederivates.

Aminocellulosederivat	$\text{NH}_2$ -Konzentration [ $\text{nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ] in Abhängigkeit von der Standzeit in Tagen der Aminocellulosederivate				
	1	7	56	120	300
EDA-Cellulosecarbanilat ( <b>6</b> ) <sup>a</sup>	-----0,56±0,06 (konstant)-----				
EDA-Celluloseosylat ( <b>1b</b> ) <sup>b</sup>	0,10±0,01	0,12±0,01	0,26±0,05	0,23±0,05	0,29±0,06
TAEA-Celluloseosylat ( <b>2b</b> ) <sup>b</sup>	0,18±0,02	0,21±0,02	0,29±0,06	0,29±0,08	0,31±0,07
EDA-Celluloseosylat ( <b>10b</b> ) <sup>b</sup>	0,16±0,02	0,19±0,02	0,24±0,06	0,28±0,08	0,25±0,07

<sup>a</sup>Gelagert als Feststoff bei RT.

<sup>b</sup>Gelagert als 1%ige Lösung in Wasser bei Raumtemperatur (RT).

Durch die Bildung der *Self-Assembled*-Aminocellulosekomposite wurde aber auch die Qualität der Nanostruktur auf der Substratoberfläche beeinflusst. Die schwankenden  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen der mit EDA-Celluloseosylat ( $\text{DP} \sim 200$ , **1b**) modifizierten PE-Mikrofilter nach einer Standzeit der Stammlösung von 56 Tagen ( $0,26 \pm 0,05 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ), 120 Tagen ( $0,23 \pm 0,05 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ) und 300 Tagen ( $0,29 \pm 0,06 \text{ nmol NH}_2/\text{cm}^2$ ) deuten an, dass die Aminocellulosekomposit-Nanostruktur nicht einheitlich auf der Oberfläche vorherrschte. Es wechselten sich Bereiche verschiedener Aminocellulosederivat-Schichtdicken ab (vgl. Abbildung 3-5). Die Substratmodifizierung mittels gealterter Aminocelluloselösungen hatte auf die beabsichtigte Aminocellulosekompositbildung unter Erhalt definierter Oberflächeneigenschaften einen negativen Einfluss. Dadurch ging die Reproduzierbarkeit und auch die definierte Nanostruktur verloren.

Mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $\text{DP} \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Mikrofiltern wurden, unabhängig von der Standzeit des EDA-Cellulosecarbanilates ( $\text{DP} \sim 200$ , **6**) als Feststoff, immer die gleichen  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentrationen erzielt. Eine Zunahme der  $\text{NH}_2$ -Endgruppen-Konzentration durch Bildung von *Self-Assembled*-Aminocellulosekomposite wurde auf den

PE-Mikrofiltern, welche mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifiziert wurden, nicht beobachtet.

### 3.2.6 AFM-Untersuchungen von Aminocellulose-modifizierten Glimmersubstraten

Neben der Bestimmung der NH<sub>2</sub>-Endgruppen-Konzentration der mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate sollten AMF-Untersuchungen Aufschluss über die Qualität der modifizierten Substratoberflächen bringen. Dabei sollte herausgefunden werden, welche Derivatstrukturen oder Standzeiten der Aminocellulosederivate Topographien ähnlich einer Aminocellulose-Monolage oder aber dickerer Aminocellulosefilme ermöglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob modifizierte und nicht modifizierte Strukturbereiche der modifizierten Substratoberflächen auftreten oder ob eine einheitliche Modifizierung der Substratoberfläche erfolgt. Dazu wurden Modifizierungsprozeduren ausgehend von ausgewählten Aminocellulosederivaten auf Glimmersubstraten durchgeführt. Glimmersubstrate eignen sich aufgrund ihrer geringen Rauigkeit nachweislich für AFM-Untersuchungen, um gegebenenfalls Aminocellulose-Monolagen-ähnliche Nanostrukturen (< 5-10 nm, [Berlin et al. 2000]) zu vermessen.

Um keine Ablagerungseffekte von Aminocellulosekompositen auf der Glimmeroberfläche mittels AFM zu vermessen, wurden die planaren Glimmerscheiben mit Hilfe eines Spincoaters mit Aminocellulose modifiziert. Dazu wurden pro Glimmerscheibe zweimal zehn Mikroliter einer 0,05 %igen Aminocellulosederivat-Lösung bei einer Rotation von 9000 U/min aufgegeben. Anschließend wurde die Aminocellulose zehn Minuten auf die Substratoberfläche einwirken lassen, mit bi-distilliertem Wasser gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

Typische Monolayer-Dicken für Aminocellulose-SAM, vermessen mit Ellipsometrie, liegen dabei beispielsweise für EDA-Celluloseosylat bei 1 nm und für TAEA-Celluloseosylat bei 2 nm bis 3 nm [Jung et al. 2007]. Die Profildarstellungen von den mit ausgewählten Aminocellulosederivaten (EDA-Celluloseosylat (DP~200, **1b**), TAEA-Celluloseosylat (DP~200, **2b**), EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) und EDA-Celluloseosylat (DP~50, **10b**)) modifizierten Glimmersubstraten in Abbildung 3-4 zeigen eine Topographie <5 nm, die ähnlich einer Aminocellulosederivat-Monolage auf Glimmersubstrat ist (vgl. [Jung et al 2007]).

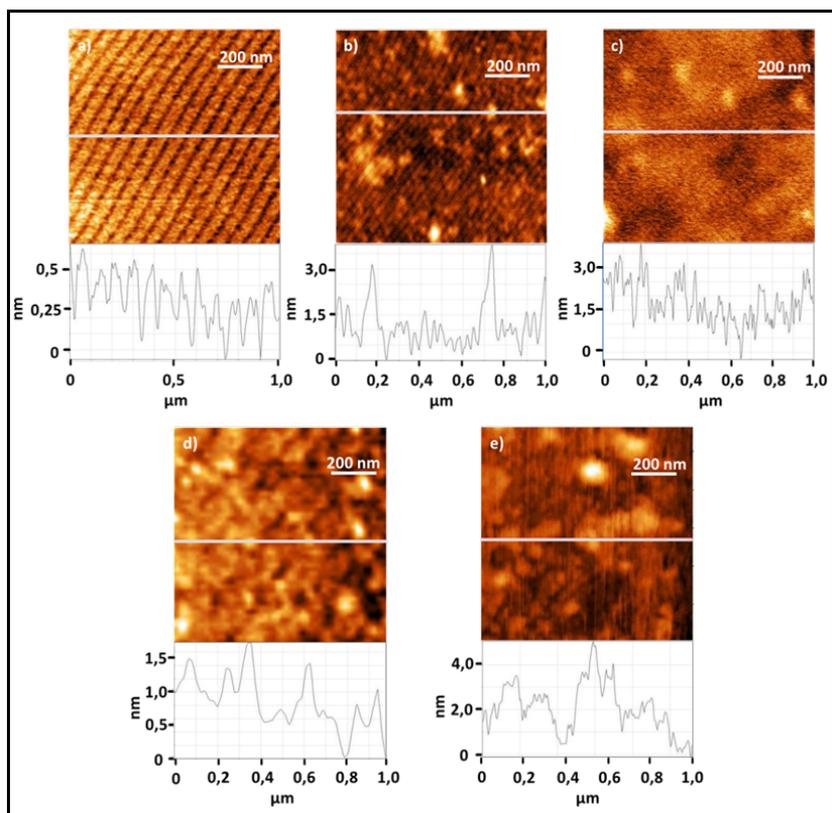


Abbildung 3-4: AFM-Aufnahmen von Aminocellulose-modifizierten AFM-Glimmerscheiben ausgehend von a) nicht modifiziertem AFM-Glimmer; b) EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**), c) EDA-Cellulosestosylat ( $DP \sim 200$ , **1b**), d) TAEA-Cellulosestosylat ( $DP \sim 200$ , **2b**), e) EDA-Cellulosestosylat ( $DP \sim 50$ , **10b**).

Die unterschiedlichen Aminocellulosederivatstrukturen konnten anhand der mittels AFM vermessenen Nanostrukturen der mit Aminocellulosederivaten modifizierten Glimmersubstrate nicht unterschieden werden. Es war darum anhand der AFM-Aufnahmen nicht möglich, ein bevorzugtes Aminocellulosederivat für eine einheitliche flächendeckende Substratmodifizierung auszuwählen. Alle ausgewählten und frisch synthetisierten Aminocellulosederivate bildeten Aminocellulose-Monolagen-ähnlichen Strukturen auf der Glimmer-Substratoberfläche aus.

Bisherige AFM-Untersuchungen von Aminocellulose-modifizierten Substraten zeigten mit zunehmender Standzeit der Aminocellulosederivate und nach erneuter Modifizierung der Substrate eine Zunahme der Schichtdicke. Durch die Bildung der *Self-Assembled*-Aminocellulosekomposite in Lösung lagerten sich diese bei der Modifizierung von Substraten auf deren Oberfläche an. Die AFM-Aufnahmen von mit EDA-Cellulosestosylat ( $DP \sim 200$ , **1b**) modifizierten Glimmersubstraten in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Aminocellulose und anschließender Modifizierung der Glimmersubstrate zeigen ebenfalls eine Zunahme der Schichtdicke mit zunehmender Standzeit der Aminocellulosederivate (Abbildung 3-5).

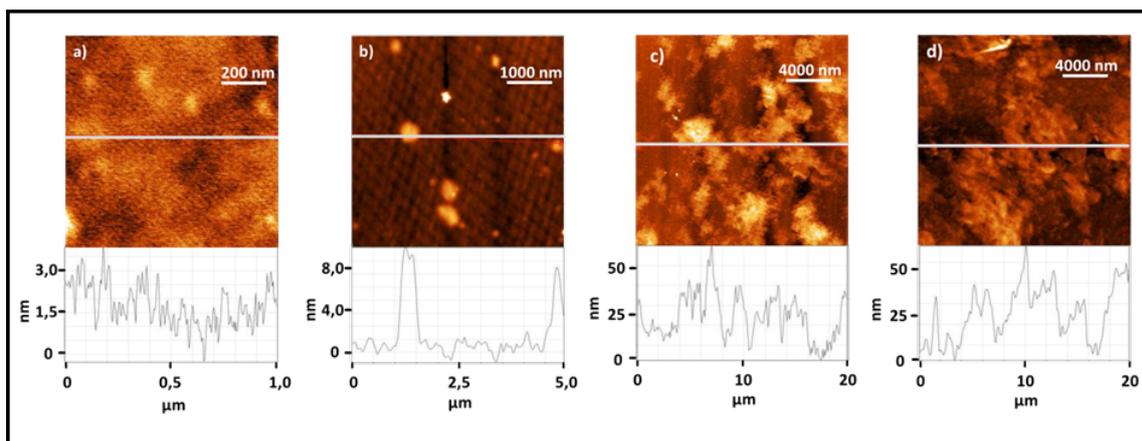


Abbildung 3-5: AFM-Bilder von mit EDA-Cellulosestosylat ( $DP \sim 200$ , **1b**) modifizierten Glimmersubstraten, die mittels EDA-Cellulosestosylat-Lösung ( $DP \sim 200$ , **1b**) nach einer Standzeit der Stammlösung von (1 %w/w) a) 1 Tag, b) 7 Tagen, c) 56 Tagen, d) 120 Tagen hergestellt wurden.

Es ließen sich nach Lagerung der Aminocellulose-Stammlösung von sieben Tagen und erneuter Modifizierung von Glimmerscheiben außerdem nicht modifizierte Areale und mit Aminocellulosekompositen modifizierte Areale erkennen.

Die AFM-Bilder in Abbildung 3-5 ließen schlussfolgern, dass keine reproduzierbaren Aminocellulose-Monolagen-ähnlichen Komposit-Substrate mit nanoskaligen biorelevanten Oberflächeneigenschaften, mit gelagerten Aminocellulosestosylat-Lösungen hergestellt werden konnten. Dabei bildeten sich die *Self-Assembled*-Aminocellulosekompositen bereits direkt nach der Synthese in Lösung aus.

Die Lagerung des EDA-Cellulosecarbanilates ( $DP \sim 200$ , **6**) und frische Bereitung der Modifizierungslösung durch Lösen des EDA-Cellulosecarbanilates ( $DP \sim 200$ , **6**) und anschließender Modifizierung der Glimmersubstrate lieferte die in Abbildung 3-6 erhaltene Profildarstellung. Eine Zunahme der Schichtdicke bedingt durch die Standzeit der EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) als Feststoff, oder das Auftreten nicht modifizierter Areale sind nicht zu erkennen. Für die Erzeugung von reproduzierbaren nanoskaligen Substratoberflächen war das als Feststoff gelagerte EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) gut geeignet. Für die Erzeugung biokompatibler Substrate zur Entwicklung eines diagnostischen Immunoassays war die reproduzierbare flächendeckende Monolagen-ähnliche Modifizierung mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) ein entscheidender Vorteil gegenüber den in Lösung gelagerten Aminocellulosestosylaten.

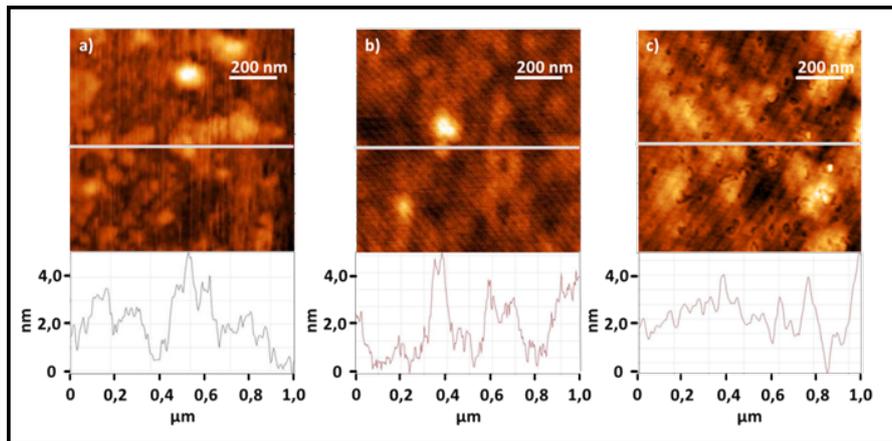


Abbildung 3-6: AFM-Bilder von mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten Glimmersubstraten, die mittels EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) nach einer Standzeit des Feststoffes von a) 1 Tag, b) 56 Tagen, c) 120 Tagen hergestellt wurden.

### 3.3 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate

Zur Bestimmung des diagnostisch relevanten Parameters CRP sollten Anti-h CRP 6404 Antikörper (Medix) auf Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate gemäß verschiedener Immobilisierungsprozeduren immobilisiert werden. Die Anwendung verschiedener Immobilisierungsprozeduren versprach eine Optimierung der Funktionalität der immobilisierten Antikörper.

#### 3.3.1 Benötigte Voraussetzungen für eine reproduzierbare Ak-Immobilisierung

Eine reproduzierbare immobilisierte Ak-Funktion, differenziert nach verschiedenen Immobilisierungsprozeduren, setzt eine einheitliche und flächendeckende Modifizierung mit Aminocellulose auf den PE-Substraten voraus.

Bei der Modifizierung von Substraten mit Aminocelluloseosylaten konnte nicht gewährleistet werden, einen reproduzierbaren und flächendeckenden Aminocellulosefilm zu erhalten. Da sich direkt nach der Synthese die *Self-Assembled*-Aminocellulosekomposite in Lösung ausbildeten, bestand die Gefahr, dass eine Modifizierung von Substraten mittels der Selbstkomposit-haltigen Aminocellulosederivat-Lösungen zu Bereichen unterschiedlicher Modifizierung führen würde. Diese Bereiche unterschiedlicher Modifizierung würden bei der Ak-Immobilisierung Bereiche ungleichmäßiger Antikörperkonzentrationen auf den PE-

Substraten verursachen, wodurch unterschiedlichen Mengen Antigen von PE-Substrat zu PE-Substrat binden würden.

Die unkalkulierbaren Einflüsse der porösen Strukturen der PE-Mikrofilter für den ABICAP-Säulenassay hätten eine komplette Behandlung der Poren mit den Selbstkomposit-haltigen Aminocellulosederivat-Lösungen zusätzlich erschwert, wodurch sich das Problem der Aminocellulose-unmodifizierten Areale verstärkt hätte. Bei der Durchführung des ABICAP-Säulenassays würden sich, durch die inhomogene Antikörperbeladung der PE-Mikrofilter, Bereiche intensiver Farbstoffentwicklung und Bereiche mit weniger intensiver Farbstoffentwicklung ausbilden, welche von PE-Mikrofilter zu PE-Mikrofilter unterschiedlich wären. Die Reproduzierbarkeit der ABICAP-Signale wäre daher durch Verwendung der PE-Mikrofilter zusätzlich gestört.

Eine einheitliche und flächendeckende Modifizierung konnte durch einen Spincoating-Prozess auf Glimmerscheiben erreicht werden. Aus diesem Grund sollten verschiedene Immobilisierungsmethoden auf planaren PE-Chips, welche durch einen Spincoating-Prozess mit Aminocellulose modifiziert wurden, angewandt werden

Der Nachweis eines einheitlichen, flächendeckenden Aminocellulosefilms auf den PE-Chips sollte durch AFM-Aufnahmen erfolgen. Jedoch wiesen die PE-Chips ein Profil mit einer Rauigkeit  $> 50$  nm auf, weshalb eine einheitliche Monolagen-ähnliche Modifizierungen mit Rauigkeiten von  $\sim 5$  nm auf den PE-Chips nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3-7).

Aufgrund der fehlenden Qualitätssicherung der Aminocellulosefilme auf den PE-Chips eignete sich aufgrund der weit weniger ausgeprägten Ausbildung von Selbstkompositen bevorzugt das EDA-Cellulosecarbanilat (DP $\sim$ 200, **6**). Mit den Aminocelluloseosylaten konnte auf den PE-Substraten keine reproduzierbare einheitliche Modifizierung der PE-Substrate garantiert werden.

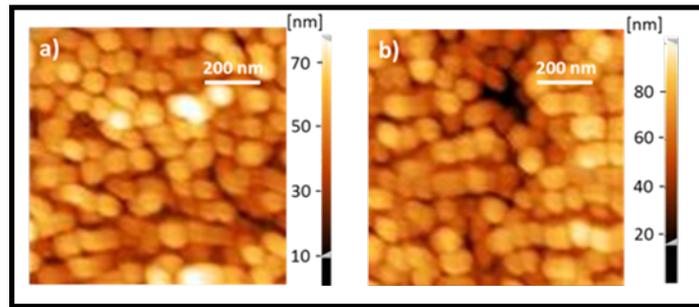


Abbildung 3-7: AFM-Aufnahmen a) von unbehandelten PE-Chips und b) von mit EDA-Celluloseosylat ( $DP \sim 200$ , **1b**) modifizierten PE-Chips.

Zur Modifizierung der PE-Chips wurde daher nur das EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) eingesetzt. Es wurde in DMF gelöst und als 0,05 % Lösung für die Modifizierung verwendet. Die Modifizierungsprozedur der  $O_2$ -Plasma-behandelten PE-Chips konnte durch Spincoating unter vollständiger Benetzung der Chipoberfläche erfolgen.

Auf die mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Chips wurden anschließend Anti-h CRP 6404 Antikörper, gemäß verschiedener Immobilisierungsprozeduren immobilisiert. Als Richtwert für die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Ak-Menge pro PE-Chip wurde die theoretische Maximalbeladung, 300 Nanogramm IgG-Ak pro Quadratzentimeter Substratoberfläche [Raem, Rauch 2006], eingesetzt. Da die Chipoberfläche durch die Rauigkeit der Oberfläche wesentlich größer ist als  $1,69 \text{ cm}^2$ , können voraussichtlich größere Ak-Mengen pro PE-Chip immobilisiert werden. Demnach sollte bei allen Immobilisierungsmethoden die vorgelegte Ak-Menge von  $1,0 \mu\text{g}$  Ak pro PE-Chip vollständig immobilisiert werden.

### 3.3.2 CRP-Immunoaffinität als Bewertungsparameter der Ak-funktionalisierten PE-Substrate hergestellt gemäß verschiedener Immobilisierungsmethoden

Um die Ak-funktionalisierten PE-Chips hinsichtlich der Entwicklung eines POCT bewerten zu können, wurde die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips, hergestellt gemäß verschiedener Immobilisierungsmethoden, bestimmt. Die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten Substrate beschreibt die Affinität der Substrate zu dem spezifischen Antigen CRP und hängt von der immobilisierten Ak-Menge sowie von der Funktionalität der immobilisieren Antikörper ab.

Die Bestimmung der immobilisierten Ak-Menge pro PE-Substrat erfolgte durch Bestimmung der Ak-Konzentration vor und nach der Immobilisierung im Immobilisierungsansatz mit Hilfe eines IgG-ELISAs.

Die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips wurde durch die gebundene CRP-Menge pro Ak-funktionalisiertem PE-Chip bewertet. Dabei wurde immer die gleiche Menge CRP (10 ng CRP pro PE-Chip) in einem Inkubationsansatz vorgelegt und die CRP-Konzentration im Inkubationsansatz vor und nach der Inkubation mit den Ak-funktionalisierten PE-Chips mittels eines CRP-ELISAs bestimmt. Damit konnten die auf die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate angewendeten Immobilisierungsmethoden hinsichtlich der erhaltenen CRP-Immunoaffinitäten beurteilt werden. Je größer die gebundene Menge CRP, desto CRP-immunoaffiner war das Substrat.

### **3.3.3 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die PG-Methode**

Die Aktivierung der Aminocellulose-modifizierten PE-Chips mit Protein G erfolgte über die Behandlung für 15 Minuten mit 5 %iger wässrige Glutardialdehydlösung. Anschließend wurde Protein G auf die Glutardialdehyd-aktivierten PE-Chips für 1 Stunde bei pH 9,5 gekoppelt und mit Ethanolamin die restlichen Bindungsstellen geblockt. Die Immobilisierung der Anti-h CRP 6404 Antikörper auf die Protein G-aktivierten PE-Chips erfolgte durch Zugabe des Anti-h CRP 6404 Antikörpers für 30 Minuten bei pH 7,3 zu den Protein G-aktivierten PE-Chips. Dabei wurde die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Ak-Menge von 1,0 µg pro PE-Chip vollständig immobilisiert.

### **3.3.4 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die SAV-Methode**

Anti-h CRP 6404 Antikörper wurden durch Reaktion mit einem 20-fachen molaren Überschuss von s-NHS-aktiviertem Biotin (s-NHS-Biotin) bei pH 7,3 für 30 Minuten mit Biotin funktionalisiert. Die Aufreinigung der Biotin-funktionalisierten Anti-h CRP 6404 Antikörper von nicht umgesetztem s-NHS-Biotin erfolgte durch Größenausschlusschromatographie (SEC).

Die Aktivierung der Aminocellulose-modifizierten PE-Chips mit Streptavidin erfolgte über die Behandlung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips für 15 Minuten mit 5 %iger wässriger Glutardialdehydlösung. Anschließend wurde Streptavidin auf die Glutardialdehyd-

aktivierten PE-Chips für 1 Stunde bei pH 9,5 gekoppelt und mit Ethanolamin die restlichen Bindungsstellen geblockt.

Die Immobilisierung der Biotin-funktionalisierten Anti-h CRP 6404 Antikörper auf die Streptavidin-aktivierten PE-Chips erfolgte durch Zugabe der Biotin-funktionalisierten Anti-h CRP 6404 Antikörper, für 30 Minuten bei pH 7,3, zu den Streptavidin-aktivierten PE-Chips. Dabei wurde die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Ak-Menge von 1,0 µg pro PE-Chip vollständig immobilisiert.

### **3.3.5 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch homobifunktionelle Crosslinker**

Für den ersten Schritt, die Aktivierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips, wurden alle u. g. Crosslinker im Überschuss eingesetzt um eine Quervernetzung zwischen den Aminogruppen der einzelnen AGE der Aminocellulosestruktur und damit eine Deaktivierung von Bindungsstellen zu vermeiden. Eine Aktivierungszeit von 15 Minuten reichte bei allen Crosslinkern der u. g. Methoden aus, um anschließend die vorgelegte Ak-Menge von 1,0 µg auf die PE-Chips zu immobilisieren.

#### **3.3.5.1 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die GDA-Methode**

Die Aktivierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips mit Glutardialdehyd bewährte sich mit wässriger 5 %iger GDA-Lösung.

Um zu gewährleisten, dass unprotonierte Aminogruppen für die Ak-Immobilisierung zur Verfügung stehen, wurde die Immobilisierung des Antikörpers oberhalb des isoelektrischen Punktes (IP) ( $IP_{CRP-AK} \sim 5,4-6,1$ ) bei pH 9,5 durchgeführt.

Eine Immobilisierungsdauer von 1 Stunde reichte aus, um die angebotene Menge von 1,0 µg Antikörper pro PE-Chip an die PE-Chips zu binden. Mögliche freie Bindungsstellen wurden anschließend mit Ethanolamin geblockt.

#### **3.3.5.2 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die CHI-Methode**

Die Aktivierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips mit gesättigter Benzochinon-Lösung erwies sich in DMF gegenüber der Aktivierung in Wasser als vorteilhaft. Die anschließende Ak-Immobilisierung erfolgte ebenfalls wie bei der GDA-Methode bei pH 9,5. Nach 1 Stunde Inkubationszeit des Immobilisierungsansatzes wurden nur 0,6 µg Ak der im

Immobilisierungsansatz vorgelegten Ak-Menge von 1,0 µg pro PE Chip immobilisiert. Nach einer Erhöhung der Immobilisierungszeit auf 20 Stunden, wurde die komplette vorgelegte Menge von 1,0 µg Ak pro PE-Chip immobilisiert. Mögliche freie Bindungsstellen wurden anschließend mit Ethanolamin geblockt.

#### **3.3.5.3 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die ASC-Methode**

Die Aktivierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips mit gesättigter Ascorbinsäure-Lösung erwies sich in DMF gegenüber der Aktivierung in Wasser als vorteilhaft. Die anschließende Ak-Immobilisierung erfolgte ebenfalls wie bei der GDA-Methode bei pH 9,5. Eine Immobilisierungszeit von 20 Stunden war notwendig, um die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Ak-Menge von 1,0 µg Ak pro PE-Chip zu immobilisieren. Mögliche freie Bindungsstellen wurden anschließend mit Ethanolamin geblockt.

#### **3.3.5.4 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die BDE-Methode**

Die Aktivierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips erfolgte mit wässriger 10 %iger 4,4'-Dihydroxybiphenyldiglycidylether-Lösung für 15 Minuten. Die anschließende Ak-Immobilisierung erfolgte ebenfalls wie bei der GDA-Methode bei pH 9,5, wobei eine Immobilisierungszeit von 20 Stunden notwendig war, um 1,0 µg Ak pro PE-Chip zu immobilisieren. Mögliche freie Bindungsstellen wurden anschließend mit Ethanolamin geblockt.

#### **3.3.6 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die DIA-Methode**

Das Reagenz Sulfosuccinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoate (Sulfo-NHS-LC-Diazirin), ein heterobifunktionseller Crosslinker, wurde durch eine s-NHS-Gruppe an die mit Aminocellulose modifizierte PE-Chip Oberfläche gebunden. Dazu wurde das Reagenz zur Aktivierung als 0,1 M Lösung in PB-Puffer (pH 8,0) eingesetzt. Ein großer Überschuss an Aktivierungsreagenz war nicht notwendig, da die Gefahr der Quervernetzung nicht bestand.

Die Diazirinegruppe stand anschließend zur Ak-Immobilisierung zur Verfügung. Unter Einstrahlung von Licht mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda=350$  nm, erzeugt mit einer HBO-Lampe und entsprechendem Interferenzfilter, wurde Stickstoff aus der Diazirinegruppe abgespalten, wodurch ein Radikal entstand, welches den Antikörper kovalent bindet. Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte in bidest. Wasser für 15 Minuten unter andauernder

Bestrahlung mit Licht. Die DIA-Methode wurde nach der Vorschrift von Gomes und Gozzo [2010] durchgeführt. Die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Ak-Menge von 1,0 µg Ak pro PE-Chip wurde vollständig gebunden.

### **3.3.7 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die EDC-Methode**

Die Carboxylierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips erfolgte mit Bernsteinsäureanhydrid in trockenen DMF mit Pyridin als Base für 16 Stunden. Die erzeugten Carboxylgruppen auf den Aminocellulose-modifizierten PE-Chips wurden bei pH 5,5 mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) aktiviert und mit Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (s-NHS) in einen Aktivester überführt.

Die aktivierten s-NHS-Ester sind gegenüber Basen sehr instabil (Halbwertszeit von 10 Minuten bei pH 8,6, [Lomant, Fairbanks 1976]), weshalb sich die Ak-Immobilisierung an die Aktivester bei pH 7,3 empfahl. Nach einer Immobilisierungsdauer von 2 Stunden wurde die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Menge von 1,0 µg Antikörper pro PE-Chip gebunden. Die restlichen aktiven s-NHS-Ester wurden mit Ethanolamin als Blockierungsreagenz umgesetzt.

### **3.3.8 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die EDC-Ak-Methode**

Die Carboxylgruppen der Ak-Proteine wurden nach bekannter EDC-Methode aktiviert. Durch die Zugabe von s-NHS bildete sich ein im wässrigen Milieu stabiler s-NHS-Ester, welcher reaktiv gegenüber NH<sub>2</sub>-Gruppen ist.

Um protonierte Aminogruppen auf den mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips zu vermeiden, wurde ein pH-Milieu von pH 8,0 im Immobilisierungsansatz gewählt. Dabei wurde berücksichtigt, dass ein höherer pH-Wert die Hydrolyse und damit die Deaktivierung der s-NHS-Ester zur Folge hätte.

Die Ansätze haben gezeigt, dass bei der Ak-Immobilisierung durch EDC-Aktivierung der Carboxylgruppen des Antikörpers nach einer Stunde Inkubationszeit die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Menge von 1,0 µg Antikörper pro PE-Chip immobilisiert wurde.

### 3.3.9 Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Ak-Protein an Aminocellulose-modifizierte PE-Chips durch die ALD-Methode

Die IgG-Aktivierung des Anti-h CRP 6404 Ak-Proteins mittels Natriumperiodat fand im sauren Milieu statt (MES-Puffer, pH 5,5). Die unmittelbare Immobilisierung des Ak-Proteins erfolgte bei pH 9,0 (pH 9,0) zwecks Deprotonierung der NH<sub>2</sub>-Endgruppen der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips. Dazu wurde der pH-Wert der Ak-Lösung durch Zugabe von 0,1 M Natronlauge auf pH 9,0 eingestellt. Nach der Immobilisierung wurde überschüssiges Natriumperiodat durch Zusatz von Ethylenglycol umgesetzt. Nach einer Immobilisierungsdauer von 4 Stunden wurde die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Menge von 1,0 µg Antikörper pro PE-Chip immobilisiert.

### 3.3.10 Elektrostatisch-getriebene Anti-h CRP 6404 Ak Immobilisierung an carboxylgruppenhaltige Aminocellulose-modifizierte PE-Chips (CAB-Methode)

Die im Kapitel 3.3.7 beschriebene Carboxylierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips erfolgte wie beschrieben. Die Immobilisierung von Anti-h-CRP 6404 Antikörpern konnte jedoch auch ohne die Aktivierung der Carboxylgruppen durch EDC und s-NHS auf den carboxylierten, Aminocellulose-modifizierten PE-Chips erfolgen. Dabei fand eine elektrostatisch getriebene Ak-Immobilisierung statt, die wesentlich schneller verlief als die Reaktion der Aminogruppen mit dem s-NHS-Aktivester.

Entscheidend für die elektrostatisch getriebene Ak-Immobilisierung war der pH-Wert bei der Ak-Immobilisierung. Die pH-Optimierung der elektrostatisch getriebenen Ak-Immobilisierung erfolgte durch eine pH-Reihe im Immobilisierungsansatz. Im pH-Bereich von pH 3-pH 11,5 konnten die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Menge Anti-h-CRP 6404 Antikörper (1,0 µg) auf den carboxylierten PE-Chips immobilisiert werden. Allerdings unterschieden sich die CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips in Abhängigkeit vom pH-Wert im Immobilisierungsansatz (Abbildung 3-8).

Der optimale pH-Wert im Immobilisierungsansatz lag im Bereich des isoelektrischen Punktes des Antikörpers ( $IP_{\text{Anti-h CRP 6404}} \sim 5,4-6,1$ , [Medix]). Bei niedrigeren sowie bei höheren pH-Werten im Immobilisierungsansatz, sank die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips. Die elektrostatisch getriebene Makromolekülausrichtung der Antikörper wurde dabei von der Ladungsverteilung innerhalb des Proteins (unterschiedliche Ladung des F<sub>ab</sub>-

und  $F_C$ -Teils am IP des Antikörpers) sowie von der Ladungsverteilung der Oberfläche gesteuert.

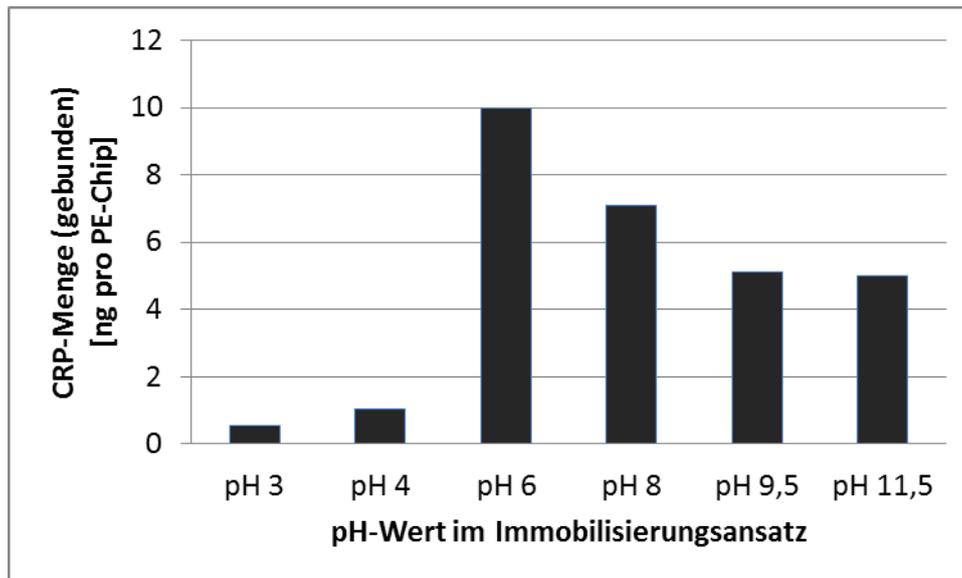


Abbildung 3-8: pH-Wert Optimierung des Immobilisierungsansatzes der CAB-Methode durch Bestimmung der gebundenen CRP-Menge der CRP-immunoaffinen PE-Chips bei einer vorgelegten Menge von 10 ng CRP pro PE-Chip im Inkubationsansatz in Abhängigkeit vom pH-Wert des Immobilisierungsansatzes.

Am IP des Ak-Proteins kam es zu elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen dem negativ geladenen  $F_{ab}$ -Teil des Ak und der negativ geladenen Oberfläche (Carboxylgruppen als Ladungsträger), wodurch der  $F_{ab}$ -Teil und damit die Antigenbindungsstellen frei im Raum orientiert waren. Bei höheren IP war der gesamte Antikörper negativ geladen, was zu keiner bevorzugten Orientierung auf der Oberfläche führte. Dadurch nahm die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips bei höheren pH-Werten im Immobilisierungsansatz ab. Bei niedrigeren pH-Werten im Immobilisierungsansatz orientierte sich der positiv geladene N-Terminus und damit der  $F_{ab}$ -Teil des Antikörpers Richtung Oberfläche wodurch die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips sank.

Bei der elektrostatischen Ak-Immobilisierung wurde allerdings nur die Orientierung durch den pH-Wert beeinflusst. Die Immobilisierung der Antikörper Proteine an die carboxylierten Aminocellulose-modifizierten PE-Chips fand im gesamten pH-Bereich (pH 3-pH 11,5) statt.

Zur Testung der Stabilität der Ak-Funktion der gemäß CAB-Methode immobilisierten Antikörper wurden Proben Ak-funktionalisierter PE-Chips einem Stresstest durch Behandlung mit verschiedenen Reagenzien unterzogen. Es sollte untersucht werden, ob sich

die Antikörper, immobilisiert nach der elektrostatisch getriebenen Ak-Immobilisierung, durch Behandlung mit verschiedenen pH-Werten (pH 3,0 und pH 11,5), großen Ionenstärken (6 M LiCl-Lösung) oder durch Zugabe eines anderen Proteins (caseinhaltige Lösung) wieder ablösen lässt oder sich die makromolekulare Ausrichtung der Antikörper relativ zur Oberfläche ändert.

Dazu wurden die gemäß CAB-Methode Ak-funktionalisierten PE-Chips mit verschiedenen Reagenzlösungen für die Dauer von einer Stunde geschüttelt, danach mit bi-destilliertem Wasser gewaschen und anschließend die gebundene CRP-Menge bei Vorlage von 10 ng CRP im Inkubationsansatz bestimmt.

Die Tabelle 3-7 zeigt, dass CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips vor und nach dem Stresstest unverändert waren. Dies bedeutet, dass die Ak-Funktion stabil gegen die eingesetzten Reagenzlösungen (pH 3, pH 11,5, 6 M LiCl-Lösung, caseinhaltige Lösung) vorlag. Dabei bildete sich bei der CAB-Methode eine Art IgG-Oberflächen Komposit auf den Carboxylierten Aminocellulose-modifizierten PE-Chips aus.

Zum Blocken der carboxylierten Aminocellulose-modifizierten PE-Chips bewährte sich *Bovine serum albumin* (BSA) und Casein.

*Tabelle 3-7: Vergleich der CRP-Immunoaffinität von Ak-funktionalisierten PE-Chips hergestellt gemäß CAB-Methode und Behandlung der CRP-immunoaffinen PE-Chips mit verschiedenen Reagenzlösungen.*

Reagenzlösung	Ak-Chip <sup>b</sup>	pH 3 <sup>c</sup>	pH 11,5 <sup>d</sup>	LiCl <sup>e</sup>	uCDB-Puffer <sup>f</sup>
<b>CRP-Menge (gebunden)<sup>a</sup></b>	10	9,6	9,8	10	9,5

<sup>a</sup>Die Bestimmung der gebundenen CRP-Menge pro PE-Chip erfolgte mittels CRP-ELISA bei einer vorgelegten Menge von 10 ng CRP pro PE-Chip im Inkubationsansatz, <sup>b</sup>CRP-immunoaffiner PE-Chip hergestellt gemäß CAB-Methode vor der Behandlung mit den Reagenzien, <sup>c</sup>Citronensäure-Puffer (0,1 M; pH 3,0), <sup>d</sup>CBB-Puffer (0,1 M; pH 9,5), <sup>e</sup>LiCl-Lösung (6 M); <sup>f</sup>caseinhaltiger Puffer (pH 7,3)

### **3.3.11 Elektrostatisch-getriebene Anti-h CRP 6404 Ak Immobilisierung an sulfonsäuregruppenhaltige Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate (SUF-Methode)**

Die beschriebene elektrostatisch getriebene Ak-Immobilisierung auf carboxylierten Aminocellulose-modifizierten PE-Chips durch die Ausbildung von spontanen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und den carboxylierten, Aminocellulose-

modifizierten PE-Chips sollte durch eine weitere elektrostatisch getriebene Immobilisierung verifiziert werden. Als negative Ladungsträger wurden dazu Sulfonsäuregruppen anstatt der Carboxylgruppen auf den mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips eingeführt. Zur Einführung der negativen Ladungsträger wurde das Reagenz 4,4'-Biphenyldisulfonylchlorid als gesättigte Lösung in Diethylether zu den Aminocellulose-modifizierten PE-Chips gegeben und für 1 Stunde geschüttelt. Anschließend wurde das auf die Oberfläche eingeführte Sulfonsäurechlorid für 24 Stunden mit Wasser unter Erhalt von Sulfonsäuregruppen hydrolysiert (vgl. Abbildung 3-9).

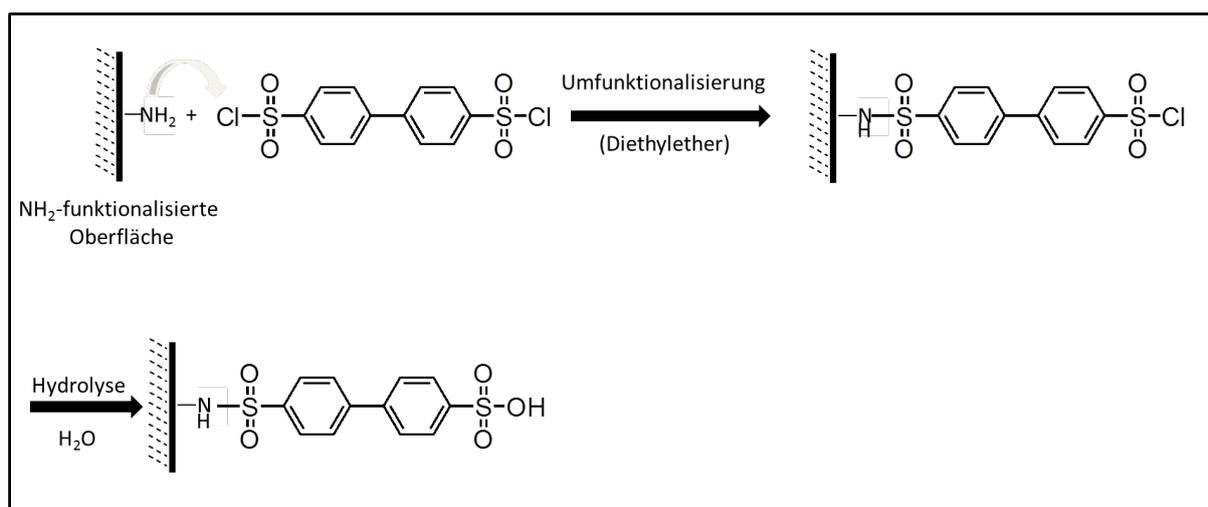


Abbildung 3-9: Einführung von Sulfonsäuregruppen auf Aminocellulose-modifizierten PE-Chips durch Umsetzung der Aminocellulose-modifizierten PE-Chips mit 4,4'-Biphenyldisulfonylchlorid und anschließender Hydrolyse.

Die Ak-Immobilisierung erfolgte durch Zugabe der sulfonierten, Aminocellulose-modifizierten PE-Chips in einen Ak-Immobilisierungsansatz bei pH 6. Die vorgelegte Menge von  $1\ \mu\text{g}$  Antikörper pro PE-Chip wurde erfolgreich auf die sulfonierten, Aminocellulose-modifizierten PE-Chips immobilisiert.

Die CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips gemäß SUF-Methode nach der Behandlung der PE-Chips mit den elektrostatischen Reagenzlösungen belegen, dass sich auch zwischen den sulfonierten, Aminocellulose-modifizierten PE-Chips und dem Anti-h CRP 6404 Ak-Protein ein Komposit ausbildete, welches gegen die Reagenzlösungen stabil war (vgl. Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Vergleich der CRP-Immunoaffinität von Ak-funktionalisierten PE-Chips hergestellt gemäß SUF-Methode und Behandlung der CRP-immunoaffinen PE-Chips mit verschiedenen Reagenzlösungen.

Reagenzlösung	Ak-Chip <sup>b</sup>	pH 3 <sup>c</sup>	pH 11,5 <sup>d</sup>	LiCl <sup>e</sup>	uCDB-Puffer <sup>f</sup>
CRP-Menge (gebunden)	9,3	8,8	9,1	9,0	8,9

<sup>a</sup>Die Bestimmung der gebundenen CRP-Menge pro PE-Chip erfolgte mittels CRP-ELISA bei einer vorgelegten Menge von 10 ng CRP pro PE-Chip im Inkubationsansatz, <sup>b</sup>CRP-immunoaffiner PE-Chip hergestellt gemäß CAB-Methode vor der Behandlung mit den Reagenzien, <sup>c</sup>Citronensäure-Puffer (0,1 M; pH 3,0), <sup>d</sup>CBB-Puffer (0,1 M; pH 9,5), <sup>e</sup>LiCl-Lösung (6 M); <sup>f</sup>caseinhaltiger Puffer (pH 7,3)

### 3.3.12 CRP-Immunoaffinitäten Ak-funktionalisierter PE-Chips hergestellt gemäß der ausgewählten Immobilisierungsmethoden an SAM-ähnliche Aminocellulose-modifizierte PE-Chips

Die beschriebenen Immobilisierungsmethoden wurden auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6) modifizierten PE-Chips angewendet. Dabei wurde bei allen Immobilisierungsmethoden die im Immobilisierungsansatz vorgelegte Menge von 1,0 µg Anti-h CRP 6404 Antikörper pro PE-Chip vollständig gebunden.

Die Ermittlung der CRP-Immunoaffinitäten erfolgte durch Bestimmung der gebundenen CRP-Menge an die Ak-funktionalisierten PE-Chips - hergestellt gemäß der verschiedenen Immobilisierungsmethoden - in einer Fünffachbestimmung bei einer vorgelegten Menge von 10 ng CRP pro PE-Chip im Inkubationsansatz.

Die gebundenen CRP-Mengen pro Ak-funktionalisiertem PE-Chip - hergestellt gemäß der verschiedenen Immobilisierungsmethoden – sind in Abbildung 3-10 dargestellt. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Reaktionsbedingungen und die Kopplungsgeometrien, die durch die unterschiedlichen Immobilisierungsprozeduren entstanden, erwartungsgemäß einen wesentlichen Einfluss auf die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips hatten. Gut geeignet zur Herstellung von Ak-funktionalisierten PE-Chips mit einer großen CRP-Immunoaffinität waren unter anderem die CAB- und SUF-Methode, was die positive Ausrichtung der Antikörper der elektrostatisch getriebenen Ak-Immobilisierung belegt. Auch bei Anwendung der EDC-Methode wurden große CRP-Immunoaffinitäten der PE-Chips erhalten. Dabei schienen die Reagenzien EDC und s-NHS keinen Einfluss auf die CRP-Immunoaffinität der PE-Chips zu haben. Die elektrostatisch getriebene Ak-Immobilisierung erfolgte viel schneller als die kovalente Kopplung durch die s-NHS-Aktivester an die

Aminogruppen der Antikörper. Nach der elektrostatischen Ak-Immobilisierung können sich zusätzliche kovalente Bindungen ausbilden, die die Orientierung der Antikörper auf der Oberfläche fixieren. Jedoch brachten diese keinen Effekt für die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips.

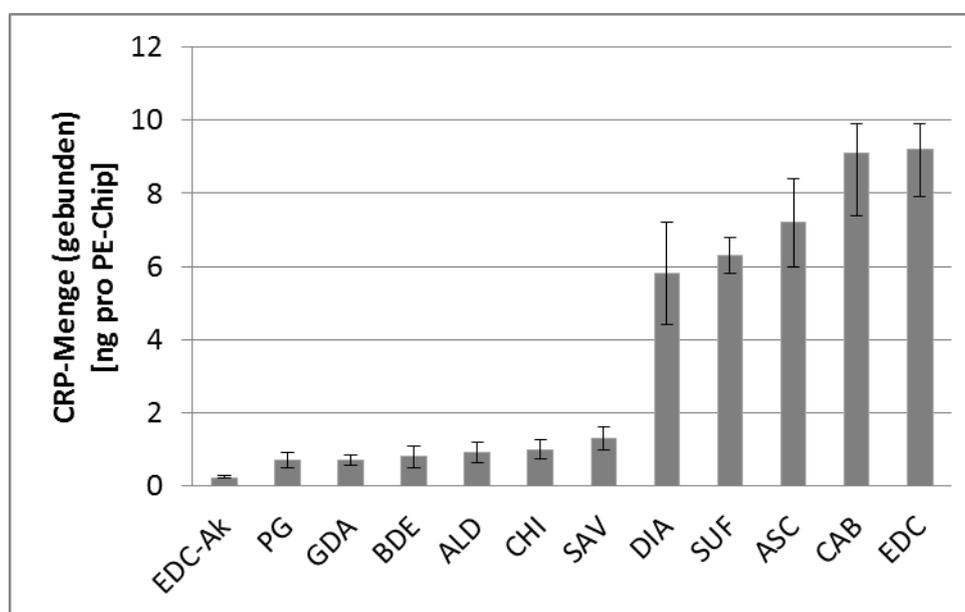


Abbildung 3-10: CRP-Immunoaffinitäten Ak-funktionalisierter PE-Chips hergestellt gemäß verschiedener Immobilisierungsmethoden auf mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Chips. Im Inkubationsansatz wurden 10 ng CRP pro PE-Chip vorgelegt.

Die PE-Chips hergestellt gemäß EDC-Ak- und ALD-Methode, besaßen nur sehr geringe CRP-Immunoaffinitäten. Dabei wirkte sich die mögliche Konkurrenzreaktion der Ak-Immobilisierung an die  $NH_2$ -Gruppen der Oberfläche, die Quervernetzung der Proteine untereinander, nachteilig auf den Erhalt der Ak-Funktionalität aus. Möglicherweise entstanden auch Antikörper-Multilayer-Schichten wodurch Antikörper auf der Oberfläche deaktiviert wurden.

Ebenfalls sehr geringe CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips erhielt man bei Anwendung der PG- und SAV-Methode. Möglicherweise beeinflusste die hohe Biotinfunktionalisierung die Ak-Funktionalität, weshalb weniger CRP-immunoaffine PE-Chips erhalten wurden.

Die Anwendung der Immobilisierungsmethoden gemäß der homobifunktionellen Crosslinker ließ erkennen, dass die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips von der Kopplungsgeometrie des Immobilisierungsreagenzes abhing. So wiesen die CRP-immunoaffinen PE-Chips hergestellt gemäß CHI- und BDE-Methode mit aromatischen

Spacerstrukturen sehr geringe CRP-Immunoaffinitäten auf. Die Ak-funktionalisierten PE-Chips hergestellt gemäß ASC-Methode mit einer sehr kurzen alkalischen Spacerstruktur dagegen zeigten große CRP-Immunoaffinitäten. Allerdings war ein allgemeiner Trend der Spacergeometrie des Kopplungsreagenzes wie Spacerlänge oder Struktur des Immobilisierungsreagenzes auf die CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips nicht feststellbar. So erhielt man bei der Anwendung der GDA-Methode, mit ebenfalls einer kurzen alkalischen Spacergeometrie, geringe CRP-Immunoaffinitäten.

Bei Anwendung der DIA-Methode mit einem heterobifunktionellem Crosslinker mit einer langen alkalischen Spacerstruktur wurden wiederum große CRP-Immunoaffinitäten erhalten.

Allgemein lässt sich sagen, dass die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips maßgeblich von der Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper abhängt. Einige Antikörper verlieren durch die Ak-Immobilisierung ihre spezifische Funktion ein Antigen zu binden. Dieser Verlust wird beispielsweise durch chemische Modifizierung der Antigenbindungsstellen während der Ak-Immobilisierung verursacht. Außerdem kann es zu sterischen Hinderungen bei der Anbindung des Antigens an den Antikörper durch benachbarte Antikörper oder die Oberfläche kommen. Zuletzt können Konformationsänderungen des Antikörpers in Abhängigkeit von der Nanostruktur der Oberfläche auftreten. Die Nanostruktur der Oberfläche wiederum wird unter anderem von der Aminocellulosederivatstruktur und der Struktur des Kopplungsreagenzes bestimmt.

Beispielsweise ist die Spacerstruktur des Kopplungsreagenzes für den Abstand zwischen Polymerkette und Antikörper verantwortlich. Außerdem wird durch die Spacerstruktur des Kopplungsreagenzes die Nanostruktur der Oberfläche beeinflusst. Hydrophobe Eigenschaften nehmen mit aromatischen Spacerstrukturen oder längeren Alkylketten zu. Im Zusammenspiel mit der Struktur des Aminocellulosederivates wird damit die Hydrophilie/Hydrophobie Balance der Nanostruktur gesteuert.

Die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Chips war daher aus dem Zusammenspiel der Nanostruktur des Aminocellulosekomposits und der Struktur des Kopplungsreagenzes, sowie den Reaktionsbedingungen abhängig. Die unterschiedlichen CRP-Immunoaffinitäten beweisen die unterschiedlichen Einflüsse der Immobilisierungsmethoden.

Durch die Differenzierung der CRP-immunaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips gemäß der unterschiedlichen Immobilisierungsprozeduren ließen sich geeignete Immobilisierungsmethoden für die Entwicklung eines CRP POCT auf PE-Basis selektieren. Für die Entwicklung von POCT auf mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierten PE-Substraten eigneten sich, hinsichtlich dem Erhalt der maximalen Ak-Funktionalität, besonders die DIA-, SUF-, ASC-, CAB und EDC-Methode.

Herauszuheben ist, dass sich durch die CAB- und SUF-Methode, Ak-funktionalisierte PE-Chips mit großen CRP-Immunoaffinitäten herstellen ließen. Damit ließ sich verifizieren, dass die positive Ausrichtung der Anti-h CRP 6404 Ak während der Immobilisierung am IP des Antikörpers, die CAB- und SUF-Methode zu neuen und effizienten Immobilisierungsmethoden für Anti-h CRP 6404 Antikörper an mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Chips macht.

Die Reproduzierbarkeit der CRP-Immunoaffinitäten der Ak-funktionalisierten PE-Chips, hergestellt gemäß der Immobilisierungsmethoden auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierten PE-Chips ist ebenfalls belegt. Die Fehlerwerte der Fünffachbestimmung der CRP-Menge (gebunden) an die Ak-funktionalisierten PE-Chips betragen maximal 13 % (DIA-Methode). Dieser Fehler resultiert größtenteils aus der Bestimmungsmethode (CRP-ELISA). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierte PE-Chips eine aussichtsreiche Grundlage für die Entwicklung von POCT auf PE-Basis darstellten.

#### **3.4 Herstellung von CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern für CRP-Assays**

Durch Modifizierung der planaren PE-Chips mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) und die anschließende Ak-Immobilisierung wurden Ak-funktionalisierte PE-Chips mit reproduzierbaren CRP-Immunoaffinitäten erhalten. Dabei trat eine Differenzierung der CRP-Immunoaffinitäten bei Anwendung verschiedener Immobilisierungsmethoden auf. Nach den Ergebnissen auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierten PE-Chips versprachen die Immobilisierungsmethoden DIA-, SUF-, ASC-, CAB- und EDC- eine Optimierung der immobilisierten Ak-Funktion.

Um CRP-immunoaffine PE-Mikrofilter für die Entwicklung eines CRP-ABICAP-Säulenassays herzustellen, wurden ausgewählte Immobilisierungsmethoden auf EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierte PE-Mikrofilter angewandt.

Eine reproduzierbare und flächendeckende Modifizierung der PE-Mikrofilter mit Aminocellulose war, wie in Kapitel 3.2 gezeigt, nur ausgehend von der Modifizierung mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) zu erwarten. Diese bildete die Grundlage für die Herstellung Ak-funktionalisierter PE-Mikrofilter. Die Modifizierung der PE-Mikrofilter mit Aminocellulose erfolgte durch 15 minütiges Rühren in 0,05 %iger EDA-Cellulosecarbanilat-Lösung in DMF unter Vakuumbedingungen um sicherzustellen, dass keine Lufteinschlüsse in den Poren die Modifizierung verhinderten.

Die Immobilisierungsmethoden DIA-, SUF-, ASC-, CAB und EDC wurden zur Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Antikörper auf die mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierten PE-Mikrofilter, wie in den Kapitel 3 beschrieben, angewandt. Dabei wurden zwei Probenreihen CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter mit zwei unterschiedlichen Ak-Beladungen hergestellt. Zum einen wurden bei Probenreihe (b) mit 7,5 µg Ak pro PE-Mikrofilter die theoretische maximal Ak-Beladung im Immobilisierungsansatz vorgelegt. Zum anderen wurde mit Probenreihe (a) eine deutlich geringere Ak-Menge mit 2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter angeboten. Die Ak-Beladung der PE-Mikrofilter wurde durch Variation der Ak-Konzentration im Immobilisierungsansatz eingestellt. Die tatsächliche Ak-Beladung der PE-Mikrofilter wurde durch die Bestimmung der Ak-Konzentration vor und nach der Ak-Immobilisierung im Immobilisierungsansatz durch einen IgG-ELISA ermittelt.

#### **3.4.1 Ak-Funktionalität als Bewertungsparameter der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter**

Neben der CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter wurde die Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper ermittelt. Diese wurde in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode und der Ak-Beladung bestimmt. Dazu wurde die Antigen-reaktive Ak-Menge und die immobilisierte Ak-Menge auf den PE-Mikrofiltern bestimmt. Der Quotient aus Antigen-reaktiver Ak-Menge und der gesamten Menge immobilisierter Antikörper, ergibt die Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper. Die CRP-Immunoaffinität wurde von beiden Faktoren (Ak-Funktion und Ak-Menge pro PE-Mikrofilter) beeinflusst.

Die Bestimmung der Antigen-reaktiven Ak-Menge auf den PE-Mikrofiltern erfolgte durch das Erstellen einer Antigenbindungskurve der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter. Dazu wurden die CRP-Konzentrationen im Inkubationsansatz variiert und die jeweilige gebundene CRP-Menge bestimmt. Die gebundene CRP-Menge konnte durch Bestimmung der CRP-Konzentration mit einem CRP-ELISA vor und nach der Inkubation im Inkubationsansatz ermittelt werden.

Bei einer Sättigung der CRP-Bindungsstellen auf den PE-Mikrofiltern konnte man durch die gebundene Menge CRP pro PE-Mikrofilter die Menge funktionaler Antikörper pro PE-Mikrofilter berechnen. Trug man die gebundene Menge CRP logarithmisch gegen die angebotene Menge CRP im Inkubationsansatz auf und wertete die erhaltene Bindungskurve mit der 4PL aus, entsprach die obere Asymptote (A2) der CRP-Sättigungsmenge. Die obere Asymptote (A2) entsprach damit der Antigenmenge, bei der an alle Antigen-reaktiven Ak-Bindungsstellen ein Antigen gebunden war. Der Quotient aus Antigen-reaktiven Antikörpern und der Antikörpermenge pro PE-Mikrofilter gab die Ak-Funktionalität an (vgl. Formel 3-1).

Formel 3-1:

$$f_{Ak} = \frac{\frac{A2 \text{ [ng]}}{M_{CRP}}}{\frac{Ak\text{-Menge [ng]}}{M_{Ak}}} = \frac{A2 \text{ [mol]}}{Ak\text{-Menge [mol]}}$$

$f_{Ak}$ =Ak-Funktionalität,  $A2$ =obere Asymptote (maximal gebundene Menge CRP),  $M_{CRP}=115 \text{ kDa}$ ,  $M_{Ak}=144 \text{ kDa}$ , Ak-Menge=immobilisierte Menge Ak-Protein

### 3.4.2 Ak-Funktionalitäten der immobilisierten Antikörper

Die Ak-Funktionalität der gemäß unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden immobilisierter Antikörper wurde zur Bewertung der Immobilisierungsmethoden herangezogen. Dabei wurde die Ak-Funktionalität der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter zusätzlich zu den verschiedenen Immobilisierungsmethoden auch nach den zwei verschiedenen Probenreihen (a) und (b) differenziert. Für die Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter wurden die Antigenbindungskurven durch Ermitteln der gebundenen CRP-Menge bei Variation der vorgelegten CRP-Menge im Inkubationsansatz ermittelt (vgl. Abbildung 3-11 bis Abbildung 3-15).

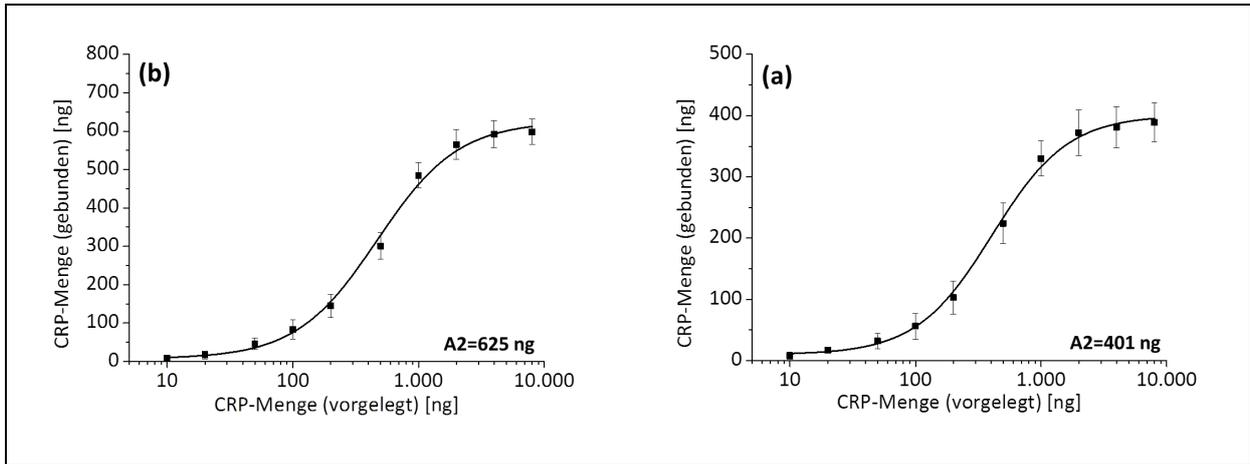


Abbildung 3-11: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der ASC-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b).

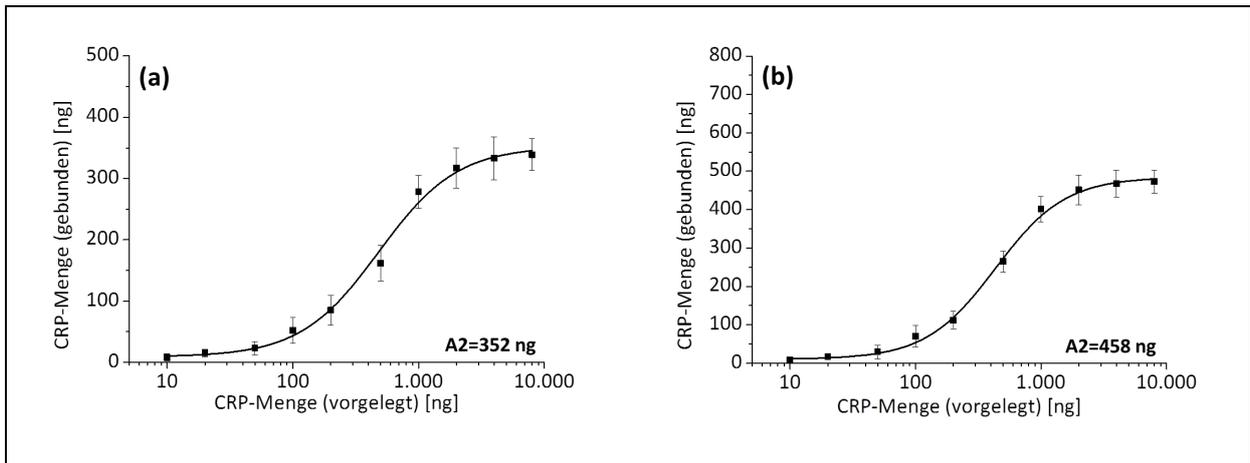


Abbildung 3-12: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der DIA-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b).

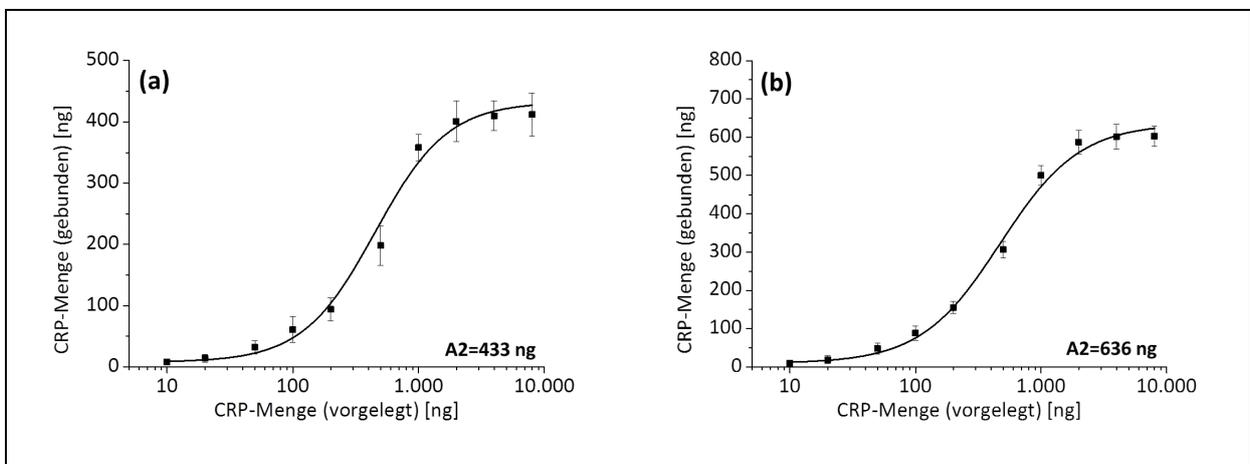


Abbildung 3-13: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der EDC-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b).

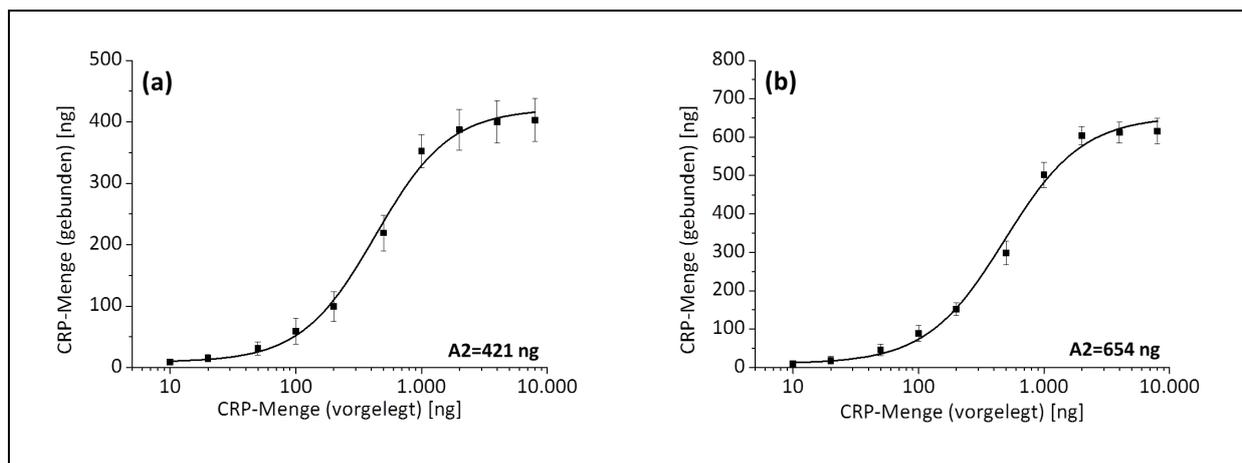


Abbildung 3-14: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der CAB-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b).

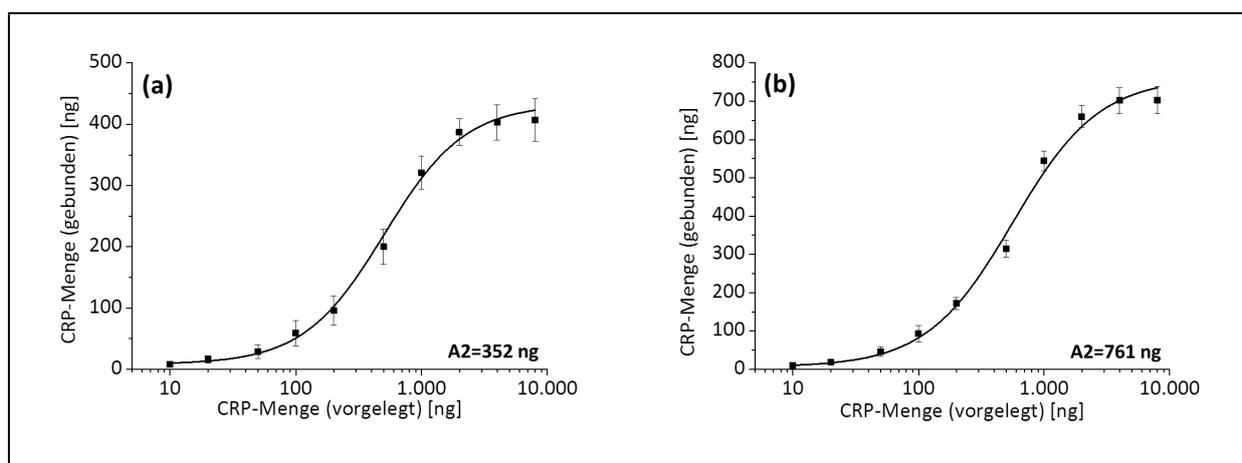


Abbildung 3-15: Darstellung der CRP-Bindungskurven bei Auftragung von „CRP (geb.) in ng“ vs. „CRP (vorgelegt) in ng“ ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und Anwendung der SUF-Methode a) Probenreihe (a) und b) Probenreihe (b).

Mit Hilfe der oberen Asymptote (A2) der 4PL ausgewerteten Antigenbindungskurven wurden die in Tabelle 3-9 aufgelisteten Ak-Funktionalitäten ( $f_{Ak}$ ) erhalten. Außerdem lässt sich aus der Tabelle 3-9 die Ak-Beladung der PE-Mikrofilter und die CRP-Immunoaffinität in Form der CRP-Sättigungsmenge (A2) entnehmen.

Die Ergebnisse aus Tabelle 3-9 zeigen, dass bei Vorlage einer Ak-Menge von 2,0  $\mu$ g pro PE-Mikrofilter im Immobilisierungsansatz (Probenreihe (a)), die 2,0  $\mu$ g Ak vollständig bei allen ausgewählten Immobilisierungsmethoden an die mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6) modifizierten PE-Mikrofilter gebunden wurden. Bei der Probenreihe (b) mit 7,5  $\mu$ g Ak pro PE-Mikrofilter vorgelegt im Immobilisierungsansatz hing die Ak-Beladung der PE-Mikrofilter von der Immobilisierungsmethode ab. So wurden bei der Immobilisierung gemäß der ASC-Methode mit 7,5  $\mu$ g Ak pro PE-Mikrofilter die größten Ak-Beladungen erreicht. Die geringste Ak-Beladung mit 3,0  $\mu$ g Ak pro PE-Mikrofilter dagegen mit der DIA-Methode. Bei den

Immobilisierungsmethoden, welche die Antikörper durch Ladung elektrostatisch ausrichten (EDC-, CAB-, SUF-Methode), wurden zwischen 5,2-5,9 µg Ak pro PE-Mikrofilter immobilisiert. Die Beladungen, die bei der Probenreihe (b) erzielt wurden, entsprachen demnach der maximalen Beladung der PE-Mikrofilter, gemäß der verschiedenen Immobilisierungsmethoden. Bei der ASC-Methode wurde durch eine Probenreihe (c) mit einer vorgelegten Ak-Menge von 10,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter bestätigt, das 7,5 µg Ak pro PE-Mikrofilter der maximalen Ak-Beladung entsprachen.

*Tabelle 3-9: Ergebnisparameter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter der Probenreihen (a) und (b) ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6)-modifizierten PE-Mikrofiltern*

<b>Immobilisierungs-Methode</b>	<b>Probenreihe<sup>a</sup></b>	<b>Ak-Menge (gebunden)</b>	<b>A2 [ng]<sup>b</sup></b>	<b>f<sub>Ak</sub><sup>c</sup></b>
ASC	a	2,0±0.1 µg	401	26,2 %
	b	7,5±0,3 µg	625	10,9 %
DIA	a	1,8±0.1 µg	352	25,5 %
	b	3,0±0.2 µg	485	21,1 %
EDC	a	2,0±0.1 µg	433	28,2 %
	b	5,9±0,3 µg	636	14,1 %
CAB	a	2,0±0.1 µg	421	27,5 %
	b	5,9±0,3 µg	654	14,5 %
SUF	a	1,8±0,2 µg	433	31,4 %
	b	5,2±0,3 µg	761	19,1 %

<sup>a</sup>Vorgelegte Ak-Menge im Immobilisierungsansatz pro PE-Mikrofilter: Probenreihe a): 2,0 µg Ak; Probenreihe b): 7,5 µg Ak.

<sup>b</sup>Obere Asymptote (A2) der 4PL ausgewerteten Bindungskurven der entsprechenden Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter.

<sup>c</sup>Ak-Funktionalität berechnet nach Formel 3-1.

Eine Ursache für die unterschiedlichen maximalen Ak-Beladungen der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter, bei Anwendung der unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden, sind die unterschiedlichen Nanostrukturen (beeinflusst von der Immobilisierungsmethode) der Oberfläche. Die Nanostruktur der Oberfläche beeinflusste die räumliche Ausrichtung der

Antikörper gegenüber der Substratoberfläche. Die Grundfläche eines Ak-Moleküls wiederum hängt von der Ausrichtung des Antikörpers gegenüber der Oberfläche ab. Außerdem können, in Abhängigkeit von der Nanostruktur der Oberfläche, die Antikörper unterschiedlich dicht gepackt auf der Oberfläche immobilisiert werden, wodurch unterschiedliche Mengen Ak pro Substratfläche immobilisiert werden können.

Durch die gleiche Ausrichtung der Antikörper bei den Immobilisierungsmethoden EDC-, CAB- und SUF, wurden daher ähnliche maximale Beladungen bei den genannten Immobilisierungsmethoden erhalten.

Der Grund für die geringe maximale Beladung der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter hergestellt gemäß der DIA-Methode ist im Detail der DIA-Immobilisierungsmethode zu finden. Für die chemische Reaktion, welche zur kovalenten Immobilisierung der Antikörper an die PE-Mikrofilter führte, war Licht der Wellenlänge 350 nm mit hoher Intensität erforderlich. Durch die poröse Struktur der PE-Mikrofilter drang das eingestrahelte Licht jedoch nicht mit genügend Intensität bis in das Innere des PE-Mikrofilters vor. Die Antikörper wurden daher nur in den Bereichen des PE-Mikrofilters immobilisiert, an denen die Intensität des Lichtes für die Immobilisierungsreaktion noch ausreichend war. Die maximale Ak-Beladung der PE-Mikrofilter hergestellt gemäß DIA-Methode war daher geringer als bei den Immobilisierungsmethoden, bei denen die Ak auch im Inneren und damit auf der gesamten Oberfläche des PE-Mikrofilters immobilisiert wurden.

#### **3.4.2.1 Einfluss der Ak-Beladung auf die Ak-Funktionalität**

Die Ergebnisse aus Tabelle 3-9 zeigen, dass die maximal gebundene CRP-Menge pro Mikrofilter (A2) und damit die CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter, wie zu erwarten, bei Mikrofiltern der Probenreihe (b) durchgängig größer war, als bei PE-Mikrofiltern der Probenreihe (a). Durch eine größere Menge immobilisierte Antikörper pro PE-Mikrofilter konnten mehr Moleküle CRP pro PE-Mikrofilter binden.

Allerdings stieg die maximale gebundene CRP-Menge nicht proportional zur immobilisierten Ak-Menge pro PE-Mikrofilter an. Grund dafür war die geringere Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper der PE-Mikrofilter der Probenreihe (b) im Vergleich zu den Mikrofiltern der Probenreihe (a). Die Abnahme der Ak-Funktionalität bei größerer Ak-Beladung der PE-Mikrofilter wurde am Beispiel der ASC-Methode genauer untersucht. Dazu wurden die PE-Mikrofilter mit verschiedenen Ak-Beladungen gemäß der ASC-Methode

hergestellt und die Menge Antigen-reaktiver Antikörper in Abhängigkeit von der Ak-Beladung bestimmt (vgl. Tabelle 3-10).

*Tabelle 3-10: Ergebnisparameter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter gemäß ASC-Methode mit verschiedenen Ak-Beladungen, ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, 6)-modifizierten PE-Mikrofiltern.*

Ak-Menge (gebunden)	A2 [ng] <sup>a</sup>	f <sub>Ak</sub> <sup>b</sup>
0,1 µg	22	28,7 %
0,5 µg	88	23,0 %
1,0 µg	203	26,5 %
2,0 µg	405	26,4 %
4,0 µg	526	17,2 %
6,0 µg	549	11,9 %
7,5 µg	649	11,3 %

<sup>a</sup>Obere Asymptote (A2) der Bindungskurven der entsprechenden Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter.

<sup>b</sup>Ak-Funktionalität berechnet nach Formel 3-1.

Die Ak-Funktionalität war bei geringen Ak-Beladungen zwischen 0,1-2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter annähernd konstant. Ab einer Ak-Beladung von 4,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter nahm die Ak-Funktionalität mit zunehmender Ak-Beladung stark ab. So waren bei geringen Ak-Beladungen bis zu 28,7 %, bei einer maximalen Ak-Beladung des PE-Mikrofilters jedoch nur 11,3 % Antikörper funktional.

Diese Beobachtung kann durch die sterische Behinderung oder physischer Blockierung von Antigenbindungsstellen durch benachbarten Antikörper oder die Blockierung mehrerer Antigenbindungsstellen benachbarter Antikörpermoleküle bei Anlagerung eines Antigens begründet werden [Sada et al. 1986]. Bei Zunahme der Ak-Beladung nahm die Blockierung der Antigenbindungsstellen zu.

Da die Ak-Funktionalität von der Ak-Beladung beeinflusst wurde, stieg die CRP-Immunoaffinität Ak-funktionalisierter PE-Substrate nicht proportional mit steigender Ak-Beladung. Es war zu vermuten, dass die Ak-Funktionalität vom Zusammenspiel der Ak-Beladung mit der Immobilisierungsmethode abhing. Ordnet man beispielsweise die

verschiedenen Immobilisierungsmethoden nach der Reihenfolge der Ak-Funktionalitäten der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter in Abhängigkeit von der Probenreihe, so ergab sich für die Probenreihe (a) folgende Reihenfolge:

DIA ( $f_{Ak}=21,1\%$ ) > SUF (19,1 %) > CAB (14,5 %) > EDC (14,1 %) > ASC (10,9 %)

Für die Probenreihe (b) ergab sich aber eine andere Reihenfolge:

SUF (31,4 %) > EDC (28,2 %) > CAB (27,5 %) > ASC (26,2 %) > DIA (25,5 %)

Zwar waren die Ak-Beladungen bei den verschiedenen Immobilisierungsmethoden der Probenreihe (b) unterschiedlich, dennoch ist zu erkennen, dass der Einfluss der Ak-Beladung auf die Ak-Funktionalität bei verschiedenen Immobilisierungsmethoden unterschiedliche Auswirkungen hatte.

Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse, dass sich durch die Modifizierung der PE-Mikrofilter mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) und den ausgewählten Immobilisierungsmethoden reproduzierbare CRP-immunoaffine PE-Mikrofilter herstellen ließen. Die CRP-Immunoaffinität stieg dabei grundsätzlich mit zunehmender Ak-Beladung der PE-Mikrofilter. Jedoch sank im Gegenzug, in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode, die Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper. Um PE-Mikrofilter für ein ABICAP-Säulenassay herzustellen, sollte darum eine optimale Beladung bei einer speziell ausgewählten Immobilisierungsmethode ausgewählt werden. Dabei sollte zwischen genügend Sensitivität und den teuren benötigten Ak-Mengen abgewogen werden.

Für einen ABICAP-Säulenassay spielen neben der CRP-Immunoaffinität der PE-Mikrofilter noch weitere Faktoren, wie homogene Färbung der Mikrofilter, unspezifische Signalentwicklung oder Stabilität des Assaysignals bei der Lagerung des ABICAP-Säulenassays eine wichtige Rolle. Für die Entwicklung eines POCT auf Basis der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter wurden darum alle Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter, hergestellt gemäß der ausgewählten Immobilisierungsmethoden und der zwei verschiedenen Probenreihen (a) und (b), verwendet.

### 3.5 Entwicklung eines CRP-ABICAP-Säulenassays auf Basis CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter

Zur Entwicklung eines CRP-ABICAP-Säulenassays wurden, ausgehend von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Mikrofiltern und der Anwendung ausgewählter Immobilisierungsmethoden (ASC-, DIA-, EDC-, CAB und SUF-Methode), Ak-funktionalisierte PE-Mikrofilter mit zwei verschiedenen Ak-Beladungen hergestellt: (a) 2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter und (b) einer maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter entsprechend der Immobilisierungsmethode. Der Einsatz der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter in den ABICAP-Säulenassays führte zu verschiedenen ABICAP-Systemen (DIA-, ASC-, EDC-, CAB- und EDC-ABICAP-System) mit den jeweils zwei verschiedenen Ak-Beladungen (a) und (b) der PE-Mikrofilter.

Diese ABICAP-Systeme wurden unter Anwendung des Detektionssystems des ABICAP-Säulenassays zur Entwicklung eines CRP-spezifischen optischen Signals (OD-Wert) getestet. Dazu wurden die ABICAP-Systeme hinsichtlich der benötigten Detektionsreagenzkonzentrationen, zur Maximierung des OD-Wertes des ABICAP-Säulenassays, optimiert. Um ein geeignetes ABICAP-System für die CRP-Konzentrationsbestimmung zu selektieren, wurden Kalibrationskurven und Lagerstabilitätsdaten ermittelt.

#### 3.5.1 Durchführung des ABICAP-Säulenassays

Die CRP-Konzentrationsbestimmung basierte auf dem Detektionsprinzip eines Sandwichassays. Für diesen Assaytyp wurden zwei spezifische Anti-h CRP Antikörperklone angewendet. Der Anti-h CRP 6404 Antikörper wurde wie beschrieben als Fängerantikörper auf die feste Phase immobilisiert. Der Anti-h CRP 6405 Antikörper wurde mit s-NHS-Biotin funktionalisiert, durch Größenausschluss Chromatographie gereinigt und als Detektionsantikörper eingesetzt.

Die Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter wurden in eine ABICAP-Säule zwischen zwei Trennfritten (BSA geblockte PE-Mikrofilter) gepackt. 500 µl Probenpuffer verschiedener CRP-Konzentrationen wurden über die Säule gegeben, wobei das CRP an den Ak-funktionalisierten PE-Mikrofiltern gefangen wurde. Zur Detektion wurden 500 µl eines Biotin-funktionalisierten Detektionsantikörpers in Lösung auf die ABICAP-Säule aufgetragen. Der Detektionsantikörper wechselwirkte mit dem auf dem PE-Mikrofilter gebundenen CRP.

Zur Enzymmarkierung wurde in einem weiteren Schritt 500 µl einer Streptavidin-polyHRP40 (SA-polyHRP)-Lösung über die ABICAP-Säule gegeben. Das Streptavidin-HRP-Konjugat band dabei an die Biotin-funktionalisierten Detektionsantikörper. Abschließend wurde durch Zugabe von 500 µl einer gebrauchsfertigen präzipitierenden TMB-Lösung (ep(HS)TMB) ein optisches Signal (OD) in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration entwickelt. Zwischen allen beschriebenen Arbeitsschritten wurde die ABICAP-Säule mit jeweils 750 µl Waschpuffer gewaschen. Das optische Signal wurde mit einem eigens dafür entwickelten Photoreader (Senova) ausgelesen, welcher die Absorbanz bei  $\lambda=620$  nm misst. Die Gesamtdauer des ABICAP-Säulenassays betrug dabei rund 30 Minuten.

### **3.5.2 Optisches Detektionssystem für ein CRP-ABICAP-Säulenassay mit maximaler optischer Signalstärke**

Die Optimierung – zur Maximierung des OD-Wertes - der ABICAP-Systeme erfolgte bei allen ABICAP-Systemen mit Ak-funktionalisierten PE-Mikrofiltern, hergestellt gemäß der verschiedenen Ak-Beladungen (a) 2,0 µg Ak/PE-Mikrofilter und (b) maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter. Dabei unterschieden sich die Ergebnisse der Optimierung zwischen den beiden Ak-Beladungen nicht voneinander, weshalb nur die Ergebnisse der PE-Mikrofilter mit einer maximalen AK-Beladung (b) aufgeführt sind.

Um die optimale Pufferzusammensetzung für die Zugabe der CRP- und Detektionsreagenzlösungen (Biotinylierter Detektionsantikörper und SA-polyHRP) für die ABICAP-Systeme zu finden, wurden verschiedene Puffersysteme bei verschiedenen pH-Werten getestet. Ein physiologischer pH-Wert von 7,3 auf PBS Basis erwies sich bei allen Arbeitsschritten am geeignetsten. Als Blockierungsreagenz in den Detektionsreagenzlösungen eignete sich Casein, um unspezifische Signalbildung zu vermeiden. Aufgrund dessen wurden alle Arbeitsschritte in uCDB-Puffer (PBS-Puffer, 25% *Casein Buffer 4x Concentrate* (CBC)) durchgeführt.

Eine erhöhte Konzentration der Detektionsreagenzien der ABICAP-Säulenassays verspricht ein größeres spezifisches optisches Signal. Allerdings steigt mit erhöhter Konzentration der Detektionsreagenzien auch das unspezifische Signal, weshalb die Konzentrationen der Detektionsreagenzien hinsichtlich eines maximalen Signal-Rausch-Verhältnisses optimiert werden mussten.

Zur Optimierung der SA-polyHRP Konzentration wurden 500 µl einer SA-polyHRP-Lösung verschiedener Konzentrationen über die ABICAP-Säule der verschiedenen ABICAP-Systeme gegeben, gefolgt von einem Waschschriff und 500 µl der ep(HS)TMB-Lösung. Abschließend wurde das optische Signal gemessen. Die Konzentration, bei der das optische Signal nicht größer als die dreifache Standardabweichung eines Blindsignals (mit Puffer gewaschene ABICAP-Säule) war (OD-Wert<0,1), konnte als höchste Konzentration für das ABICAP-System eingesetzt werden, ohne falsche positive optische Signale zu erzeugen (Abbildung 3-16).

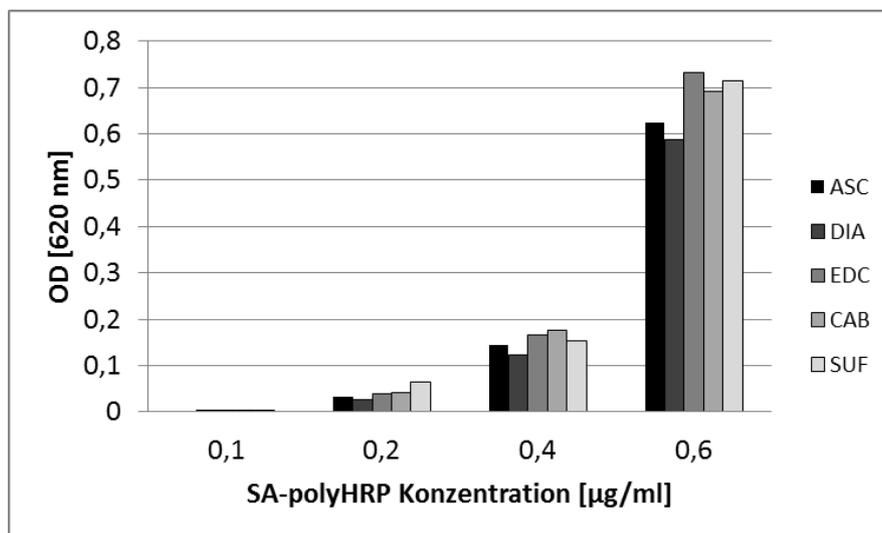


Abbildung 3-16: OD-Werte vs. SA-polyHRP Konzentration der ABICAP-Systeme (ASC-, DIA-, EDC-, CAB und SUF-System) mit einer maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter.

Die Titration der SA-polyHRP-Konzentration zeigte, dass ab einer Konzentration von 0,4 µg SA-polyHRP/ml ein optisches Signal > 0,1 bei allen ABICAP-Systemen vermessen wurde. Daher wurde die SA-polyHRP in einer Konzentration von 0,2 µg/ml für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Anschließend konnte die Detektionsantikörperkonzentration für die ABICAP-Systeme optimiert werden. Dazu wurden 500 µl der Detektionsantikörperlösung verschiedener Konzentrationen über die ABICAP-Säulen der verschiedenen ABICAP-Systeme gegeben, gefolgt von einem Waschschriff und 500 µl einer 0,2 µg SA-polyHRP/ml Lösung. Nach Waschen und Zugabe von 500 µl ep(HS)TMB Lösung wurde das optische Signal vermessen. Auch bei der Titration der Detektionsantikörperkonzentration wurde die höchste Konzentration ausgewählt, bei der das erhaltene optische Signal nicht größer als die dreifache Standardabweichung des OD-Blindwertes war (vgl. Abbildung 3-17).

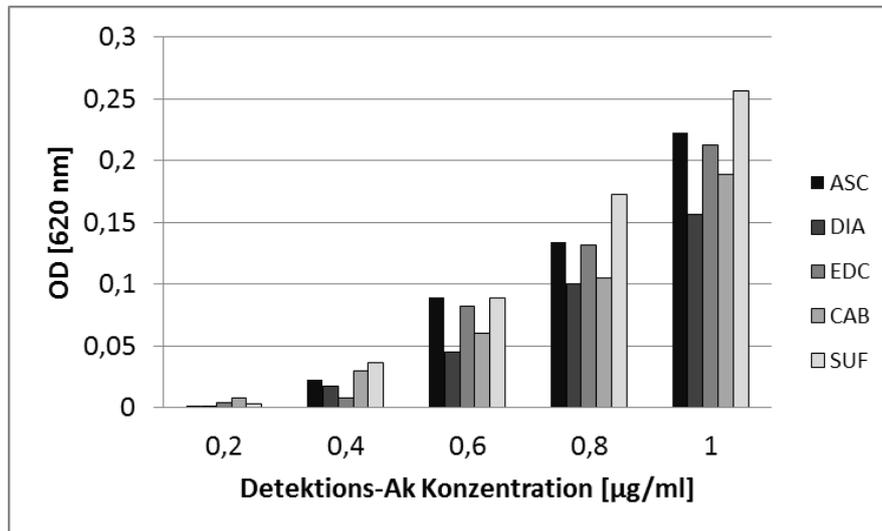


Abbildung 3-17: OD-Werte vs. Detektionsantikörper Konzentration für die verschiedenen ABICAP-Systeme (ASC-, DIA-, EDC-, CAB und SUF-System) mit einer maximalen Ak-Beladung der PE-Mikrofilter.

Die Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration ergab, dass die höchste Konzentration bei der keine unspezifischen Signale auftraten, für alle ABICAP-Systeme bei 0,6 µg biotinylierter Detektionsantikörper pro Milliliter lag. Die optimierten Konzentrationen der Detektionsreagenzien für die unterschiedlichen ABICAP-Systeme unterschieden sich demnach nicht und wurden für die Ermittlung der Kalibrationskurven eingesetzt.

### 3.5.3 CRP-Kalibrationskurven der optimierten ABICAP-Systeme

Für die Ermittlung der CRP-Kalibrationskurven wurden verschiedene CRP-Konzentrationen bei der Durchführung der ABICAP-Säulenassays eingesetzt und das erhaltene optische Signal in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration vermessen. Die Kalibrationskurven wurden für die ABICAP-Systeme mit der Ak-Beladung von 2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter und der maximalen Beladung bestimmt. Die Bestimmung der einzelnen Messpunkte der Kalibrationskurven erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Bei Auftragung der OD-Werte gegen die logarithmierte CRP-Konzentration wurden die in Abbildung 3-18 dargestellten CRP-Kalibrationskurven mit Hilfe der 4PL gefittet. Für die verschiedenen ABICAP-Systeme und unterschiedlichen Ak-Beladungen der eingesetzten Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter ergaben sich verschiedene CRP-Kalibrationskurven. Die ABICAP-Systeme mit einer maximalen AK-Beladung der PE-Mikrofilter wiesen, unabhängig von der Immobilisierungsmethode, eine sensitivere CRP-Kalibrationskurve auf, als die ABICAP-Systeme mit einer Ak-Beladung von 2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter. Die Ursache war die

erhöhte CRP-Immunoaffinität der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter durch die größere Ak-Beladung.

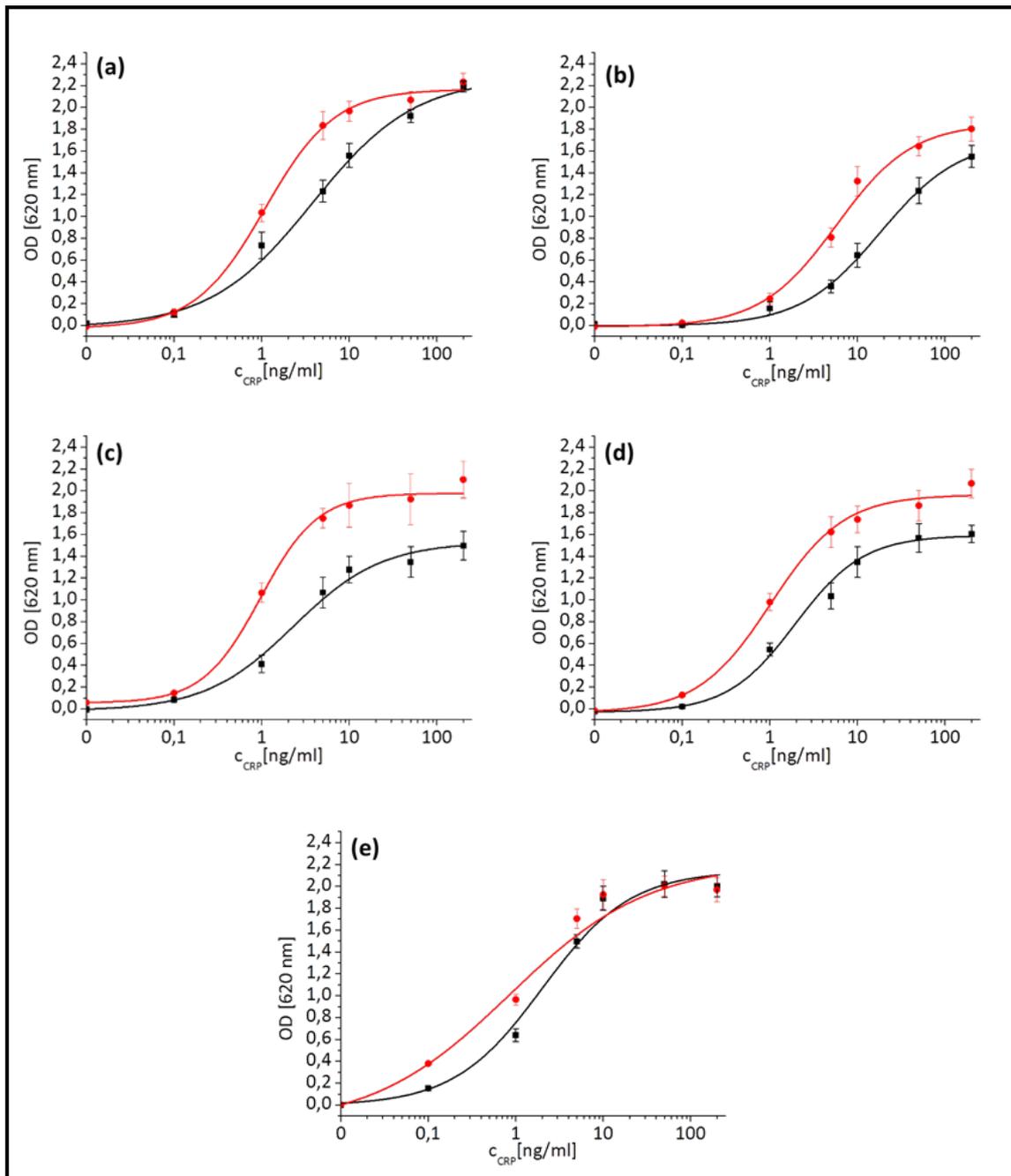
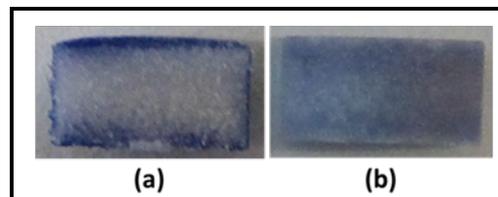


Abbildung 3-18: Halblogarithmische Darstellungen „OD-Wert vs. CRP-Konzentration ( $c_{CRP}$ ) als CRP-Kalibrationskurven von EDA-Cellulosecarbanilat-basierten CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern nach ausgewählten Ak-Immobilisierungsmethoden a) ASC-Methode, b) DIA-Methode, c) EDC-Methode, d) CAB-Methode und e) SUF-Methode bei einer Ak-Beladung von  $2 \mu\text{g}$  Anti-h CRP 6404 Ak/Säulenassay (schwarze Kurve) bzw. einer maximal Beladung des Säulenassays (rote Kurve).

Zur Bewertung der Kalibrationskurven wurde die Nachweisgrenze (NWG) der Säulenassays bestimmt. Die NWG ist definiert als die CRP-Konzentration, bei der das optische Signal

größer ist als das optische Signal einer Blindprobe plus die dreifache Standardabweichung der Blindprobenmessungen. Der Vergleich der CRP-Kalibrationskurven der verschiedenen ABICAP-Systeme zeigte, dass die NWG des DIA-ABICAP-Systems bei 1,0 ng CRP/ml lag. Bei allen anderen angewendeten ABICAP-Systemen konnten 0,1 ng CRP/ml nachgewiesen werden.

Ursache für die geringe NWG des DIA-Systems war die ungleichmäßige Farbstoffentwicklung in dem PE-Mikrofilter während des Säulenassays. Der Grund dafür war die erwähnte, ungleichmäßige Ak-Immobilisierung, welche nur in den äußeren Bereichen des PE-Mikrofilters stattfand (vgl. Kapitel 3.4.2). Ein aufgeschnittener, Ak-funktionalisierter PE-Mikrofilter gemäß DIA-Methode nach der Durchführung des ABICAP-Säulenassays zeigte, dass das Innere des Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilters nicht gefärbt war (vgl. Abbildung 3-19), weshalb eine geringere NWG des DIA-ABICAP-Systems im Vergleich zu den ASC-, EDC-, CAB- und SUF-ABICAP-Systemen erhalten wurde.



*Abbildung 3-19: Schnittfläche zweier EDA-Cellulosecarbanilat-basierter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter, hergestellt a) gemäß DIA-Methode, 3 µg Ak-Proteinmenge/PE-Mikrofilter und b) ASC-Methode, 7,5 µg Ak-Proteinmenge/PE-Mikrofilter, nach ABICAP-Säulenassay anhand einer CRP-Konz.: 1 ng/ml und Anwendung des spez. Detektionssystems gemäß Kapitel 3.5.2.*

Die ASC- und SUF-ABICAP-Systeme zeichneten sich besonders aus, da auch bei einer Ak-Beladung von 2,0 µg Ak pro PE-Mikrofilter 0,1 ng CRP/ml nachgewiesen werden konnten. Bei dem CAB- und EDC-ABICAP-Systemen war dagegen eine maximale AK-Beladung der PE-Mikrofilter notwendig um eine NWG von 0,1 ng CRP/ml zu erreichen. Dies hat für das ASC- und SUF-ABICAP-System den Vorteil, dass weniger teures Ak-Protein für eine CRP-Konzentrationsbestimmung bei gleicher NWG erforderlich war. Der dynamische Bereich der CRP-Eichkurven lag unabhängig vom ABICAP-System zwischen 1,5-2 log-Stufen.

### 3.5.4 Langzeitstabilität der CRP-ABICAP-Systeme

Bei ABICAP-Säulenassays ist es unerlässlich, dass die fertigen ABICAP-Säulenassays über einen Zeitraum von mehreren Montagen stabile Ergebnisse liefern. Dabei wurden in dieser Arbeit nur die selbst hergestellten, Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter untersucht. Die

kommerziell erhältlichen Materialien (SA-polyHRP, TMB-Lösung, Detektionsantikörper) wurden nach Herstellerangaben gelagert und im Rahmen der vom jeweiligen Hersteller angegebenen Verwendbarkeitsfrist benutzt.

Um die hergestellten ABICAP-Systeme auf Langzeitstabilität zu prüfen, wurden diese bei ABICAP-Assay üblichen Lagerungsbedingungen (mit Trockenmittel eingeschweißt in luftdichter Verbundfolie) gelagert. In verschiedenen Zeitabständen wurde je ein vorbereitetes ABICAP-Systeme mit einer Nullprobe sowie mit einer Positivprobe mit einer Konzentration von 1 ng CRP/ml untersucht. Die Signale der Nullprobe nach verschiedenen Abständen unterschieden sich bei keinem der ausgewählten ABICAP-Systeme. Die Signale der Positivproben in Abhängigkeit von der Lagerzeit sind in Abbildung 3-20 dargestellt.

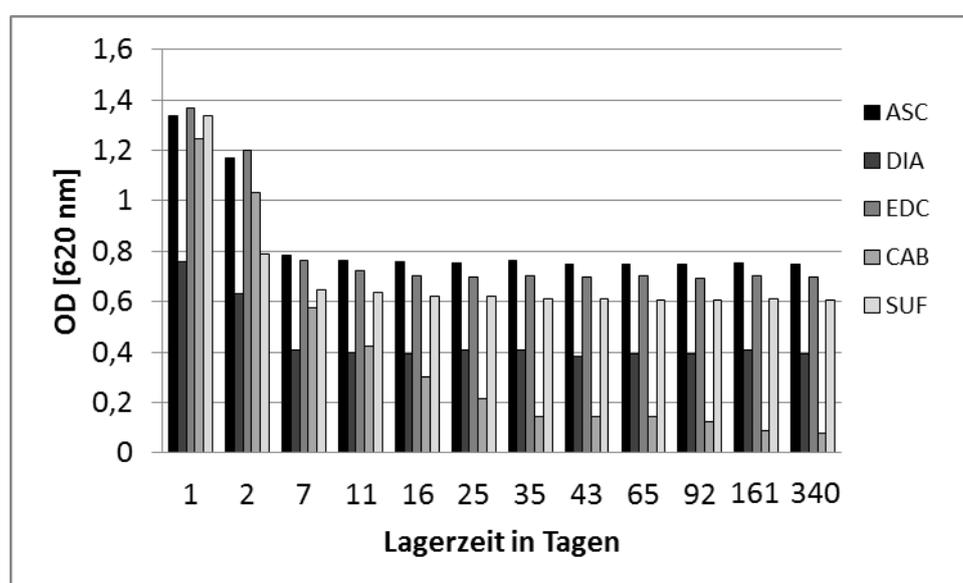


Abbildung 3-20: Balkendarstellung der Lagerstabilität neuer EDA-Cellulosecarbanilat-basierter CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter durch „OD-Wert vs. Lagerzeit (Tage)“ in Abhängigkeit von der Anti-h CRP 6404 Ak-Immobilisierungsmethode.

Deutlich zu erkennen ist, dass unabhängig vom ABICAP-System die OD-Werte bei Anwendung der CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter im ABICAP-Säulenassay der Positivprobe (1,0 ng CRP/ml) innerhalb der ersten sieben Tage der Aufbewahrung abnehmen.

Nach einer Lagerzeit von mehr als sieben Tagen war keine Abhängigkeit der OD-Werte von der Lagerzeit mehr feststellbar, wenn die CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter mittels ASC-, DIA-, EDC- oder SUF-Methode hergestellt wurden. Dagegen konnte bei CRP-immunoaffinen PE-Mikrofiltern, welche mittels der CAB-Methode hergestellt wurden, auch nach einer

Lagerzeit von 340 Tagen keine Stabilität der OD-Werte des ABICAP-Säulenassays festgestellt werden.

Da die OD-Werte der ABICAP-Säulenassay erst nach sieben Tagen mit zunehmender Lagerzeit konstant blieben, wurden die CRP-Kalibrationskurven des ASC-, DIA-, EDC-, CAB- und SUF-ABICAP-Systems nach sieben Tagen Lagerzeit ermittelt. Anschließend waren die CRP-Kalibrationskurven der ASC-, DIA-, EDC- und SUF-ABICAP-Systeme für einen Zeitraum von mindestens 333 Tagen gültig. Für das CAB-ABICAP-System waren aufgrund der abfallenden OD-Werte des ABICAP-Säulenassays mit zunehmender Lagerzeit, die CRP-Kalibrationskurven nach wenigen Tagen nicht mehr gültig.

Durch die kovalent oder elektrostatische Immobilisierung der Antikörper auf der Oberfläche war ein Ausbluten oder eine Änderung der Orientierung der Antikörper nicht möglich. Die anfänglich beobachteten Änderungen (innerhalb von sieben Tagen) der OD-Werte können daher als Ursache haben, dass sich in den mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Mikrofiltern Anteile von Ak-Protein befanden, die nicht durch die Methode immobilisiert vorlagen und somit nach Lagerung und anschließender Durchführung des Assays ausgewaschen wurden. Außerdem ist vorstellbar, dass die Abnahme der OD-Werte der ABICAP-Systeme innerhalb der ersten sieben Tage der Aufbewahrung durch Konformationsänderungen der Anti-h CRP 6404 Antikörper durch Oberflächeneffekte hervorgerufen wurden. Nach der Ak-Immobilisierung kann sich die Tertiärstruktur der Antikörper durch Einflüsse der Oberflächenstruktur ändern, wodurch die Ak-Funktionalität gesenkt wird. Dabei zeigt sich, dass die ausgewählten Immobilisierungsmethoden (ASC-, DIA-EDC-, CAB und SUF-Methode) auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Mikrofiltern unterschiedliche Oberflächeneinflüsse ausübten. Die gemäß CAB-Methode Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter erlaubten es offensichtlich, dass noch Konformationsänderungen des Ak-Proteins auch nach einer Aufbewahrung über sieben Tage hinaus auftraten. Nachteilig wirkte sich dabei womöglich die nicht vollständige Umsetzung der Aminogruppen mit dem reaktionsträgen Bernsteinsäureanhydrid aus. Dadurch blieben primäre Aminogruppen auf der Oberfläche erhalten, welche als positive Ladungsträger womöglich Konformationsänderungen hervorrufen konnten.

Bei Anwendung der SUF-Methode, welche die Antikörper ebenfalls wie die CAB-Methode über elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche immobilisierten, traten stärkere elektrostatische WW auf, weshalb es offensichtlich kaum noch zu Konformationsänderungen

der Anti-h CRP 6404 Antikörper kam. Vorteilhaft könnte dabei auch die vollständigere Umsetzung der primären Aminogruppen der mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Mikrofilter mit dem 4,4'-Biphenyldisulfonsäurechlorid sein, wodurch weniger primäre Aminogruppen als Ladungsträger auf der Oberfläche verblieben.

Bei der kovalenten EDC-Immobilisierungsmethode wurden die Antikörper zusätzlich kovalent auf der Oberfläche immobilisiert. Dadurch wurden die Antikörper womöglich stärker auf der Oberfläche fixiert, wodurch es zu weniger Konformationsänderungen im Vergleich zur CAB-Methode kam.

#### **3.5.5 Auswahl eines geeigneten ABICAP-Systems für die POCT-Anwendung zur CRP-Konzentrationsbestimmung**

Für die Bewertung der verschiedenen ABICAP-Systeme hinsichtlich der Entwicklung eines ABICAP-Säulenassays für die CRP-Konzentrationsbestimmung spielen vor allem die Lagerstabilität sowie die benötigten Antikörpermengen pro Konzentrationsbestimmung eine entscheidende Rolle. Außerdem ist die CRP-Nachweisgrenze ein zusätzliches, wichtiges Entscheidungskriterium.

Dabei war das CAB-ABICAP-System aufgrund der fehlenden Stabilität der OD-Werte des ABICAP-Säulenassays bei der Lagerung der Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter nicht geeignet. Aufgenommene CRP-Kalibrationskurven waren nach wenigen Tagen nicht mehr gültig, wodurch folgende CRP-Konzentrationsbestimmungen fehlerhaft wären.

Grundsätzlich waren außerdem aufgrund der geringeren benötigten Ak-Mengen, die Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter mit einer Ak-Beladung von  $2,0 \mu\text{g Ak}$  pro PE-Mikrofilter bevorzugt geeignet. Besonders zeichneten sich dabei das ASC- und das SUF-ABICAP-System aus, da auch mit einer Beladung von  $2,0 \mu\text{g Ak}$  pro PE-Mikrofilter eine Nachweisgrenze von  $0,1 \text{ ng CRP/ml}$  erreicht wurde. Bei den Systemen CAB- und EDC- waren größere Ak-Mengen nötig um die gleiche NWG zu erreichen. Mit dem DIA-ABICAP-System wurde nur eine NWG von  $1,0 \text{ ng CRP/ml}$  erreicht, weshalb es weniger gut geeignet war als die anderen ausgewählten ABICAP-Systeme.

Das SUF-ABICAP-System hatte gegenüber dem ASC-ABICAP-System den Nachteil, dass die CRP-Kalibrationskurven, ausgewertet nach der 4PL, merklich von den tatsächlichen Messwerten abwichen (vgl. Abbildung 3-18). Dies würde große Fehler bei der CRP-Konzentrationsbestimmung nach Vorlage einer 4PL gefitteten CRP-Kalibrationskurve

verursachen. Da die 4PL als Grundlage zur Auswertung der Kalibrationskurven dieser Arbeit herangezogen wurde, war das ASC-ABICAP-System zu bevorzugen.

### 3.5.6 Validierungen des ASC-ABICAP-Säulenassayssystems

Das zur CRP-Konzentrationsbestimmung besonders geeigneten ASC-ABICAP-System wurde anschließend validiert, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Durch Mehrfachmessungen im analytisch relevanten Messbereich wurde die Präzision durch die Ermittlung der Intraassay-Varianz untersucht. Dazu wurden von vier verschiedenen vorgelegten CRP-Konzentrationen: Nullprobe (0 ng CRP/ml), niedrige Konzentration (0,1 ng CRP/ml), mittlere Konzentration (1,0 ng CRP/ml) und hohe Konzentration (5 ng CRP/ml), in einer Elffachbestimmung die CRP-Konzentrationen bestimmt. Die daraus ermittelten Variationskoeffizienten (VK) betragen 8,2 % (Nullprobe), 9,5 % (niedrige Konzentration), 8,1 % (mittlere Konzentration), 10,9 % (hohe Konzentration). Der gesamt VK des Assays liegt bei 9,2 %, was ausreichend gut für ein Immunoassay-basierendes Nachweissystem ist.

Insgesamt gelang es damit einen CRP-ABICAP-Säulenassay zu entwickeln, der sich durch eine niedrige Nachweisgrenze ( $C_{\text{CRP}}=0,1$  ng/ml) und einen großen dynamischen Bereich (0,1-5 ng/ml) auszeichnet. Die Langzeitstabilität, bis zu mindestens 333 Tagen, sowie eine ausreichende Präzision waren gewährleistet.

### 3.5.7 Bewertung des CRP-ABICAP-Säulenassays

Die Grundlage des ABICAP-Säulenassays bildete die Substratmodifizierung mit EDA-Cellulosecarbanilat, welche eine kovalente Ak-Immobilisierung unter Erhalt großer Antikörperfunktionalität erlaubte. Typische Nachweisverfahren, die auf dem Immunoassay Prinzip basieren, sind ELISAs. Dabei werden die Antikörper adsorptiv an die feste Phase immobilisiert. Vorteil ist die einfache Durchführung der adsorptiven Immobilisierung. Allerdings wird dabei kein Einfluss auf den Erhalt der maximalen Ak-Funktion ausgeübt. Übliche Ak-Funktionalitäten adsorptiv immobilisierter Antikörper von ELISAs liegen bei ca.-10 % [Butler et al. 1992]. Durch die Auswahl geeigneter Immobilisierungsmethoden auf mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Mikrofiltern konnten bis zu 26 % der Ak-Funktion erhalten werden, was deutlich über der adsorptiv gebundenen Ak-Funktion liegt. Des Weiteren verlieren ELISAs mit adsorptiv gebundenen Antikörpern mit zunehmender

Lagerzeit Sensitivität aufgrund der Desorption adsorptiv gebundener Antikörper und aufgrund schleichender Konformationsänderungen. Durch Zusatz von Stabilisatoren können diese allerdings weitgehend vermieden werden. Durch die stabile, kovalente Fixierung der Antikörper auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Mikrofiltern ist die Lagerstabilität im Gegensatz zu den ELISAs jedoch ohne zusätzliche Stabilisatoren dauerhaft gewährleistet.

Außerdem sind Analyseergebnisse bei Anwendung des ABICAP-Säulenassays bereits nach 30 Minuten vorhanden. ELISA Prozeduren benötigen üblicherweise drei bis vier Stunden. Nachteile des ABICAP-Systems im Vergleich zum ELISA sind größere Mengen benötigter, teurer Detektions- und Fängerantikörper und größere Mengen Analyselösung zur Konzentrationsbestimmung. Typische ELISAs benötigen ca. 0,1 µg Ak und 100 µl Probenvolumen pro Konzentrationsbestimmung, was deutlich unter den benötigten 2,6 µg Ak und 500 µl Probenvolumen für den ABICAP-Säulenassay liegt.

Im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen CRP-Konzentrationsbestimmungsmethoden zeichnet sich der ABICAP-Säulenassay vor allem durch einen Nachweis im hochsensitiven Bereich von bis zu 0,1 ng CRP/ml aus. Typische erwerbliche CRP-ELISAs erreichen nicht annähernd die Nachweisgrenzen (NWG=0,2 mg CRP/ml) wie mit dem hier entwickelten ABICAP-Säulenassay [Dominici et al. 2004; Clarke et al. 2005].

Sensitive CRP-Konzentrationsbestimmungen sind beispielsweise mit Hilfe magnetischer Partikel auf Basis einer ABICAP-Säule beschrieben. Damit können CRP-Konzentrationen ab 25 ng CRP/ml nachgewiesen werden. Die Antikörper sind dabei jedoch adsorptiv auf die feste Phase gebunden, was zu Lagerstabilitätsproblemen führen kann. Des Weiteren werden pro Bestimmungsmethode 15 µg Fängerantikörper benötigt, was weit über den 2,6 µg des hier beschriebenen ABICAP-Säulenassays liegt. [Meyer et al. 2007]

Ein ebenfalls sehr sensitiver CRP-Nachweis basierend auf nanokristallinen Fluoresceindiacetat-Konjugaten mit einem Detektionslimit von 1,1 ng CRP/ml wurden von Sin et al. entwickelt [Sin et al. 2006]. Allerdings sind die Antikörper dabei ebenfalls adsorptiv auf einer 96iger Mikrotiterplatte immobilisiert und die NWG des ABICAP-Säulenassays wird ebenfalls nicht erreicht.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die CRP-Konzentrationsbestimmung durch den ABICAP-Säulenassay auf Basis der mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Mikrofilter den

Vorteil eines sehr sensitiven Nachweises bietet. Es wurden im Vergleich zur Literatur mit Abstand die geringsten NWG eines CRP-Nachweisverfahrens erreicht. Die relativ großen Ak-Funktionalitäten der immobilisierten Antikörper und der sensitive CRP-Nachweis deuten auf einen vorteilhaften Einfluss des EDA-Cellulosecarbanilates auf den Erhalt der Ak-Funktion hin. Durch die Möglichkeit, die Ak-Funktion durch verschiedene Strukturen bzw. Immobilisierungsreaktionen des Kopplungsreagenzes zu beeinflussen, ist es möglich, weiter Biosensoren unter Erhalt der maximalen Ak-Funktion zu entwickeln. Außerdem gelang es, Antikörper kovalent auf die Oberfläche zu immobilisieren, wodurch Sensitivitätsverluste durch Ausbluten der Antikörper vermieden werden. Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate eignen sich daher besonders als Alternative zur Herstellung von Ak-funktionalisierten Oberflächen zur Entwicklung von Biosensoren.

### **3.6 Erzeugung CRP-immunoaffiner Oberflächen auf PE-Membranen zur Entwicklung eines LFA für CRP-Konzentrationsbestimmungen**

Die Modifizierung von PE-Mikrofiltern mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) und anschließende Ak-Immobilisierung mit ausgewählten Ak-Immobilisierungsmethoden führten zu einer erfolgreichen Entwicklung eines CRP-ABICAP-Säulenassays. Die gewonnenen Kenntnisse der Ak-Immobilisierung an mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Mikrofiltern wurden zur Erzeugung CRP-immunoaffiner Oberflächen auf PE-Membran angewendet. Diesen Membranen wurden anschließend als CRP-spezifische Membran auf die Eignung in einem LFA zur CRP-Konzentrationsbestimmung getestet.

#### **3.6.1 Herstellung CRP-immunoaffiner Oberflächen auf mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Membranen**

Eine reproduzierbare und flächendeckende Modifizierung der PE-Membranen mit Aminocellulose war nur ausgehend von der Modifizierung mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) zu erwarten. Diese bildete die Grundlage für die Anwendung der ausgewählten Immobilisierungsmethoden zur Herstellung Ak-funktionalisierter Oberflächen auf PE-Membranen. Die Modifizierung der PE-Membranen erfolgte durch 15 Minütiges Rühren in 0,05 %iger EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**)-Lösung in DMF unter Vakuumbedingungen um sicherzustellen, dass keine Lufteinschlüsse in den Poren die Modifizierung verhinderte.

Die ausgewählten Immobilisierungsmethoden DIA-, SUF-, ASC-, CAB- und EDC-Methode wurden zur Immobilisierung von Anti-h CRP 6404 Antikörpern an die PE-Membranen angewendet. Dabei erfolgte der erste Schritt der Ak-Immobilisierung, die Aktivierung, gemäß der ausgewählten Immobilisierungsmethoden analog der Prozedurbeschreibungen der Kapitel 3.3.3 bis 3.3.11. Die PE-Membranen wurden dabei vollständig im Batch aktiviert.

Anschließend wurde eine Ak-Linie zur Erzeugung einer Ak-Fängerbande auf den aktivierten PE-Membranen immobilisiert. Das Aufbringen der Ak-Fängerbande wurde mit einem Biodot-Gerät *Air Jet Quanti 3000 Dispenser* (Abbildung 3-21) im Dispersionsverfahren durchgeführt.

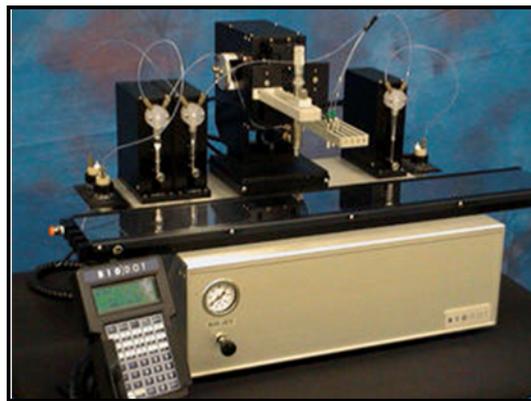


Abbildung 3-21: *Air Jet Quanti 3000 Dispenser* der Firma Biodot zum Auftragen der Ak-Fängerbande [[www.biodot.com](http://www.biodot.com)].

Dabei wurden die Anti-h CRP 6404 Antikörperlösungen ( $C_{\text{Anti-h CRP 6404}}=1 \text{ mg/ml}$ , pH-Wert je nach Immobilisierungsmethode) in diesem Gerät mit Hilfe von Mikroliterspritzen und feinen Schrittmotoren über Schläuche in feine Kapillaren gespült. Über diese Kapillaren war es möglich sehr genaue dosierbare Flüssigkeitsvolumina ( $1,0 \mu\text{l}$  pro cm Länge der Membran) der Antikörperlösung auf die Membranoberfläche aufzugeben, wobei die Kapillaren quer über die Membran gezogen wurden, um eine dünne Flüssigkeitslinie zu erzeugen. Die so aufgetragenen Anti-h CRP 6404 Antikörperlösungen sanken in die Membranstruktur ein. Bei den Immobilisierungsmethoden ASC-, EDC-, CAB- und SUF-Methode wurde die Membran anschließend für 15 Minuten bei RT aufbewahrt. Bei der DIA-Methode wurde die Membran nach Auftragen der Antikörperlösung unter Einstrahlung von Licht mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda=350 \text{ nm}$ , erzeugt mit einer HBO-Lampe und entsprechendem Interferenzfilter, behandelt. Dabei immobilisierten die Anti-h CRP 6404 Antikörper nach den Mechanismen der jeweiligen Immobilisierungsmethode an die aktivierten PE-Membranen. Die restlichen Bindungsstellen der aktivierten PE-Membranen wurden im Batch mit Casein geblockt und die Membranen abschließend für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  getrocknet.

### 3.6.2 Herstellung der Teststreifen

Wie bereits beschrieben besteht ein funktionsfähiger Teststreifen aus mehreren Einzelkomponenten. In der vorliegenden Arbeit war nur die CRP-spezifische Membran Bestandteil der Untersuchung. Darum wurden Teststreifen bestehend aus Ak-funktionalisierter PE-Membran und *Absorbent-Pad*, welches dafür sorgt, dass die Flüssigkeiten durch die Membran transportiert werden, hergestellt. *Konjugate-Release-Pad* und *Sample-Pad* wurden im Rahmen der Arbeit nicht berücksichtigt.

Die Ak-funktionalisierten PE-Membranen wurden auf eine selbstklebende Plastikkarte (*Backing-Card*) geklebt. Oberhalb der Membran wurde überlappend mit der Ak-funktionalisierten PE-Membranen ein *Absorbent-Pad* ebenfalls auf der selbstklebenden Plastikkarte befestigt. Die so erhaltenen 10 cm langen Streifen wurden quer mit einer Schlagschere in 4 mm breite Teststreifen geschnitten.

### 3.6.3 Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates

Die Visualisierung der verschiedenen CRP-Konzentrationen in der Probe mit Hilfe des Teststreifens erfolgte durch Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugate. Zur Herstellung des Konjugates wurden Goldnanopartikel mit einer Größe von 40 nm vorgelegt (Sigma Aldrich) und der pH-Wert der Goldkolloidlösung mit 0,2 M Natriumcarbonat-Lösung auf pH 6,5 eingestellt. Anschließend wurden 12 µg Anti-h CRP 6405 Antikörper pro Milliliter Goldkolloidlösung zugegeben. Nach Schütteln für 30 Minuten der Lösung wurden restliche Bindungsstellen durch Zugabe von 100 µl einer 1 %igen BSA-Lösung in PB-Puffer (pH 7,3) geblockt. Nach mehreren Waschschritten mit Blockpuffer (PBS, 0,2 % BSA) wurden die Antikörper-Gold-Konjugate in 40 µl Blockpuffer aufgenommen.

### 3.6.4 Durchführung eines lateralen CRP-Dipstick-Testes mit verschiedenen Ak-funktionalisierten Teststreifen

Mit Hilfe eines lateralen Dipstick-Testes wurden die hergestellten Teststreifen auf die Eignung zur CRP-Konzentrationsbestimmung untersucht. Dazu wurden verschiedenen CRP-Konzentrationen in uCDB-Puffer (PBS-Puffer, 25 % CBC) vorgelegt und eine definierte Menge Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugat-Lösung (1,0 µl pro Test) zugegeben. Die Antikörper, konjugiert an das Goldkolloid, lagen dabei in großem molaren Überschuss im Vergleich zum CRP vor. In die Lösung aus CRP und Antikörper-Gold-Konjugaten wurden die

Teststreifen mit dem unteren Ende der Membran eingetaucht. Die Lösung aus CRP und Antikörper-Gold-Konjugaten wurde durch die Membran durch kapillare Sogkräfte bis ins *Absorbent-Pad* transportiert. Das CRP wurde während des Transportes durch die Membran von den Antikörpern des Antikörper-Gold-Konjugates gebunden. Dieser CRP-Antikörper-Gold-Konjugat-Komplex wiederum band an die auf der PE-Membran immobilisierten Fängerantikörper. Es entstand eine vom Gold-Konjugat rot gefärbte Signalbande in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration (vgl. Abbildung 3-22).

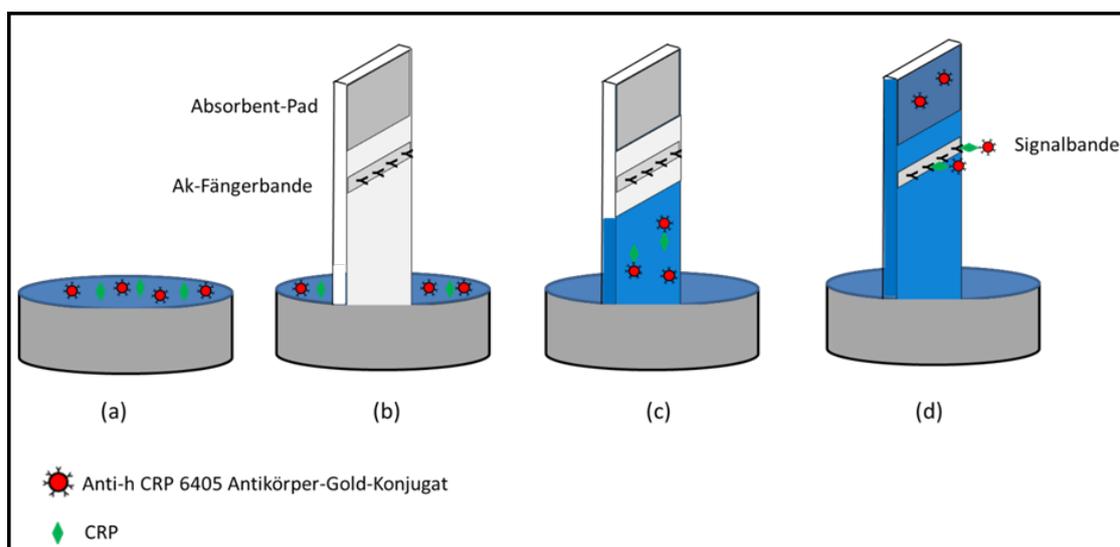


Abbildung 3-22: Schematische Darstellung des lateralen DipStick-Testes zur CRP-Konzentrationsbestimmung: a) Zugabe des Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugates zu einer CRP-Lösung definierter Konzentration, b) Eintauchen der Teststreifen in die Lösung aus CRP und Antikörper-Gold-Konjugat c) Flüssigkeitstransport durch die Membran und Komplexbildung aus CRP und an die Gold konjugierten Anti-h CRP 6405 Antikörper d) Bindung des CRP-Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugat-Komplexes an, auf der Membran immobilisierte, Anti-h CRP 6404 Antikörper. Entstehen einer CRP-konzentrationsabhängigen Signalbande.

Nach 10 Minuten wurden die Teststreifen aus der Lösung entnommen und die Signalbande visuell ausgewertet. Dabei wurde der Signalbande eine Signalintensität zwischen G1 (nicht sichtbare Signalbande) und G10 (stärkste Signalintensität der Signalbande) mithilfe einer Musterkarte (vgl. Abbildung 3-23) zugeordnet.

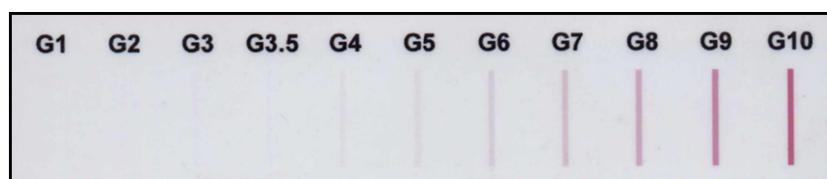


Abbildung 3-23: Musterkarte zur Auswertung der Signalbandenintensität der Teststreifen nach dem lateralen DipStick-Test.

### 3.6.5 Ergebnisse der lateralen DipStick-Tests mit Teststreifen bestehend aus CRP-immunoaffinen PE-Membranen

Durch den lateralen DipStick-Test wurden die Nachweisgrenzen für die CRP-Konzentrationsbestimmung der Teststreifen, bestehend aus den Ak-funktionalisierten PE-Membranen, ermittelt. Dazu wurden Lösungen mit CRP-Konzentrationen von 0,01 bis 100 ng CRP/ml in log-Abstufungen angefertigt und damit die lateralen DipStick-Tests durchgeführt. Die geringsten CRP-Konzentrationen, bei der eine Signalbande des jeweiligen lateralen DipStick-Testes zu erkennen war, sind in Tabelle 3-11 angegeben und gelten als Nachweisgrenzen der jeweiligen Teststreifen.

*Tabelle 3-11: Nachweisgrenze der Teststreifen mit den dazugehörigen Signalintensitäten.*

Immobilisierungsmethode <sup>a</sup>	Nachweisgrenze [ng/ml] <sup>b</sup>	Signalintensität <sup>c</sup>
ASC	-	-
DIA	0,1	G3
EDC	0,1	G5
SUF	0,1	G6
CAB	0,1	G5

<sup>a</sup>Die Ak-funktionalisierten PE-Membranen der Teststreifen wurden nach der angegebenen Immobilisierungsmethode hergestellt.

<sup>b</sup>Die Nachweisgrenze wurde in log-Abstufungen ermittelt (0,01 / 0,1 / 1,0 / 10 / 100 ng CRP/ml).

<sup>c</sup>Visuelle Auswertung der Signalbande an der Nachweisgrenze zwischen G1 und G10 nach der Musterkarte.

Nach Durchführung des DipStick-Testes waren bei den Teststreifen, hergestellt gemäß der ASC-Methode, keine Signalbanden zu erkennen. Ursache ist wahrscheinlich die zu kurze Reaktionszeit der Anti-h CRP 6404 Antikörper mit der gemäß der ASC-Methode aktivierten PE-Membran. Die ASC-Methode benötigt, wie in Kapitel 3.3.5.3 gezeigt, längere Reaktionszeiten, um die Antikörper fest auf der Oberfläche zu fixieren. Durch das Dispersionsverfahren blieben nur kurze Reaktionszeiten, bevor das Lösungsmittel der aufgetragenen Antikörperlösung verdunstete. Dadurch wurden die Antikörper bei Anwendung der ASC-Methode nicht fest auf der Oberfläche fixiert, weshalb im DipStick-Test keine Signalbande ausgebildet wurden. Die ASC-Methode zur Immobilisierung von einer

Anti-h CRP 6405 Antikörperfängerbande auf eine mit EDA-Cellulosecarbanilat (DP~200, **6**) modifizierte PE-Membran ist demnach nicht geeignet.

Bei den Teststreifen hergestellt gemäß der DIA-, EDC-, CAB und SUF-Immobilisierungsmethode wurden CRP-konzentrationsabhängig verschieden intensiv gefärbte Signalbanden erhalten (vgl. Abbildung 3-24). Dabei war bei den Teststreifen hergestellt gemäß der DIA-, EDC-, CAB und SUF-Methode 0,1 ng CRP/ml die geringste CRP-Konzentration, bei der eine Signalbande zu erkennen war. Eine Signalbande bei 0 ng CRP/ml war bei keinem der Teststreifen zu erkennen. Die Intensitäten der Signalbanden der Teststreifen einer Konzentration von 0,1 ng CRP/ml unterschieden sich in Abhängigkeit von der angewendeten Ak-Immobilisierungsmethode der Teststreifen. So wurde bei Anwendung der CAB- und EDC-Methode zur Herstellung der Teststreifen und bei einer CRP-Konzentration von 0,1 ng CRP/ml im DipStick-Test eine Signalintensität von G5 nach der Musterkarte erhalten. Bei Anwendung der SUF-Methode zur Herstellung der Teststreifen wurde eine Signalstärke von G6 und bei Anwendung der DIA-Methode eine Signalintensität von G3 bei einer CRP-Konzentration von 0,1 ng CRP/ml erhalten.

Demnach eignen sich Ak-Immobilisierungsmethoden bei denen kurze Immobilisierungszeiten, für die kovalente (DIA- und EDC-Methode) oder elektrostatische Ak-Immobilisierung (CAB- und SUF-Methode) ausreichen, um CRP-immunoaffine Oberflächen auf mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierten PE-Membranen herzustellen.

Bei der Herstellung der Ak-funktionalisierten PE-Membranen ist die DIA-Methode ebenso gut geeignet, da genügend Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert wurden, um 0,1 ng CRP/ml im DipStick nachzuweisen. Dabei musste das Licht bei der Ak-Immobilisierung auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierte PE-Membranen nur 0,2 mm tief eindringen, wogegen es bei den PE-Mikrofiltern bis zu 2,5 mm Dicke des PE-Mikrofilters zu durchdringen hatte.

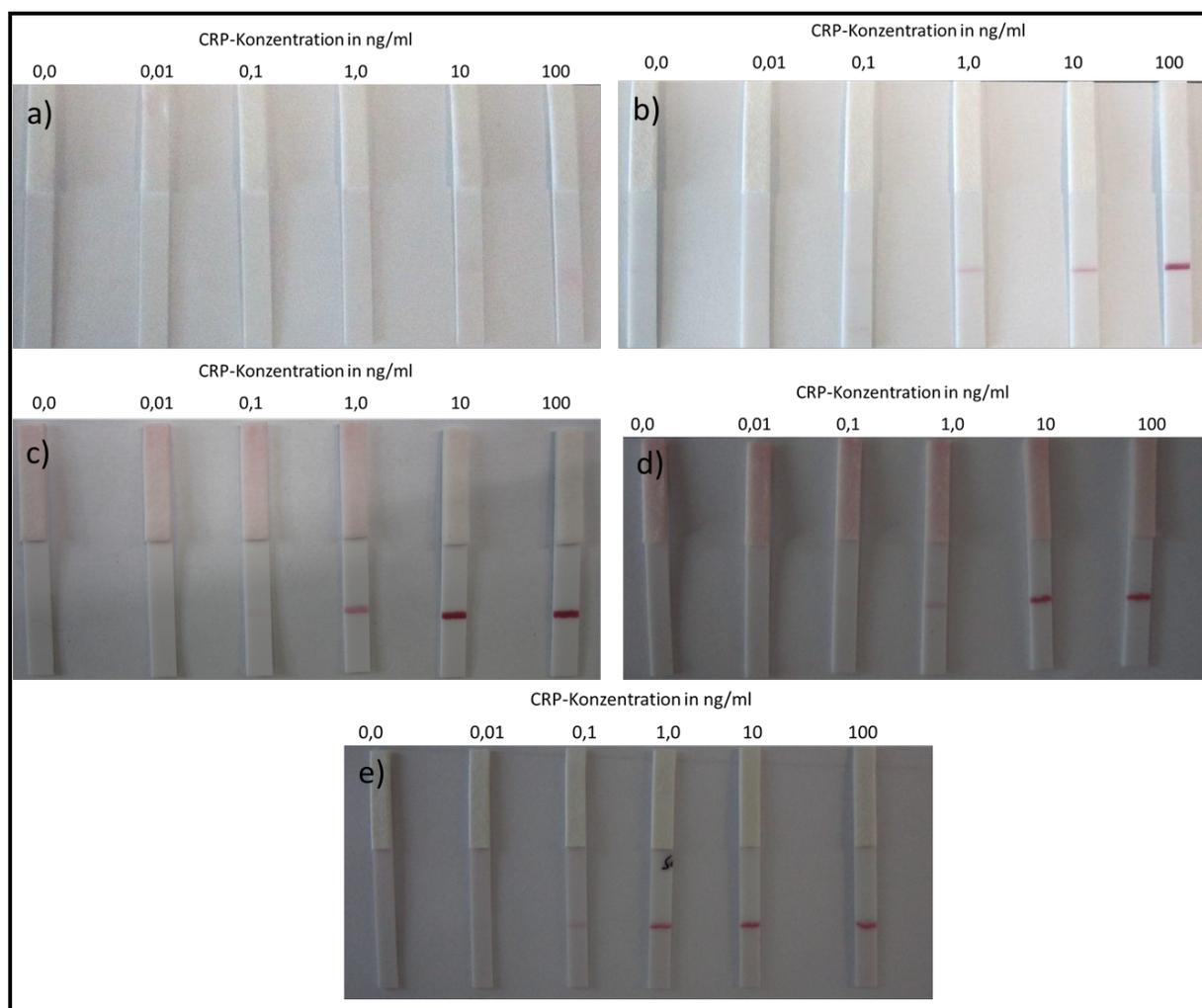


Abbildung 3-24: Teststreifen nach Durchführung des CRP-DipStick-Testes mit verschiedenen CRP-Konzentrationen. Die Antikörperfängerbande auf den mit EDA-Cellulosecarbanilat ( $DP \sim 200$ , **6**) modifizierten PE-Membranen wurde linienförmig mit a) der ASC-Methode, b) der DIA-Methode, c) der EDC-Methode, d) der CAB-Methode und e) der SUF-Methode im Dispersionsverfahren aufgebracht.

### 3.6.6 Bewertung der Ergebnisse des CRP-DipStick-Testes der Ak-funktionalisierten PE-Membranen

Mit Hilfe der EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Membranen gelang es, ein Teststreifen auf PE-Basis für die CRP-Konzentrationsbestimmung zu entwickeln. Dabei wurde in einem lateralen CRP-DipStick-Test eine NWG von 0,1 ng CRP/ml erreicht. Wie auch für den entwickelten CRP-ABICAP-Säulenassays bedeutet das, dass auch der Teststreifen auf EDA-Cellulosecarbanilat-Basis sich durch eine sehr geringe CRP Nachweisgrenze im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Nachweissystemen auszeichnet. Dabei wirkt sich der Erhalt der Ak-Funktionalität der immobilisierten Antikörper vorteilhaft auf die Sensitivität des Testes aus. Vorteile des Teststreifens sind außerdem die geringere Menge benötigter Antikörper pro CRP-Konzentrationsbestimmung (0,4  $\mu\text{g}$  Anti-h CRP 6404 und 0,6  $\mu\text{g}$  Anti-h CRP 6405) im

Vergleich zum ABICAP-Säulenassay. Die Ursache liegt darin, dass nur eine dünne Linie der PE-Membran mit Antikörpern immobilisiert wird und nicht wie beim ABICAP der gesamte PE-Mikrofilter.

### 3.6.6.1 Ausblick

Typische LFA basieren auf einer Nitrocellulosemembran, wobei die Antikörper adsorptiv auf die Nitrocellulosemembran gebunden werden. Dabei treten die geschilderten Probleme der adsorptiven Ak-Immobilisierung wie Sensitivitätsverlust durch Ausbluten der Antikörper auf. Diese Probleme können mit den hier entwickelten Teststreifen, bei denen die Antikörper unter Erhalt der maximalen Ak-Funktion kovalent oder elektrostatisch an die Membran immobilisiert werden, voraussichtlich behoben werden.

Des Weiteren könnte die Fließgeschwindigkeit der Lösungen durch die PE-Membran durch gezielte Porengrößen der PE-Membran gesteuert werden. Damit würden möglicherweise die Variationskoeffizienten und damit der Reproduzierbarkeit der LFA, verursacht durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten und damit Bindungszustände, verbessert werden. Möglicherweise wären damit auch quantitative Analysen im Lateral-Flow-Format denkbar.

In Zukunft könnte mit dem in der Arbeit hergestellten Teststreifen ein gebrauchsfertiger LFA zur CRP-Konzentrationsbestimmung entwickelt werden. Ausgehend von den Erkenntnissen über die Entwicklung des CRP-ABICAP-Säulenassays empfiehlt sich dabei voraussichtlich aufgrund der gewährleisteten Lagerstabilität der ABICAP-Säulenassays die EDC- und SUF-Methode. Allerdings müssen die Lagerstabilität und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die Teststreifen noch nachgewiesen werden.

Zur Fertigstellung eines gebrauchsfertigen LFA müssten *Konjugat-Release-Pad (KRP)* und *Sample-Pad* dem Teststreifen zugefügt werden. An diesem LFA sollten die Einflüsse der eingesetzten Ak-Konzentration auf dem Teststreifen, Goldkonjugatkonzentrationen im KRP und Pufferzusammensetzungen und Zusätze bei der Durchführung des Assays optimiert werden. Die VK des optimierten Assays müsste bestimmt werden, um die CRP-Konzentrationsbestimmung mithilfe des Assays zu validieren.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Chemikalien, Ausgangsmaterialien, Bio- und Detektionsreagenzien, Substrate und verwendete Pufferlösungen

#### 4.1.1 Chemikalien und Ausgangsmaterialien

Die Substrate s(HS)TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Peroxidase Substrate, Gebrauchsfertig für ELISA Anwendungen und ep(HS)TMB (Gebrauchsfertig für ABICAP Anwendungen) wurden von der Firma SDT (Basweiler, Deutschland) erhalten. Sephadex PD-10 Chromatographie-Säulen wurden von GE Healthcare bezogen. Sulfo-NHS-Biotin und Sulfo-NHS-LC-Diazirin wurden von Thermo Fischer Scientific (Rockford, USA) erworben. Nunc-Immuno 96 MicroWell (Maxisorb) Platten (Mikrotiterplatte) wurden bei Sigma Aldrich erworben. ABICAP Säulen wurden von der Senova GmbH bezogen. *Absorbent-Pad* (Grade 113) wurde von Pall (New York, USA) erworben und *Backing-Card* von Kenosha c.v. (JD Amstelveen, Niederlande).

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Sigma Aldrich, Akros-Organics, Merck oder Fluka mit einem für Synthesen geeigneten Reinheitsgrad erworben und wenn nicht anders angegeben ohne weitere Reinigung verwendet.

#### 4.1.2 Bio- und Detektionsreagenzien

Im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation fanden die in Tabelle 4-1 aufgelisteten Bio- und Detektionsreagenzien Verwendung.

Tabelle 4-1: Bio- und Detektionsreagenzien und Bezugsquellen.

Bio- und Detektionsreagenzien	Bezugsquelle
Anti-h CRP 6404 SP-1	Medix
Anti-h CRP 6405 SP-2	Medix
Anti-Maus Antikörper (GAM)	Capricorn
Bovine serum albumin (BSA)	Serva
Casein Buffer 4x Concentrate (CBC)	SDT
Goldnanopartikel (40 nm Durchmesser)	Sigma Aldrich
Human C-reaktives Protein (CRP)	Sunny lab
Protein G	Serva
Streptavidin	IBA
Streptavidin-polyHRP40	SDT

### 4.1.3 Poröse und unporöse Substrate

Im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation fanden die in Tabelle 4-2 aufgelisteten Substrate Verwendung.

Tabelle 4-2: Angewendete Substrate.

Bezeichnung	Material	Maße [mm] <sup>a</sup>	Porosität [μm] <sup>b</sup>	Oberfläche [cm <sup>2</sup> ]	Hersteller
Mikrofilter (Typ 180)	PE, gesintert	h=2,5, ø=5	40	20	Porex
Mikrofilter (Typ 187)	PE, gesintert	h=1,6, ø=5	80-130	N/A	Porex
PE-Membran	PE, gesintert	h=0,4; l=100, b=25	7-12	N/A	Porex
PE-Chip	PE, Film	h=1 ; l=13, b=13	-	N/A	ChipShop
AFM-Substrat	Glimmer	ø=10	-	N/A	Plano GmbH

<sup>a</sup> ø=Durchmesser einer runden Grundfläche, h=Höhe; l=Länge, b=Breite

<sup>b</sup>Durchschnittliche Porengrößen

#### 4.1.4 Reagenz- und Pufferlösungen

Die Zusammensetzung der Reagenz- und Pufferlösungen sind in der Tabelle 4-3 aufgelistet. Falls nicht anders beschrieben, wurde Reinstwasser für die Herstellung verwendet (Kapitel 4.2.1).

*Tabelle 4-3: Lösungen und Puffer zur Oberflächenmodifizierung und Immobilisierung von Biomolekülen.*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH-Wert<sup>a</sup></b>
CBB-Puffer	0,03 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,07 M NaHCO <sub>3</sub>	pH 9,5
PB-Puffer	0,024 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,006 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 8,0
10xPBS-Puffer	0,24 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,06 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,2 M NaCl	pH 7,3
MES-Puffer	0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	pH 5,5
MES-Puffer	0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	pH 6,0
Natriumacetat-Puffer	0,1 M Natriumacetat	pH 4,0
Natriumcarbonat-Lösung	0,2 M Natriumcarbonat	-
Citronensäure-Puffer	0,1 M Citronensäure	pH 3,0
Blockpuffer	1xPBS-Puffer; 0,2% BSA; 0,1 M BND	pH 7,3
Trocknungspuffer	1xPBS-Puffer; 1 % BSA; 5 % Saccharose; 0,1 M BND	pH 7,3
uCDB-Puffer	1xPBS-Puffer; 25 % <i>Casein buffer concentrat</i>	pH 7,3
Waschpuffer	1xPBS-Puffer; 0,1 % BSA; 0,05 % Tween 20	pH 7,3
LiCl-Lösung	6 M LiCl	pH 7,3
NaOH-Lösung	-	pH 11,5

<sup>a</sup>pH-Werte wurden mit HCl oder NaOH auf erwünschten pH-Wert eingestellt.

## 4.2 Laboreinrichtung

### 4.2.1 Reinstwasseraufbereitung

Soweit nicht anders beschrieben, wurde für alle Arbeiten Reinstwasser eingesetzt. Die Bereitung erfolgte mit einer *Reinstwasseranlage Milli-Q-1* der Firma Millipore Eschborn.

### 4.2.2 Sonstige Geräte und Einrichtungen

Photometer zur Untersuchung der Polyethylensinterkörper: ABICAP-Reader, Senova GmbH

Vakuumpumpe: Membranpumpe chemiefest LVS 620 T-2, Ilmvac GmbH

Ultraschallbad: Sonorex RK 31-1

UV/VIS Lesegerät und Mikrotiterplattenreader: Multiskan GO; Thermo Scientific

Sauerstoffplasmagenerator: Hersteller: Diener, Jahr: 2006, Typ: FEMTO

Ozongenerator: Ozonosan Photonik, Hänsler GmbH

Spincoater: SCI Serie, LOT-Oriel Group Europe

Schüttler: Vortex Genie 2, Science Industries

ELISA-Schüttler: Titramax 100, Heidolph

pH-Meter: Seven Multi Neutral Meter, Mettler Toledo, United States

Waage: ABT 220-5D-1, Kern

Trockenschrank: Thermocult

Pouchmaschine: Orved

Air-Brush-Dispenser: Air Jet Quanti 3000 Dispenser, Biodot

UV/VIS-Lampe: HBO 200 Mercury Lampe

## 4.3 Messmethoden

### 4.3.1 Nuklearmagnetresonanzspektroskopie

Die NMR Messungen erfolgten an den Spektrometern AC-250 und DRX-400 der Firma Bruker mit 32.000 bis 64.000 Scans für die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie und von 8.000 bis 40.000 Scans

für die  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie. Die Proben wurden in DMSO- $d_6$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Die Konzentration betrug 10-50 mg Probe pro ml Lösungsmittel.

### 4.3.2 UV/Vis-Messungen

Die Absorptionen bei  $\lambda=280$  nm; 450 nm; 498 nm; 620 nm in der Küvette und in einer 96iger Mikrotiterplatte sowie die kinetischen Messungen wurden mit dem Thermo Scientific Multiskan GO durchgeführt.

### 4.3.3 Elementaranalyse

Alle Kohlenstoff-, Chlorid-, Stickstoff-, Schwefel-, und Wasserstoffanalysen der synthetisierten Aminocellulosen wurden mit Hilfe des Gerätes Vario EL der Firma *Elementar-Analysensysteme* durchgeführt. Die ermittelten Werte werden in Massenprozent angegeben. Die über die Elementaranalyse bestimmten Substitutionsgrade wurden mit der Hilfe der Formel 4-1 ausgerechnet.

Formel 4-1: 
$$\text{DS}_{\text{Substituent}} = \frac{M_{\text{AGU}} \cdot X(\%)}{M_{\text{X}} \cdot 100\% - M_{\text{Substituent}} \cdot X(\%)}$$

$M_{\text{AGU}}$ =molare Masse der Wiederholungseinheit;  $X(\%)$ =gemessener Anteil des Heteroatoms, welches aus dem Substituenten stammt (bei mehreren Heteroatomen in einem Substituenten, wird  $X(\%)$  noch durch die Anzahl der Heteroatome geteilt);  $M_{\text{X}}$  = Molare Masse des Heteroatoms;  $M_{\text{Substituent}}$  = molare Masse des Substituenten

### 4.3.4 AFM-Aufnahmen

Für AFM Untersuchungen wurden planare PE-Chips und Glimmerscheiben (vgl. Tabelle 4-2) via Spincoating mittels Aminocellulosederivat-Lösung modifiziert. Nach Anfertigung der Proben wurden diese mit einem DualScope C26 (DME, Herlev, Dänemark) im Nicht-Kontakt-Modus vermessen.

## 4.4 Allgemeine Synthesevorschriften und Analytik synthetisierter Substanzen

### 4.4.1 Synthese der 6-Tosylcellulosederivate

#### 4.4.1.1 Ausgangscellulosen

Für die vorliegende Arbeit wurde AVICEL Cellulose als Ausgangscellulose (DP~200) eingesetzt. Abgebaute Cellulose (DP~50) ist durch Kochen der Cellulose in Salzsäure nach der Methode von Meiland et al. [2011] ausgehend von der AVICEL Cellulose angefertigt worden.

#### 4.4.1.2 Tosylcellulosederivate

Die erhaltenen 6-Tosylcellulosen (DP~200 (**A**) und DP~50 (**B**)) wurden nach der Vorschrift von Rahn et al. [1996] synthetisiert und sind in Tabelle 4-4 aufgelistet. Ein 6-Tosylcellulosecarbanilat (DP~200, **C**) wurde durch Einführung von Carbanilatgruppen an die 6-Tosylcellulose nach der Vorschrift von Tiller et al. [1999] erhalten. Die Tosylat- und Carbanilat-Substitutionsgrade wurden mittels Elementaranalyse bestimmt.

Tabelle 4-4: 6-Tosylcellulosederivate für die Synthese der Aminocellulosederivate.

Bezeichnung der Tosylcellulosen	Substitutionsgrade der Substituenten der AGE		DP
	DS <sub>Tosylat</sub>	DS <sub>Carbanilat</sub>	
6-Tosylcellulose A	1,0	-	200
6-Tosylcellulose B	1,1	-	50
6-Tosylcellulosecarbanilat C	1,0	1,4	200

### 4.4.2 Synthese der Aminocellulosederivate

Die Aminocellulosederivate wurden nach der Vorschrift von Tiller et al. [1999] synthetisiert und sind anhand des EDA-Celluloseosylates (**1b**) und EDA-Cellulosecarbanilates (**6**) beschrieben.

#### 4.4.2.1 6-Deoxy-6-(2-aminoethyl)aminocellulose (EDA-Celluloseosylat, **1b**)

Zur Herstellung der 6-Deoxy-6-(2-aminoethyl)aminocellulose wurden 5 g 6-Tosylcellulose **A** (aus Tabelle 4-4, 16 mmol) in 60 ml DMSO gelöst, mit 25 ml Ethylendiamin (400 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Isolierung der Aminocellulose erfolgt durch Fällen in

Aceton und anschließendes Waschen mit Aceton und Isopropanol. Das noch feuchte Produkt wurde in Wasser gelöst, am Rotationsverdampfer von Lösemittelresten befreit und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Nach dem Gefriertrocknen wurde das Aminocelluloseosylat in Wasser über Nacht gelöst und auf 1 % w/w eingestellt. Anschließend die Lösung durch eine G3 Fritte filtriert und für 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt und als 1 % w/w bei RT gelagert.

#### **Analytik:**

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ [ppm]: **20,5** ( $\text{CH}_3$  des Tosylates), **35 - 55** ( $\text{CH}_2$ ; der Aminosubstituenten), **59,1-101,8** (AGE der Cellulose), **145,5-119,5** (Aromaten-C der Tosylate)

Elementaranalyse: C:43,63 %; H:7,93 %; S:0,74 %; Cl:0,00 %; N:10,51 %

$\text{DS}_{\text{Ethylendiamin}}$ : 0,75 (Stickstoffgehalt, Bestimmung mittels EA)

#### **4.4.2.2 6-Deoxy-6-(2-aminoethyl)aminocellulosecarbanilat (EDA-Cellulosecarbanilat, 6)**

Zur Herstellung des 6-Deoxy-6-(2-aminoethyl)aminocellulosecarbanilates wurden 5 g Tosylcellulose **C** (aus Tabelle 4-4, 12 mmol) in 60 ml DMSO gelöst, mit 19 ml Ethylendiamin (300 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Isolierung der Aminocellulose erfolgt durch Fällern in Ethanol und anschließendes Waschen mit Ethanol. Das noch feuchte Produkt wurde im Vakuum getrocknet. Das EDA-Cellulosecarbanilat wurde als Feststoff gelagert und bei Bedarf in DMF gelöst.

#### **Analytik:**

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ [ppm]: **20,5** ( $\text{CH}_3$  des Tosylates), **35 - 55** ( $\text{CH}_2$ ; der Aminosubstituenten), **59,1-101,8** (AGE der Cellulose), **145,5-119,5** (Aromaten-C der Tosylate oder Carbanilate), **152 - 154** (C=O)

Elementaranalyse: C:51,78 %; H:6,87 %; S:0,79 %; Cl:0,00 %; N:9,46 %

$\text{DS}_{\text{Ethylendiamin}}$ : 0,63 (Stickstoffgehalt, Bestimmung mittels EA)

### **4.4.3 Synthese von Proteinkonjugaten**

#### **4.4.3.1 Biotinylierung von IgG-Antikörpern**

Eine PD-10 Säule wurde mit 50 ml PBS-Puffer (pH 7,3) äquilibriert. Die entsprechende Antikörperlösung wurde zur Umpufferung auf diese Säule aufgetragen und durch Zugabe von 1 ml Fraktionen PBS-Puffer der Antikörper eluiert. Der Proteingehalt der einzelnen

Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Für IgG-Antikörper entspricht eine OD von 1,4 einem Proteingehalt von 1 mg/ml. Zur Biotinylierung wurde Sulfo-NHS-LC-Biotin in Wasser gelöst (5,56 mg/ml). Die Menge der benötigten Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung wurde entsprechend Formel 4-2 berechnet.

Formel 4-2: 
$$m_{\text{Biotin}} = \frac{m_{\text{Ak}} * M_{\text{Biotin}} * \text{Biotinylierungsgrad}}{M_{\text{Ak}}}$$

$m_{\text{Biotin}}$ =eingesetzte Masse Biotin;  $m_{\text{Ak}}$ =eingesetzte Masse Antikörper;  $M_{\text{Biotin}}$ =Molare Masse Biotin;  $M_{\text{Ak}}$ =Molare Masse IgG-Antikörper

Der verwendete Biotinylierungsgrad betrug 20. Die Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung wurde der umgepufferten Ak-Lösung zugesetzt und der Ansatz 30 Minuten unter Lichtausschluss geschüttelt. Zur Reinigung des biotinylierten Antikörpers wurde die Lösung auf eine mit 50 ml PBS-Puffer (pH 7,3) äquilibrierte PD-10 Säule gegeben. Die Probe wurde in 1 ml Fraktionen eluiert. Der Proteingehalt wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert [Burgess et al. 1995].

Als Detektionsantikörper für den ABICAP und den ELISA wurden die Antikörper Anti-h CRP 6405 SP-1 und anti-mouse Antikörper (GAM) biotinyliert.

#### 4.4.3.2 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

Eine PD-10 Säule wurde mit 50 ml Reinstwasser äquilibriert. 1 ml einer Anti-h CRP 6405 Antikörperlösung ( $c=1,01$  mg/ml) wurden zur Umpufferung auf diese Säule aufgetragen und durch Zugabe von 1 ml Fraktionen Reinstwasser der Antikörper eluiert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt und die Antikörper enthaltenen Fraktionen gepoolt. Für IgG-Antikörper entspricht ein OD-Wert von 1,4 einem Proteingehalt von 1 mg/ml. Die Anti-h CRP 6405 Antikörper Konzentration der gepoolten Fraktionen betrug 0,8 mg/ml.

1 ml der Goldnanopartikel-Lösung wurden vorgelegt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 0,2 M Natriumcarbonat-Lösung auf pH 6,5 eingestellt. Anschließend wurden 15  $\mu$ l der Anti-h CRP 6405 Antikörperlösung in Reinstwasser ( $c=0,8$  mg Ak/ml) zugegen und der Ansatz für 30 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l einer 1 %igen BSA-Lösung wurde weiter 20 Minuten geschüttelt und das Antikörper-Gold-Konjugat anschließend durch Zentrifugation und resuspendieren in Blockpuffer mehrmals gewaschen. Abschließend wurden das Antikörper-Gold-Konjugat in 40  $\mu$ l Blockpuffer aufgenommen und nochmal

10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Das Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugat wurde bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

## **4.5 Oberflächenmodifizierung von Substraten**

### **4.5.1 Herstellung der Trennfritten durch adsorptive Immobilisierung von BSA an PE-Mikrofilter**

Die adsorptive Immobilisierung von Biomolekülen an PE-Mikrofilter wurde für die Herstellung von Trennfritten, welche im ABICAP-Testsystem zum Einsatz kamen, angewendet. Zur Reinigung wurden die PE-Mikrofilter (Typ 187, Porex) in Ethanol gewaschen, anschließend für 10 Minuten in 50 % Ethanol im Vakuum gerührt und dann in CBB-Puffer (pH 9,5) überführt. Mit CBB-Puffer wurde anschließend noch zweimal für 10 Minuten im Vakuum gewaschen und im dritten Waschschrift 10 % BSA in CBB-Puffer zugefügt (200 µl/Trennfritte) und die PE-Mikrofilter für 12 h im Vakuum beschichtet. Abschließend wurden die Polyethylenträger im Luftstrom getrocknet und konnten als Trennfritten verwendet werden.

### **4.5.2 Substratmodifizierung mittels Aminocellulosederivat**

#### **4.5.2.1 Aktivierung der Substrate für die Modifizierung mittels Aminocellulosederivat** Sauerstoffplasma

Die Substrate wurden beidseitig je 5 Min. in einem Plasmagenerator mit einem Sauerstoff-Niederdruckplasma (0,5 bar) behandelt.

#### Ozon

Die Substrate wurden mit einem Ozongenerator für 30 Minuten mit Ozon im Durchfluss behandelt.

#### **4.5.2.2 Substratmodifizierung mittels Aminocellulosederivat der aktivierten Substrate**

##### Herstellung der Aminocellulosederivat-Modifizierungslösung

Die 1 %igen wässrigen Stammlösungen der Aminocelluloseosylate wurden mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 5 µm, Sartorius) filtriert und mit Wasser auf 0,05 % verdünnt. Anschließend wurden diese Lösungen noch für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und dann zur Modifizierung eingesetzt.

Die Aminocellulosecarbanilate wurden in DMF über Nacht unter Rühren gelöst und durch weiteres verdünnen mit DMF auf 0,05 % w/w eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen mit einem Spritzenvorsatzfilter filtriert (Porengröße 5 µm, Sartorius) und noch für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und konnten anschließend zur Modifizierung eingesetzt werden.

#### Modifizierung von PE-Mikrofiltern und PE-Membranen

Die Sauerstoffplasma bzw. Ozon aktivierten PE-Mikrofilter bzw. PE-Membranen wurden für 15 Minuten in einer 0,05 % Modifizierungslösung im Vakuum gerührt. Dabei wurden entsprechend ausreichende Mengen Aminocelluloselösung eingesetzt, dass die Träger vollständig in die Lösung getaucht wurden (200 µl pro PE-Mikrofilter, 10 ml pro PE-Membran). Anschließend wurden die porösen Träger dreimal mit Lösungsmittel im Vakuum gewaschen und im Luftstrom für 30 Minuten getrocknet.

#### Modifizierung von planaren Substraten

Die planaren Substrate (PE-Chips, Glimmerscheiben) wurden auf einen Spincoater gebracht und zweimal 10 µl der Modifizierungslösung bei 9000 upm aufgebracht. Anschließend wurden die Chips nach 15 minutiger Lagerzeit mit Wasser gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

### **4.6 Bestimmung der Aminogruppenkonzentration auf mit Aminocellulose modifizierten PE-Substraten (Tritylchloridmethode)**

Die Bestimmung der NH<sub>2</sub>-Konzentration in nmol/PE-Substrat erfolgte nach der Methode von Gaur et al. [1989]. Die Methode basiert auf der Anlagerung des 4,4'-Dimethoxytritylchlorid Farbstoffes an primäre Aminogruppen. Dazu wurden 1,7 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, 1,52 g Tetrabutylammoniumnitrat (TBAN) und 0,91 g sym.-Collidin in 10 ml DMF gelöst. Anschließend wurden drei mit Aminocellulose modifizierte PE-Mikrofilter pro Milliliter der Lösung zugegeben und für 35 Minuten stark geschüttelt. Der ungebundene Farbstoff wurde durch Waschen mit DMF (zweimal) und Methanol (ca. zehnmal) entfernt und die PE-Mikrofilter im Luftstrom getrocknet. Pro PE-Mikrofilter wurde 1 ml eines Gemisches aus 5,1 ml Perchlorsäure (70 %) und 4,6 ml Methanol zugegeben und für zwei Minuten stark

geschüttelt um den gebundenen Farbstoff abzuspalten und in der Lösung spektrophotometrisch zu vermessen. Die Vermessung der Absorbanz erfolgte bei  $\lambda_{\max}=498$  nm des Tritylkations. Mit dem bekannten Extinktionskoeffizienten wurde die  $\text{NH}_2$ -Konzentration nach Formel 4-3 berechnet.

$$\text{Formel 4-3: } \quad \text{NH}_2 \text{ Konzentration } \left[ \text{nmol} \frac{\text{NH}_2}{\text{Substrat}} \right] = \frac{A_{498} * V}{\epsilon_{498} * \text{Substrat}} * 10^9$$

$A_{498}$ =Absorbanz bei  $\lambda=498$  nm,  $V$ =Volumen des Reagenzes (1 ml),  $\epsilon_{498}$ =Extinktionskoeffizient des Tritylkations ( $70.000 \text{ l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ )

## 4.7 Methoden zur IgG-Ak-Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate

Für die Ak-Immobilisierung wurde der Antikörper Anti-h CRP 6404 SP-2 verwendet. Die Funktionalisierung der mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate und anschließende Ak-Immobilisierung sind in Kapitel 4.7.1 und Kapitel 4.7.2 beschrieben. Die Ak-Immobilisierung durch die Funktionalisierung der Antikörper und anschließende Immobilisierung in Kapitel 4.7.3. Das linienförmige Aufbringen der Antikörper auf eine PE-Membran ist separat in Kapitel 4.7.4 beschrieben.

### 4.7.1 Funktionalisierung von Aminocellulose-modifizierten PE-Substraten

#### 4.7.1.1 $\text{NH}_2$ -reaktive Funktionalisierung mittels homobifunktioneller Reagenzien

Die PE-Substrate wurden in Lösungen der homobifunktionellen Reagenzien (200  $\mu\text{l}$  pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) im Vakuum gerührt. In Tabelle 4-5 sind die ausgewählten homobifunktionellen Reagenzien und Angaben der Funktionalisierungsbedingungen aufgeführt. Nach der Funktionalisierung wurden die PE-Substrate mit dem jeweiligen Lösungsmittel (LM) gewaschen und anschließend direkt für die Ak-Immobilisierung verwendet.

Tabelle 4-5: Homobifunktionelle Reagenzien und Funktionalisierungsbedingungen.

Homobifunktionelles Reagenz	Bezeichnung <sup>a</sup>	LM <sup>b</sup>	Konzentration <sup>c</sup>	t [min] <sup>d</sup>
L-Ascorbinsäure <sup>e</sup>	ASC-Methode	DMF	Gesättigte Lösung	15
Benzochinon	CHI-Methode	DMF	Gesättigte Lösung	15
Glutardialdehyd	GDA-Methode	Wasser	10 % w/w	15
4,4'-Dihydroxybiphenyldiglycidylether	BDE-Methode	Wasser	5 % w/w	15

<sup>a</sup>Bezeichnung der Ak-Immobilisierungsmethode, <sup>b</sup>Eingesetztes Lösungsmittel zur Funktionalisierung, <sup>c</sup>Konzentration des homobifunktionellen Reagenzes zur Funktionalisierung, <sup>d</sup>Einwirkzeit der homobifunktionellen Reagenzien, <sup>e</sup>L-Ascorbinsäure reagiert mit NH<sub>2</sub>-funktionalisierten Substraten und NH<sub>2</sub>-haltigen Verbindungen bzw. Biomolekülen ähnlich homobifunktioneller Reagenzien [Tiller et al. 1999].

#### 4.7.1.2 Funktionalisierung mittels heterobifunktionellem Reagenz (DIA-Methode)

Die PE-Substrate wurden in einer Lösung (PB-Puffer, pH 8,0) mit 0,1 M Sulfosuccinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoate (Sulfo-NHS-LC-Diazirin) (200 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) für 30 Minuten im Vakuum gerührt. Die funktionalisierten PE-Substrate wurden mit Wasser gewaschen und anschließend direkt für die Ak-Immobilisierung verwendet.

#### 4.7.1.3 Carboxylierung mittels Bernsteinsäureanhydrid (CAB-Methode)

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate wurden in einer 40 mg/ml DMF/Bernsteinsäureanhydrid-Lösung (200 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) und Pyridin (0,5 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) im Vakuum für 16 h gerührt und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen.

#### 4.7.1.4 Aktivierung der carboxylierten PE-Substrate mit EDC/s-NHS (EDC-Methode)

Die carboxylierten PE-Substrate wurden in einer Lösung von 0,2 mg/ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) in MES-Puffer gegeben (100 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip). Nach 10 minutigen Rühren wurden noch 0,2 mg/ml Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (s-NHS)-Lösung in MES-Puffer zugegeben (100 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) und weitere 30 Minuten im Vakuum gerührt. Die PE-Substrate wurden anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen.

#### **4.7.1.5 Sulfonierung mittels 4,4'-Biphenyldisulfonylchlorid (SUF-Methode)**

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate wurden mit einer gesättigten 4,4'-Biphenyldisulfonylchloridlösung in Diethylether (200 µl pro PE-Mikrofilter und PE-Chip) für 15 Minuten behandelt und anschließend mit Ether gewaschen. Die mit Sulfonsäurechlorid modifizierten PE-Substrate wurden im Vakuum getrocknet und über Nacht mit Wasser im Vakuum gerührt um die Sulfonsäurechloridgruppen zu Sulfonsäuregruppen zu hydrolysieren.

#### **4.7.1.6 Funktionalisierung mit Streptavidin (SAV-Methode)**

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Substrate wurden mit Glutardialdehyd funktionalisiert. Anschließend wurden die GDA-funktionalisierten PE-Chips in eine Lösung (CBB-Puffer, pH 9,5) mit 20 µg Streptavidin pro PE-Chips für 1 h im Vakuum gerührt. Durch Zugabe von 5 µl Ethanolamin pro PE-Chip wurden restliche Bindungsstellen geblockt und nach weiteren 60 Minuten die PE-Substrate mehrmals mit Wasser gewaschen. Die SAV-funktionalisierten PE-Chips wurden zur Immobilisierung von biotinylierten IgG-Ak-Proteinen eingesetzt.

#### **4.7.1.7 Funktionalisierung mit Protein G (PG-Methode)**

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips wurden mit Glutardialdehyd funktionalisiert. Anschließend wurden die GDA-funktionalisierten PE-Chips in eine Lösung (CBB-Puffer, pH 9,5) mit 20 µg Protein G pro PE-Chip für 1 h im Vakuum gerührt. Durch Zugabe von 5 µl Ethanolamin pro PE-Chip wurden restliche Bindungsstellen geblockt und nach weiteren 60 Minuten die PE-Chips mehrmals mit Wasser gewaschen.

### **4.7.2 Ak-Immobilisierung an funktionalisierte, Aminocellulose-modifizierte PE-Chips und PE-Mikrofilter**

#### **4.7.2.1 Allgemeine Vorschrift zur Inkubation mit IgG-Ak-Protein**

Die funktionalisierten PE-Substrate (PE-Mikrofilter und PE-Chip) wurden mit 200 µl einer Lösung von Ak-Protein in Pufferlösung für eine definierte Zeit inkubiert und unter Vakuumbedingungen gerührt. Die Pufferlösungen und Inkubationszeiten variierten je nach Art der Funktionalisierung. Die Inkubationsbedingungen der Immobilisierungsmethoden sind in Tabelle 4-6 angegeben. Dabei wurden für die PE-Chips eine Ak-Konzentration von 1,0 µg Ak-Protein pro PE-Chip und für die PE-Mikrofilter zwei Ak-Konz. mit (a) 2,0 µg Ak und (b) 7,5 µg Ak-Protein pro PE-Mikrofilter eingesetzt. Nach der Ak-Inkubation wurden restliche

Bindungsstellen der funktionalisierten PE-Substrate durch Zugabe von 0,5 µl Ethanolamin pro PE-Substrat geblockt.

Abschließend wurden alle PE-Substrate für 1 h mit Trocknungspuffer (200 µl pro PE-Substrat) im Vakuum behandelt und zu letzt im Luftstrom getrocknet. Die PE-Substrate wurden trocken bei RT gelagert.

*Tabelle 4-6: Inkubationsbedingungen der Immobilisierungsmethoden.*

<b>Aktivierung nach</b>	<b>Puffer</b>	<b>Inkubationszeit</b>
ASC-Methode	CBB (pH 9,5)	20 h
CHI-Methode	CBB (pH 9,5)	20 h
GDA-Methode	CBB (pH 9,5)	60 min
BDE-Methode	CBB (pH 9,5)	60 min
DIA-Methode	Wasser	15 min
CAB-Methode	MES (pH 6,0)	60 min
EDC-Methode	PBS (pH 7,3)	120 min
SUF-Methode	MES (pH 6,0)	60 min
SAV-Methode	PBS (pH 7,3)	60 min
PG-Methode	PBS (pH 7,3)	60 min

#### **4.7.2.2 Ak-Inkubation bei Anwendung der CAB und SUF-Methode**

Nach der allgemein beschriebenen Ak-Immobilisierung wurden restliche Bindungsstellen mit Casein (uCDB-Puffer) geblockt.

#### **4.7.2.3 Ak-Inkubation bei Anwendung der SAV-Methode**

Bei der Ak-Inkubation mit SAV-funktionalisierten PE-Chips wurden anstelle von anti-h CRP 6404 Antikörpern, biotinylierte anti-h CRP 6404 Antikörper verwendet. Restliche Bindungsstellen wurden durch Zugabe von Biotin geblockt.

#### **4.7.2.4 Ak-Inkubation bei Anwendung der DIA-Methode**

Bei der DIA-Methode wurde während der Ak-Inkubation UV/Licht einer Wellenlänge  $\lambda_{\max}=350$  nm erzeugt mit einer HBO-Lampe und entsprechendem Interferenzfilter eingestrahlt.

### **4.7.3 Funktionalisierung von IgG-Ak-Protein und Immobilisierung an Aminocellulose-modifizierte PE-Substrate**

#### **4.7.3.1 Funktionalisierung mittels EDC/s-NHS (EDC-Ak-Methode)**

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips wurden in einer Lösung (PBS-Puffer, pH 7,3) mit 0,2 mg EDC/ml und 0,2 mg s-NHS/ml vorgelegt (200  $\mu$ l Lösung pro PE-Chip). Anschließend wurden 1,0  $\mu$ g Antikörper pro PE-Chip zugegeben. Diese Lösung wurde für 1 h im Vakuum gerührt und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die PE-Chips noch für 1 h im Vakuum mit Trocknungspuffer behandelt und zu letzt im Luftstrom getrocknet. Die Lagerung erfolgte trocken bei RT.

#### **4.7.3.2 Funktionalisierung mittels Natriumperiodat (ALD-Methode)**

Die mit Aminocellulose modifizierten PE-Chips wurden in einer Ak-Lösung (1  $\mu$ g Ak pro PE-Chip in 200  $\mu$ l MES-Puffer pro PE-Chip, pH 5,5) vorgelegt. Unter Ausschluss von Licht wurde 0,1 M Natriumperiodat-Lösung (Wasser, 50  $\mu$ l pro PE-Chip) zugegeben und für 30 Minuten unter Vakuumbedingungen gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,1 M Natronlauge der pH-Wert auf pH 9,0 gebracht und die Reaktion für 1 h fortgesetzt. Anschließend wurden die PE-Chips mit Wasser gewaschen und mit 0,2 M NaBCNH<sub>3</sub>-Lösung in Wasser (200  $\mu$ l pro PE-Chip) für 30 Minuten behandelt. Abschließend wurden die PE-Chips für 1 h im Trocknungspuffer behandelt und im Luftstrom getrocknet.

### **4.7.4 Funktionalisierung von Aminocellulose-modifizierten PE-Membranen und anschließende Ak-Immobilisierung**

Zur Herstellung von PE-Membranen mit einer Antikörperfängerbande wurden Funktionalisierungs- bzw. Ak-Immobilisierungsmethoden wie oben beschrieben angewendet. Für die PE-Membranen der Abmessung 10x2,5 cm wurden 10 ml der Funktionalisierungs-Lösungen eingesetzt. Die funktionalisierten PE-Membranen wurden im Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Das linienförmige Aufbringen der Ak-Lösung erfolgte durch Aufbringen einer Anti-h CRP 6404-Lösung mit dem sogenannten *Air Jet Quanti 3000 Dispenser* der Firma BioDot. Dabei wurde eine definierte Fängerantikörperkonzentration von

1 mg/ml in den entsprechenden Pufferlösung (vgl. Tabelle 4-6) aufgetragen. Pro Centimeter Länge der Testlinie wurde 1 µl der definierten Ak-Lösung aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten an der Luft wurde die Ak-funktionalisierte PE-Membran anschließend im Batch geblockt.

Das Blocken erfolgte durch schütteln der Membran für 60 Minuten in 10 ml uCDB-Puffer (vgl. Tabelle 4-6). Abschließend wurden die Membranen bei 37°C getrocknet und trocken bei RT gelagert.

### **4.7.5 Stresstest der gemäß CAB- und SUF-Methode Ak-modifizierten PE-Chips**

Ak-funktionalisierte PE-Chips hergestellt gemäß CAB- und SUF-Methode wurden in definierten Pufferlösungen für 1 h geschüttelt. Pro Chip wurden 1 ml der Lösungen, NaOH-Lösung, LiCl-Lösung, Citronensäure-Puffer (pH 3), uCDB-Puffer für 1 h zugegeben und stark geschüttelt. Anschließend wurde die IgG-Ak-Protein Konzentration in den Lösungen mit einem IgG-ELISA bestimmt (Kapitel 4.8.1).

## **4.8 Anwendung immunologischer Grundlagenmethoden**

### **4.8.1 ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)**

Als Referenzmethoden für die Ermittlung der CRP-Konzentrationen in Lösung und für die Analytik von IgG-Proteinen-Konzentrationen in Lösung wurden übliche ELISA's angewendet und an spezielle Erfordernisse der Doktorarbeit adaptiert.

#### Durchführung des Sandwich-ELISA

Zur Durchführung des ELISA, wurden die Fängerantikörper an eine Nunc-Immuno 96iger Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden (Coating). Dazu wurden 100 µl einer Fängerantikörperlösung in CBB-Puffer (pH 9,5) in definierter Konzentration in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde anschließend durch sogenanntes Ausschlagen aus der Mikrotiterplatte entfernt. Um eine unspezifische Antigenbindung in den Kavitäten zu unterbinden, wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl einer caseinhaltigen uCDB-Pufferlösung (vgl. Tabelle 4-3) pro Kavität für 1 h bei RT blockiert (Blockierung). Ungebundenes Protein wurden durch viermaliges Spülen mit Waschpuffer (pH 7,3, vgl. Tabelle 4-3) entfernt. Die auf

diese Weise vorbereitete Mikrotiterplatte wurde mit einer antigenhaltigen Probe für 1 h inkubiert (100 µl/Kavität) und ungebundenes Antigen durch viermaliges Spülen mit Waschpuffer entfernt. Zum Nachweis des gebundenen Antigens wurde eine Lösung eines biotinylierten-Detektionsantikörper als Reagenz (100 µl /Kavität) angewendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurde überschüssiges Reagenz durch viermaliges Spülen mit Waschpuffer entfernt. Zur Detektion des gebundenen biotinylierten-Detektionsantikörpers wurde eine HRP-Streptavidin-Konjugat-Lösung als Reagenz (100 µl/Kavität) angewendet und nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei RT überschüssiges Reagenz durch viermalige Anwendung eines Waschpuffers entfernt.

Die HRP-katalysierte optische Signalbildung in Form eines blauen TMB-Farbstoffs (TMB<sub>ox.</sub>) erfolgte anhand einer gebrauchsfertigen s(HS)TMB-Chromogenlösung mit Tetramethylbenzidin (TMB) als HRP-Substrat. Die Farbstoffbildung wurde nach 5 min durch Zugabe von 50 µl pro Kavität mit 8%iger Schwefelsäure abgestoppt.

Die photometrische Bestimmung des gelben Farbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Durch eine auf der Mikrotiterplatte mitgeführte Kalibration war eine Bestimmung der Antigenkonzentrationen möglich. Jeder Versuch wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der Einzelmessungen dargestellt. Der indirekte ELISA wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

### 1. Coating

- 100 µl/Kavität Fängerantikörperlösung in CBB-Puffer (pH 9,5)
- Inkubation bei 4°C, 12 h → Ausschlagen der Mikrotiterplatte

### 2. Blockieren

- 200 µl/Kavität uCDB-Puffer
- Inkubation bei RT, 1 h, unter Schütteln
- Waschen mit 3×200 µl Waschpuffer

### 3. Inkubation mit dem Antigen

- 100 µl einer Antigenlösung in uCDB-Puffer
- Inkubation bei RT, 1 h, unter Schütteln
- Waschen mit 3 × 200 µl Waschpuffer

#### 4. Inkubation mit dem biotinylierten Detektionsantikörper

- 100 µl/Kavität biotinylierter-Detektionsantikörperlösung in uCDB-Puffer
- Inkubation bei RT, 1 Stunde, unter Schütteln
- Waschen mit 3×200 µl Waschpuffer

#### 5. Inkubation mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat

- 100 µl/Kavität eines 0,2 µg/ml einer HRP-Konjugat-Lösung in uCDB-Puffer
- Inkubation bei RT, 30 min, unter Schütteln
- Waschen mit 4×200 µl Waschpuffer

#### 6. Farbreaktion

- 100 µl/Kavität Substratlösung (s(HS)TMB)
- Inkubation bei RT im Dunkeln, 5 min, unter Schütteln
- Zugabe von 50 µl 8%iger Schwefelsäure
- Photometrische Bestimmung bei 450 nm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Sandwich-ELISAs angewendet:

##### IgG-ELISA

Der IgG-ELISA diente dazu, die Konzentration eines IgG-Antikörpers in Lösung zu bestimmen. Durch Bestimmung der Konzentrationen vor und nach einer IgG-Ak-Immobilisierung, wurde die immobilisierte Menge IgG-Antikörper pro PE-Substrat ermittelt.

Fängerantikörper: 1 µg/ml Anti-mouse Antikörper (vgl. Tabelle 4-1)

Detektionsantikörper: 0,5 µg/ml biotinylierter Anti-mouse Antikörper (vgl. Kapitel 4.4.3.1.)

##### CRP-ELISA

Der CRP-ELISA diente dazu, die Konzentration von CRP in Lösung zu bestimmen. Durch Bestimmung der CRP-Konzentrationen vor und nach einer CRP Zugabe zu CRP-immunoaffinen Substraten, wurden die gebundene Menge CRP pro PE-Substrat ermittelt.

Fängerantikörper: 0,5 µg/ml Anti-h CRP 6404 (vgl. Tabelle 4-1)

Detektionsantikörper: 0,2 µg/ml biotinylierter Anti-h CRP 6405 (vgl. Kapitel 4.4.3.1)

### 4.8.2 ABICAP-Säulenassay anhand CRP-immunoaffiner PE-Mikrofilter

Eine ABICAP-Säule wurde mit einem CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter und zwei Trennfritten, die in der Säule vor und nach dem CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter angeordnet sind, bestückt.

Durch Zugabe von einer CRP-haltigen Lösung auf die ABICAP-Säule, wurde das CRP in dem CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter angereichert. Das auf dem CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter gefangenen CRP wurde anschließend durch Zugabe einer biotinylierten Detektionsantikörperlösung mit Biotin markiert. An das Biotin band durch Zugabe einer Streptavidin-polyHRP-Konjugat-Lösung das Enzymkonjugat. Die Farbstoffbildung in dem CRP-immunoaffinen PE-Mikrofilter erfolgte abschließend wie beim ELISA durch Zugabe einer ep(HS)TMB-Lösung als HRP-Substrat. Die ep(HS)TMB-Lösung enthielt anders als beim ELISA Dextransulfat, dass zur Präzipitation des blaugefärbten kationischen TMB<sup>(+)</sup>(ox.) am Ort der Farbstoffbildung diente. Das optische Signal in Form des OD-Wertes wurde durch Auslesen des blaugefärbten PE-Mikrofilters mittels eines ABICAP-Readers erhalten. Jede ABICAP-Vermessung wurde mit drei ABICAP-Säulen parallel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der drei Einzelmessungen dargestellt. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte des CRP-ABICAP-Säulenassays aufgeführt:

#### 1. Antigen Anreicherung

- Zugabe 500 µl der CRP-Lösungen verschiedener Konzentrationen in uCDB-Puffer
- Inkubationszeit 6 Minuten
- Waschen mit 750 µl Waschpuffer

#### 2. Inkubation biotinylierter Detektionsantikörperlösungen

- Zugabe 500 µl der Detektionsantikörperlösung (0,4 µg biotinylierter Anti-h CRP-6405/ml) in uCDB-Puffer
- Inkubationszeit 6 Minuten
- Waschen mit 750 µl Waschpuffer

### 3. Inkubation mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat

- Zugabe von 500 µl einer 0,2 µg/ml Streptavidin-polyHRP40-Konjugat-Lösung in uCDB-Puffer
- Inkubationszeit 6 Minuten
- Waschen mit 750 µl Waschpuffer

### 4. Farbstoffbildung

- Zugabe von 500 µl der HRP-Substratlösung (ep(HS)TMB)
- Inkubationszeit 6 Minuten
- Waschen mit 750 µl Waschpuffer
- Auslesen des OD-Wertes mit dem ABICAP-Reader

#### **4.8.3 CRP-DipStick-Test mit Ak-funktionalisierten PE-Membranen**

Die Ak-funktionalisierten PE-Membranen wurden auf einer *Backing-Card* geklebt und an das obere Ende der *Backing-Card*, überlappend mit der PE-Membran, ein *Absorbent-Pad* befestigt. Die *Backing-Card* mit aufgebrachtener PE-Membran und *Absorbent-Pad* wurde in 4 mm breite Teststreifen geschnitten.

In eine 96iger Mikrotiterplatte wurden 50 µl CRP-Lösung verschiedener CRP-Konzentrationen ( $c=0 / 0,01 / 0,1 / 1,0 / 10 / 100$  ng CRP/ml) in uCDB-Puffer pro Kavität vorgelegt. Dazu wurden 1,0 µl Anti-h CRP 6405 Antikörper-Gold-Konjugat-Lösung zugegeben und die Mikrotiterplatte stark geschüttelt. Pro Kavität wurde ein Teststreifen in die Lösung eingetaucht, so dass das *Absorbent-Pad* in die Luft ragte. Nach 10 Minuten wurden die Teststreifen aus der Lösung entnommen und die Signalbande visuell ausgewertet.

## 5 Zusammenfassung

In der Praxis weit verbreitete immunologische Schnelltests, wie der LFA, immobilisieren Rezeptorstrukturen (beispielsweise Antikörper) adsorptiv an die Oberfläche. Dadurch treten Probleme wie Sensitivitätsverlust durch Ausbluten der Rezeptorstrukturen oder Lagerstabilitätsprobleme durch schleichende Konformationsänderungen auf. Des Weiteren behalten bei der adsorptiven Immobilisierung nur ca. 10 % der Antikörper ihre native Funktionalität.

Ziel der Arbeit war es, Antikörper kovalent an PE-Substrate unter Erhaltung der maximalen Ak-Funktionalität zu immobilisieren. Um Antikörper kovalent auf PE-Substraten zu immobilisieren, wurden Aminofunktionen auf PE-Oberflächen mithilfe von Aminocellulosederivaten eingeführt. Der eingesetzte Aminocellulose Typ zeichnet sich durch filmbildende Eigenschaften auf Substraten aus, wodurch aminogruppenhaltige PE-Substrate erhalten wurden. Durch die Anwendung verschiedener Ak-Immobilisierungsmethoden an die Aminogruppen der Aminocellulose-modifizierten PE-Substrate, wurde die immobilisierte Ak-Funktion optimiert. Abschließend konnte mit selektierten Ak-funktionalisierten PE-Mikrofiltern ein ABICAP-Assay zur CRP-Konzentrationsbestimmung entwickelt werden, um die Möglichkeiten der neuartigen Ak-Immobilisierungsmethode zu demonstrieren.

Zur Modifizierung von PE-Substraten als Assayträger wurden verschiedene kompositbildende Aminocellulosederivate synthetisiert. Dabei wurden zum einen wasserlösliche Aminocellulosesylate mit einem Diamin- oder Oligoamin-Rest an C6 der AGE und zum anderen DMF-lösliche Aminocellulosecarbanilate mit einem Diamin- oder Oligoamin-Rest an C6 der AGE synthetisiert. Durch die Modifizierung der PE-Substrate mit Aminocellulosederivaten erhielt man  $\text{NH}_2$ -funktionelle, biokompatible PE-Substrate. Ausgehend von einem lagerstabilen DMF-löslichen EDA-Cellulosecarbanilat gelang es, Komposite aus Aminocellulosederivat und PE-Substraten mit reproduzierbaren Oberflächeneigenschaften wie Aminogruppendichte und Oberflächen-Topographien herzustellen. Wasserlösliche Aminocellulosesylate eigneten sich dagegen aufgrund fehlender reproduzierbarer Oberflächeneigenschaften der modifizierten Substrate nicht zur Ausbildung von Selbstkompositen auf PE-Substraten

An die Aminogruppen von EDA-Cellulosecarbanilat-modifizierten PE-Substraten konnten IgG-Antikörper kovalent immobilisiert werden. Dabei erhielt man, in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode bzw. unterschiedlicher Kopplungsstrukturen, unterschiedliche Ak-Funktionalitäten der immobilisierten Antikörper. Durch ein Screening der Immobilisierungsmethoden hinsichtlich der Erhaltung der Ak-Funktionalität gelang es, geeignete Ak-Immobilisierungsmethoden auszuwählen. Durch dieses Verfahren gelang es, Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter mit Ak-Funktionalitäten von bis zu 31 % herzustellen. Allerdings sank die Ak-Funktionalität immobilisierter Antikörper mit zunehmender Ak-Beladung.

Die Ak-funktionalisierten PE-Mikrofilter wurden zur CRP-Konzentrationsbestimmung in einem ABICAP-Säulenassay getestet. Mit einem optimierten ABICAP-Säulenassay konnten CRP-Konzentrationsbestimmungen mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng CRP/ml und Variationskoeffizienten kleiner 10,9 % erzielt werden. Die Lagerstabilität des Assays ist außerdem nachweislich für mindestens 333 Tage gewährleistet. Damit konnte demonstriert werden, dass sich das Verfahren der kovalenten Ak-Immobilisierung basierend auf Aminocellulose-modifizierten PE-Substraten sehr gut für die Entwicklung von Ak-basierenden Biosensoren eignet.

Abschließend wurden kovalente Ak-Immobilisierungen an mit EDA-Cellulosecarbanilat modifizierte PE-Membranen angewendet. Dabei wurden die Antikörper auf der PE-Membran zur Erzeugung einer Antikörperfängerbande linienförmig aufgetragen. In einer ersten Untersuchung der Ak-funktionalisierten PE-Membranen als LFA konnten CRP-Konzentrationen von bis zu 0,1 ng CRP/ml nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse des Verfahrens der Modifizierung von Substraten mit Aminocellulose und anschließenden kovalenten Ak-Immobilisierung lassen erwarten, dass es eine ausgezeichnete Grundlage für die Entwicklung von Assays im Speziellen im Durchfluss- und im Lateralfluss-Format ist.

## Quellenverzeichnis

- Bergmeyer, H. U. (1974): *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Berlin, P.; Klemm, D.; Jung, A.; Liebegott, H.; Rieseler, R.; Tiller, J. (2003): Film-Forming Aminocellulose Derivatives as Enzyme-Compatible Support Matrices for Biosensor Developments. In: *Cellulose* 10 (4), S. 343–367.
- Berlin, P.; Jung, A.; Wolters, B. (2006): Verfahren zur Modifizierung eines Substrats. Angemeldet durch Forschungszentrum Jülich GmbH. Veröffentlichungsnr: DE 10 2005 008 434 A1.
- Berlin, P.; Klemm, D.; Tiller, J.; Rieseler, R. (2000): A novel soluble aminocellulose derivative type: its transparent film-forming properties and its efficient coupling with enzyme proteins for biosensors. In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 201 (15), S. 2070–2082.
- Berlin, P.; Tiller, J.; Klemm, D. (1997): Neue Aromatische Amin-Cellulosederivate und Verfahren zu deren Herstellung. Angemeldet durch Forschungszentrum Jülich GmbH. Veröffentlichungsnr: WO 97/25353.
- Boubbou, K. H.; Ghaddar, T. H. (2005): Electrostatic Layer-by-Layer Deposition of Photoactive Dendrimers with Triviologen-Like Cores on Their Surfaces. Synthesis and Electrochemical and Photocurrent Generation Measurements. In: *Langmuir* 21 (19), S. 8844–8851.
- Burgess, T. L.; Ross, S. L.; Qian, Y.-X.; Brankow, D.; Hu, S. (1995): Biosynthetic Processing of neu Differentiation Factor: GLYCOSYLATION, TRAFFICKING, AND REGULATED CLEAVAGE FROM THE CELL SURFACE. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (32), S. 19188–19196.
- Butler, J. E.; Ni, L.; Brown, W. R.; Joshi, K. S.; Chang, J.; Rosenberg, B.; Voss Jr, E. W. (1993): The immunochemistry of sandwich elisas—VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption. In: *Molecular Immunology* 30 (13), S. 1165–1175.
- Chen, S.; Liu, L.; Zhou, J.; Jiang, S. (2003): Controlling Antibody Orientation on Charged Self-Assembled Monolayers. In: *Langmuir* 19 (7), S. 2859–2864.
- Clarke, J. L.; Anderson, J. L.; Carlquist, J. F.; Roberts, R. F.; Horne, B. D.; Bair, T. L. (2005): Comparison of differing C-reactive protein assay methods and their impact on cardiovascular risk assessment. In: *The American Journal of Cardiology* 95 (1), S. 155–158.
- Crampton, N.; Bonass, W. A.; Kirkham, J.; Thomson, N. H. (2005): Formation of Aminosilane-Functionalized Mica for Atomic Force Microscopy Imaging of DNA. In: *Langmuir* 21 (17), S. 7884–7891.
- Dekeyser, C. M.; Buron, C. C.; Mc Evoy, K.; Dupont-Gillain, C. C.; Marchand-Brynaert, J.; Jonas, A. M.; Rouxhet, P. G. (2008): Oligo(ethylene glycol) monolayers by silanization of silicon wafers: Real nature and stability. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 324 (1–2), S. 118–126.

- Di, G.; McBean, N.; Schultz, J. S.; Yan, Y.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2006): Fabrication of Antibody Arrays Using Thermally Responsive Elastin Fusion Proteins. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (3), S. 676–677.
- Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. (1996): Immunoassay. San Diego: Academic Press.
- Dominici, R.; Luraschi, P.; Franzini, C. (2004): Measurement of C-reactive protein: Two high sensitivity methods compared. In: *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18 (5), S. 280–284.
- Du Clos, Terry W (2000): Function of C-reactive protein. In: *Annals of Medicine* 32 (4), S. 274–278.
- Duffy, M. J.; van Rossum, Leo G. M.; van Turenhout, Sietze T.; Malminiemi, O.; Sturgeon, C.; Lamerz, R. et al. (2011): Use of faecal markers in screening for colorectal neoplasia: a European group on tumor markers position paper. In: *International Journal of Cancer* 128 (1), S. 3–11.
- Duke, C. B.; Plummer, E. W. (2002): Frontiers in surface and interface science. Amsterdam, Boston, London: Elsevier.
- Engvall, E.; Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (9), S. 871–874.
- Erlinger T. P.; Platz E. A.; Rifai N.; Helzlsouer K. J. (2004): C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. In: *JAMA* 291 (5), S. 585–590.
- Fernández-Sánchez, C.; McNeil, C. J.; Rawson, K.; Nilsson, O.; Leung, H. Y.; Gnanapragasam, V. (2005): One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. In: *Journal of Immunological Methods* 307 (1–2), S. 1–12.
- Findlay, J.; Dillard, R. (2007): Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. In: *The AAPS Journal* 9 (2), S. E260-E267.
- Fischer, M.; Vögtle, F. (1999): Dendrimers: From Design to Application—A Progress Report. In: *Angewandte Chemie International Edition* 38 (7), S. 884–905.
- Gaur, R. K.; Gupta, K. C. (1989): A spectrophotometric method for the estimation of amino groups on polymer supports. In: *Analytical Biochemistry* 180 (2), S. 253–258.
- Gessler, F.; Hampe, K.; Böhnelt, H. (2005): Sensitive Detection of Botulinum Neurotoxin Types C and D with an Immunoaffinity Chromatographic Column Test. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), S. 7897–7903.
- Glick, B. R.; Pasternak, J. J. (1995): Molekulare Biotechnologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).
- Gomes, A. F.; Gozzo, F. C. (2010): Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. In: *Journal of Mass Spectrometry* 45 (8), S. 892–899.
- Göpel, W.; Heiduschka, P. (1995): Interface analysis in biosensor design. In: *Biosensors and Bioelectronics* 10 (9–10), S. 853–883.
- Green, N. M. (1990): Avidin and streptavidin. In: *Methods Enzymol* 184, S. 51–67.

- Harris, J. M. (1992): Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press (Topics in applied chemistry).
- Hartmann, H.; Lübbers, B.; Casaretto, M.; Bautsch, W.; Klos, A.; Köhl, J. (1993): Rapid quantification of C3a and C5a using a combination of chromatographic and immunoassay procedures. In: *Journal of Immunological Methods* 166 (1), S. 35–44.
- Hermanson, G. T. (2008): Bioconjugate techniques. Amsterdam: Academic Press.
- Huber, R. (1980): Spatial structure of immunoglobulin molecules. In: *Klinische Wochenschrift* 58 (22), S. 1217–1231.
- Jung, A.; Berlin, P. (2005): New water-soluble and film-forming aminocellulose tosylates as enzyme support matrices with Cu<sup>2+</sup>-chelating properties. In: *Cellulose* 12 (1), S. 67–84.
- Jung, A.; Berlin, P.; Wolters, B. (2004): Biomolecule-compatible support structures for biomolecule coupling to physical measuring principle surfaces. In: *IEE Proceedings - Nanobiotechnology* 151 (3), S. 87-94(7).
- Jung, A.; Gronewold, T. M. A.; Tewes, M.; Quandt, E.; Berlin, P. (2007b): Biofunctional structural design of SAW sensor chip surfaces in a microfluidic sensor system. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 124 (1), S. 46–52.
- Jung, A.; Wolters, B.; Berlin, P. (2007): (Bio)functional surface structural design of substrate materials based on self-assembled monolayers from aminocellulose derivatives and amino(organo)polysiloxanes. In: *Thin Solid Films* 515 (17), S. 6867–6877.
- Jung, Y.; Lee, J. M.; Jung, H.; Chung, B. H. (2007c): Self-Directed and Self-Oriented Immobilization of Antibody by Protein G–DNA Conjugate. In: *Analytical Chemistry* 79 (17), S. 6534–6541.
- Katz, E.; Willner, I. (2004): Integrierte Hybridsysteme aus Nanopartikeln und Biomolekülen: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen. In: *Angewandte Chemie* 116 (45), S. 6166–6235.
- Keevil, B. G.; Nicholls, S. P.; Kilpatrick, E. S. (1998): Evaluation of a Latex-Enhanced Immunoturbidimetric Assay for Measuring Low Concentrations of C-Reactive Protein. In: *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine* 35 (5), S. 671–673.
- Kohler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497.
- Koskinen, J. O.; Vaarno, J.; Meltola, N. J.; Soini, J. T.; Hänninen, P. E.; Luotola, J. et al. (2004): Fluorescent nanoparticles as labels for immunometric assay of C-reactive protein using two-photon excitation assay technology. In: *Analytical Biochemistry* 328 (2), S. 210–218.
- Kriz, K.; Ibraimi, F.; Lu, M.; Hansson, L.-O.; Kriz, D. (2005): Detection of C-Reactive Protein Utilizing Magnetic Permeability Detection Based Immunoassays. In: *Analytical Chemistry* 77 (18), S. 5920–5924.
- Lee, J. M.; Park, H. K.; Jung, Y.; Kim, J. K.; Jung, S. O.; Chung, B. H. (2007): Direct Immobilization of Protein G Variants with Various Numbers of Cysteine Residues on a Gold Surface. In: *Analytical Chemistry* 79 (7), S. 2680–2687.

- Leung, W.; Chan, C. P.; Rainer, T. H.; Ip, M.; Cautherley, G. W. H.; Renneberg, R. (2008): InfectCheck 5CRP6 barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections. In: *Journal of Immunological Methods* 336 (1), S. 30–36.
- Lomant, A. J.; Fairbanks, G. (1976): Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). In: *Journal of Molecular Biology* 104 (1), S. 243–261.
- Lu, B.; Smyth, M. R.; O’Kennedy, R. (1996): Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. In: *Analyst* 121 (3), S. 29R-32R.
- Lucht, A.; Formenty, P.; Feldmann, H.; Götz, M.; Leroy, E.; Bataboukila, P. et al. (2007): Development of an Immunofiltration-Based Antigen-Detection Assay for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Infection. In: *Journal of Infectious Diseases* 196 (Supplement 2), S. S184-S192.
- Marcus, N.; Mor, M.; Amir, L.; Mimouni, M.; Waisman, Y. (2008): Validity of the quick-read C-reactive protein test in the prediction of bacterial pneumonia in the pediatric emergency department. In: *European Journal of Emergency Medicine* 15 (3).
- Mazer, S.; Rabbani, L. (2004): Evidence for C-Reactive Protein’s Role in (CRP) Vascular Disease: Atherothrombosis, Immuno-Regulation and CRP. In: *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 17 (2), S. 95–105.
- Meiland, M.; Liebert, T.; Heinze, T. (2011): Tailoring the Degree of Polymerization of Low Molecular Weight Cellulose. In: *Macromolecular Materials and Engineering* 296 (9), S. 802–809.
- Metzger, S. W.; Natesan, M.; Yanavich, C.; Schneider, J.; Lee, G. U. (1999): Development and characterization of surface chemistries for microfabricated biosensors. In: *Journal of Vacuum Science & Technology A* 17 (5), S. 2623–2628.
- Meyer, M. H.; Hartmann, M.; Krause, H.-J.; Blankenstein, G.; Mueller-Chorus, B.; Oster, J. et al. (2007): CRP determination based on a novel magnetic biosensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 22 (6), S. 973–979.
- Meyer, M. H.; Stehr, M.; Bhujju, S.; Krause, H.-J.; Hartmann, M.; Miethe, P. et al. (2007b): Magnetic biosensor for the detection of *Yersinia pestis*. In: *Journal of Microbiological Methods* 68 (2), S. 218–224.
- Mouri, M.; Ikawa, T.; Narita, M.; Hoshino, F.; Watanabe, O. (2010): Orientation Control of Photo-Immobilized Antibodies on the Surface of Azobenzene-Containing Polymers by the Introduction of Functional Groups. In: *Macromolecular Bioscience* 10 (6), S. 612–620.
- Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M.; Janeway, C. (2012): *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science.
- Niemeyer, C. M. (2001): Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. In: *Angewandte Chemie International Edition* 40 (22), S. 4128–4158.

- Niwa, D.; Yamada, Y.; Homma, T.; Osaka, T. (2004): Formation of Molecular Templates for Fabricating On-Chip Biosensing Devices. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (10), S. 3240–3245.
- Palkovits, R.; Mayer, C.; Bauer, G.; Winkler, H.; Pittner, F.; Schalkhammer, T. (2003): Structural behavior of nanometric carbohydrate films transduced by a resonant technique. In: *Biopolymers* 69 (3), S. 333–342.
- Patrie, S. M.; Mrksich, M. (2007): Self-Assembled Monolayers for MALDI-TOF Mass Spectrometry for Immunoassays of Human Protein Antigens. In: *Analytical Chemistry* 79 (15), S. 5878–5887.
- Peltola, H.; Laipio, M. L.; Siimes, M. A. (1984): Quantitative C-reactive Protein (CRP) Determined by an Immunoturbidimetric Method in Rapid Differential Diagnosis of Acute Bacterial and Viral Diseases of Children. In: *Acta Pædiatrica* 73 (2), S. 273–274.
- Piehler, J.; Brecht, A.; Geckeler, K. E.; Gauglitz, G. (1996): Surface modification for direct immunoprobes. In: *Biosensors and Bioelectronics* 11 (6–7), S. 579–590.
- Pirrung, M. C. (2002): Die Herstellung von DNA-Chips. In: *Angewandte Chemie* 114 (8), S. 1326–1341.
- Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; Amerongen, A. (2009): Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (2), S. 569–582.
- Prime, K. L.; Whitesides, G. M. (1991): Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. In: *Science* (252), S. 1164–1167.
- Prime, K. L.; Whitesides, G. M. (1993): Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (23), S. 10714–10721.
- Raem, A. M.; Rauch, P. (2007): Immunoassays. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum.
- Rahn, K.; Diamantoglou, M.; Klemm, D.; Berghmans, H.; Heinze, T. (1996): Homogeneous synthesis of cellulose p-toluenesulfonates in N,N-dimethylacetamide/LiCl solvent system. In: *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 238 (1), S. 143–163.
- Rickert, J.; Weiss, T.; Kraas, W.; Jung, G.; Göpel, W. (1996): A new affinity biosensor: self-assembled thiols as selective monolayer coatings of quartz crystal microbalances. In: *Biosensors and Bioelectronics* 11 (6–7), S. 591–598.
- Robinson-Dunn, B. (2002): The Microbiology Laboratory's Role in Response to Bioterrorism. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 126 (3), S. 291–294.
- Sada, E.; Katoh, S.; Sukai, K.; Tohma, M.; Kondo, A. (1986): Adsorption equilibrium in immuno-affinity chromatography with polyclonal and monoclonal antibodies. In: *Biotechnology and Bioengineering* 28 (10), S. 1497–1502.
- Senaratne, W.; Andruzzi, L.; Ober, C. K. (2005): Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes in Biotechnology: Current Applications and Future Perspectives. In: *Biomacromolecules* 6 (5), S. 2427–2448.

- Shrive, A. K.; Gheetham, Graham M. T.; Holden, D.; Myles, Dean A. A.; Turnell, W. G.; Volanakis, J. E. et al. (1996): Three dimensional structure of human C-reactive protein. In: *Nat Struct Mol Biol* 3 (4), S. 346–354.
- Sin, K.-K.; Chan, C.-Y.; Leung, W.-M.; Seydack, M.; Renneberg, R. (2006): Fluorogenic nanocrystals for highly sensitive detection of C-reactive protein. In: *IEE Proceedings - Nanobiotechnology* 153 (3), S. 54-58.
- Sorribas, H.; Padeste, C.; Tiefenauer, L. (2002): Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. In: *Biomaterials* 23 (3), S. 893–900.
- Stimson, W. H.; Sinclair, J. M. (1974): An immunoassay for pregnancy-associated  $\alpha$ -macroglobulin using antibody—enzyme conjugates. In: *FEBS Letters* 47 (1), S. 190–192.
- Thompson, D.; Pepys, M. B.; Wood, S. P. (1999): The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. In: *Structure* 7 (2), S. 169–177.
- Tiller, J.; Berlin, P.; Klemm, D. (2000): Novel matrices for biosensor applications by structural design of redox-chromogenic aminocellulose esters. In: *Journal of Applied Polymer Science* 75 (7), S. 904–915.
- Tiller, J. C.; Rieseler, R.; Berlin, P.; Klemm, D. (2002): Stabilization of Activity of Oxidoreductases by Their Immobilization onto Special Functionalized Glass and Novel Aminocellulose Film Using Different Coupling Reagents. In: *Biomacromolecules* 3 (5), S. 1021–1029.
- Tiller, J.; Berlin, P.; Klemm, D. (1999): Soluble and film-forming cellulose derivatives with redox- chromogenic and enzyme immobilizing 1,4-phenylenediamine groups. In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 200 (1), S. 1–9.
- Tiller, J.; Klemm, D.; Berlin, P. (2001): Designed aliphatic aminocellulose derivatives as transparent and functionalized coatings for enzyme immobilization. In: *Designed Monomers and Polymers* 4 (4), S. 315–328.
- Tillett, W. S.; Francis, T. (1930): SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. In: *The Journal of Experimental Medicine* 52 (4), S. 561–571.
- Tomaso, H.; Thullier, P.; Seibold, E.; Guglielmo, V.; Buckendahl, A.; Rahalison, L. et al. (2007): Comparison of Hand-Held Test Kits, Immunofluorescence Microscopy, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Flow Cytometric Analysis for Rapid Presumptive Identification of *Yersinia pestis*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 45 (10), S. 3404–3407.
- Turková, J. (1999): Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722 (1–2), S. 11–31.
- Ulman, A. (1990): Self-assembled monolayers of alkyltrichlorosilanes: Building blocks for future organic materials. In: *Advanced Materials* 2 (12), S. 573–582.
- van Weemen, B. K.; Schuur, A. (1971): Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. In: *FEBS Letters* 15 (3), S. 232–236.

- Vermeire, S.; van Assche, G.; Rutgeerts, P. **(2004)**: C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 10 (5), S. 661–665.
- Wang, J. **(2005)**: Nanomaterial-based electrochemical biosensors. In: *Analyst* 130 (4), S. 421–426.
- Williams, R. A.; Blanch, H. W. **(1994)**: Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. In: *Biosensors and Bioelectronics* 9 (2), S. 159–167.
- Wong, R. C.; Tse, H. Y. **(2009)**: Lateral flow immunoassay. New York, NY: Springer.
- Wood, W. G. **(1991)**: “Matrix Effects” in Immunoassays. In: *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 51 (s205), S. 105–112.
- Yakovleva, J.; Davidsson, R.; Bengtsson, M.; Laurell, T.; Emnéus, J. **(2003)**: Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (1), S. 21–34.

## Danksagung

Ich danke Herrn Professor Thomas Heinze für die Anregung zu diesem Thema, sowie seine Aufgeschlossenheit, viele Ideen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonders danken möchte ich außerdem Dr. Peter Berlin für die intensive Unterstützung bei meiner Arbeit, zahlreichen Anregungen, Diskussionen und seine unermüdliche Unterstützung über die Jahre.

Ich danke für die dreijährige Finanzierung (Januar 2010- November 2012) des *European Community's Seventh Framework Programme* (FP7/2007–2013) unter der Vereinbarung Nummer 214653 (*surface functionalization of cellulose matrices using coatings of functionalized polysaccharides with embedded nano-particles*, SurFunCell), wodurch die Forschung, die zu diesen Ergebnissen geführt hat erst möglich war.

Herrn Dr. Peter Miete danke ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas am fzmb und die stete Hilfsbereitschaft sowie interessanten Diskussionen.

Allen Kollegen aus dem Arbeitskreise von Herrn Professor Thomas Heinze, mit denen ich im Laufe der Jahre zusammengearbeitet habe und die mich bei der Arbeit unterstützt haben, danke ich für die Hilfsbereitschaft.

Ich danke der Senova GmbH und der FZMB GmbH und seinen Mitarbeitern für die wertvolle Zusammenarbeit und eine Vielzahl von Biochemikalien. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Thomas Wellhöfer für die zahlreichen Anregungen.

Meiner Familie und Silvia Kerbstat danke ich für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name	Scholz, Friedrich
Anschrift	Nollendorfer Straße 10 07743 Jena
Geburtsdatum	12.03.1985 in Dresden
Familienstand	ledig

## PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

---

Januar 2013-Heute	Senova GmbH, Weimar, Wissenschaftlicher Mitarbeiter
-------------------	---

## AUSBILDUNG

---

Januar 2010–November 2014	Promotion im Fachbereich Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Thema der Arbeit: „Modifizierung von Polyethylensubstraten mit Aminocellulose und Antikörperimmobilisierung für die Entwicklung von immunologischen Schnelltests am Beispiel von CRP“
Oktober 2004–Dezember 2010	Studium der Chemie (Diplom) mit Spezialisierung in Makromolekularer Chemie und Photochemie (Friedrich-Schiller-Universität Jena) Abschlussnote: 1,9 Diplomarbeit: "Synthese und Untersuchung neuartiger Polyelektrolyte" (Note: 1,8)
August 2003 bis April 2004	Zivildienst, Diakonie, Leipzig, Wohnen Heinz Wagner - Wohnen für Kinder, Jugendliche und junge Volljährige mit und ohne Beeinträchtigung
August 1995–Juli 2003	Allgemeine Hochschulreife (Neue Nikolaischule Leipzig, Gymnasium)

## KENNTNISSE

---

Fremdsprachen	ENGLISCH
EDV	WORD, EXCEL, POWERPOINT, CHEM DRAW, ORIGIN

Jena ,

Friedrich Scholz

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena,

\_\_\_\_\_  
Friedrich Scholz